

## EFFECTO ASOCIADO DE DERIVADOS DE MELIÁCEAS Y HONGOS ENTOMOPATÓGENOS EN LA SUPERVIVENCIA DE *Heterotermes tenuis* (HAGEN, 1858) (ISOPTERA, RHINOTERMITIDAE)

Castiglioni, E.<sup>1</sup>; Vendramim, J. D.<sup>2</sup>; Alves, S. B.<sup>2</sup>

### RESUMEN

El efecto tóxico de derivados de meliáceas y de las cepas 634 de *Beauveria bassiana* y 1037 de *Metarhizium anisopliae* se evaluó sobre la termita subterránea *Heterotermes tenuis*, en laboratorio. Se evaluaron extractos acuosos de *Melia azedarach*, *Trichilia pallida* y *Azadirachta indica* (nim) (1 y 5% p/v), aceite de nim (1 y 2% v/v) y Nimkol-L<sup>®</sup> (0,2 - 0,4% i.a., v/v), adicionados por inmersión en discos de cartón. Las suspensiones de conidios (variando de 10<sup>7</sup> a 5x10<sup>8</sup> conidios/ml) fueron adicionadas por inmersión de los discos, 2 horas, 24 horas, 5 días ó 6 días después de la adición de los extractos. En base a los resultados de los estudios de laboratorio, *M. anisopliae* (1037) y Nimkol-L<sup>®</sup> fueron utilizados en trampas Termitrap<sup>®</sup> para evaluar el efecto, en forma independiente y asociada, sobre focos de infestación de *H. tenuis* en caña de azúcar, en condiciones de campo. Los derivados vegetales, en las concentraciones evaluadas, no ocasionaron mortalidad significativa de *H. tenuis*. *M. anisopliae* (1037) fue más patogénico que *B. bassiana* (634) para esta termita, en laboratorio. La asociación de los entomopatógenos con los extractos vegetales fue negativa, en la mayoría de los casos. Sin embargo, hubo aditividad y/o sinergismo en la asociación de los entomopatógenos y Nimkol-L<sup>®</sup>, cuando se adicionaron a los discos con una diferencia de tiempo mínima de 24 horas. Cuando incorporados en las trampas, en condiciones de campo, Nimkol-L<sup>®</sup>, *M. anisopliae* (1037) y la asociación de ambos confirmaron, para *H. tenuis*, la actividad tóxica verificada en laboratorio.

**PALABRAS CLAVE:** extractos vegetales, Meliaceae, entomopatógenos, termitas.

### SUMMARY

## EFFECT OF THE ASSOCIATION OF MELIACEAE BY-PRODUCTS AND ENTOMOPATHOGENIC FUNGI ON THE SURVIVAL OF *Heterotermes tenuis* (HAGEN, 1858) (ISOPTERA, RHINOTERMITIDAE)

The toxic effects of by-products of Meliaceae, isolate 634 of *Beauveria bassiana*, and isolate 1037 of *Metarhizium anisopliae*, on the subterranean termite *Heterotermes tenuis* were measured in the laboratory. Aqueous extracts of *Melia azedarach*, *Trichilia pallida*, and *Azadirachta indica* (neem) (1 and 5% w/v), neem oil (1 and 2% v/v) and Nimkol-L<sup>®</sup> (0.2 - 0.4 a.i., v/v), were tested, added by immersion on paper disks. The conidial suspensions (varying from 10<sup>7</sup> to 5 x 10<sup>8</sup> conidia/ml) were added by immersion of the disks (2h, 24h, 5 or 6 days after the addition of the extracts). Based on the results of the lab experiments, *M. anisopliae* (1037) and Nimkol-L<sup>®</sup> were used in Termitrap<sup>®</sup> baits in order to test the effect, independently and in association, over infection cores of *H. tenuis* in sugarcane, under field conditions. The vegetal derivatives, in the tested concentrations, did not cause significant mortality of *H. tenuis*. *M. anisopliae* (1037) was more pathogenic than *B. bassiana* (634) for that termite in the laboratory. The association of the entomopathogens with the vegetal extracts was negative in most of the cases. There was additivity and/or synergism in the association of the entomopathogens and Nimkol-L<sup>®</sup> when the disks were added with a difference of at least 24h. Nimkol-L<sup>®</sup>, *M. anisopliae* (1037), and the combination of both, when incorporated in the baits, under field conditions, confirmed the toxic activity detected in the laboratory.

**KEY WORDS:** plant extracts, Meliaceae, entomopathogens, termites.

<sup>1</sup>UDELAR, Facultad de Agronomía, E.E.M.A.C. Depto. de Protección Vegetal Ruta 3 Gral. Artigas km 363, 60000, Paysandú, Uruguay. E-mail: bbcast@fagro.edu.uy

<sup>2</sup>Universidade de São Paulo, ESALQ, Av. Pádua Dias, 11, Cx. Postal 9, Piracicaba, SP, Brasil.

## INTRODUCCIÓN

Las termitas subterráneas constituyen una de las más serias plagas en los países donde se cultiva la caña de azúcar, alcanzando importancia económica en Asia, Australia, Caribe y América del Sur (Pizano, 1995). Según ese autor, en el Brasil, estudios realizados por IAA/PLANALSUCAR, en 1985, indicaron un gasto de aproximadamente 150 toneladas de principio activo de productos clorados para el control de termitas en un área de más de 250.000 ha, en el Estado de São Paulo.

El género *Heterotermes* se ha mostrado como el más dañino para el cultivo, determinando la necesidad de control químico en áreas con infestación superior al 30% (Pizano *et al.*, 1990). El control de *H. tenuis*, la especie predominante en São Paulo, se dificulta porque viven en nidos subterráneos difusos, de difícil localización y que pueden contener grandes poblaciones.

Los productos más eficientes para el control de termitas subterráneas deben permanecer activos en el suelo por períodos prolongados, por ello el uso tradicional de termitocidas organoclorados. A partir de la prohibición de la fabricación, comercialización y uso de organoclorados en el Brasil, se produjo el desarrollo de nuevos productos y el empleo de trampas artificiales, las cuales están gradualmente substituyendo los métodos convencionales de muestreo, aumentando la eficiencia y la praticidad del control y disminuyendo los costos y los efectos negativos en el ambiente (Macedo *et al.*, 1995).

El uso de trampas atrayentes constituye una estrategia particularmente interesante porque se basa en el empleo de una pequeña cantidad de insecticida y necesita que sólo una proporción de la población entre en contacto con el agente tóxico para que se produzca su distribución entre los habitantes de la colonia (Delate *et al.*, 1995).

Su *et al.* (1987) sugirieron que la utilización de insecticidas no repelentes y de acción lenta (*slow acting*) es ideal, basada en la premisa de que una parte de la colonia puede ser contaminada y el efecto tóxico distribuido en la colonia a través de las interacciones sociales de las termitas subterráneas.

El empleo de hongos entomopatógenos en las trampas constituye una estrategia de introducción inoculativa, que busca la transmisión de la enfermedad por parte de los individuos que se alimentan en las trampas para el resto de la colonia, como fue observado por Kramm *et al.* (1982), en laboratorio. Según Almeida (1994), esa estrategia es favorecida por el comportamiento de *H. tenuis*, que no detecta

los conidios de algunos aislamientos de hongos entomopatógenos.

La asociación de hongos entomopatógenos con insecticidas selectivos en concentraciones subletales puede provocar un efecto sinérgico sobre la plaga. De esta forma, el uso de trampas atrayentes con entomopatógenos asociados a tóxicos compatibles puede viabilizar el empleo de estos microorganismos, haciendo que las aplicaciones sean más eficientes y económicas (Alves *et al.*, 1998).

Moino Júnior y Alves (1998) verificaron que el insecticida imidacloprid, en concentraciones subletales, alteró la capacidad de limpieza de *H. tenuis*, cuyos individuos presentaron, en el tegumento, mayor número de conidios de los hongos entomopatógenos inoculados.

Algunos extractos vegetales actúan lentamente, no presentando toxicidad aguda, como constatado para el aceite de nim en *Reticulitermes speratus* (Serit *et al.*, 1992). Ese modo de acción es apropiado para la estrategia de trampas atrayentes, en la cual el objetivo es una baja mortalidad de insectos que salen del nido en busca de forraje y una alta eficiencia de control en la colonia, si es posible, como consecuencia del efecto sinérgico entre el agente tóxico y los entomopatógenos utilizados en forma asociada.

En el presente trabajo se estudió el efecto asociado de derivados de meliáceas y cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre la termita subterránea *H. tenuis*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Efecto asociado de derivados de meliáceas y hongos entomopatógenos sobre *H. tenuis* en laboratorio

Los estudios para evaluar el efecto asociado de los derivados vegetales y los hongos entomopatógenos fueron conducidos en los laboratorios de Patología de Insectos y Plantas Insecticidas del Departamento de Entomología, Fitopatología y Zoología Agrícola de la Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil.

Los derivados vegetales incluidos en los diferentes bioensayos fueron: aceite de nim (1 y 2% v/v), Nimkol-L<sup>®3</sup> (0,2; 0,3 y 0,4% i.a. v/v), extracto de hojas de paraíso (*Melia azedarach*) (1 y 5% p/v), infusión de semillas de nim (*Azadirachta indica*) (5% p/v), extracto de frutos verdes de *Trichilia pallida* (5% p/v). Los referidos productos fue-

<sup>3</sup>Nimkol-L<sup>®</sup>: formulación comercial en base de extracto acuoso de hojas de nim (*Azadirachta indica*) de la empresa QUINABRA, Brasil.

ron adicionados en discos de cartón (5 cm de diámetro) por medio de inmersión en suspensión acuosa. En el tratamiento testigo, los discos de cartón fueron inmersos en agua destilada. Dos discos por parcela fueron dispuestos en placas de plástico de 6 cm de diámetro, con orificios para cambio de aire en la mitad superior.

Las suspensiones de conidios de los entomopatógenos fueron adicionadas a los discos de cartón por inmersión. En el primer ensayo conducido de esa forma, la adición de las suspensiones de conidios fue realizada dos horas después de la incorporación de los derivados vegetales (también por inmersión). En los tres bioensayos subsiguientes, la adición de las suspensiones (en concentraciones de  $10^7$  y  $10^8$  conidios/ml) se realizó uno, cinco y seis días después de la incorporación de los extractos, respectivamente. Para mantener la humedad, diariamente eran adicionadas dos a cuatro gotas de agua destilada en un cilindro de algodón de aproximadamente 0,5 cm de diámetro x 0,5 cm de largo, dentro de la caja plástica. La evaluación de la mortalidad fue realizada diariamente, retirándose de las placas los individuos muertos.

Los tratamientos consistieron en el factorial entomopatógenos x derivados vegetales, más un testigo tratado sólo con agua, en experimentos con diseño completamente al azar. Los tratamientos constaron de tres o cuatro repeticiones con 24 a 28 obreras y 1 ó 2 soldados de *H. tenuis* cada uno, dependiendo del bioensayo. Los resultados fueron sometidos a análisis de varianza y las medias comparadas por prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Para representación gráfica, fueron seleccionados los resultados del último día de evaluación de cada experimento y resultados relativos a períodos intermedios en los cuales ocurrieron diferencias en la rapidez de acción de los tratamientos.

### Efecto de Nimkol-L® y *M. anisopliae* (1037) sobre *H. tenuis* en condiciones de campo

El estudio del efecto asociado de Nimkol-L® con la cepa 1037 de *M. anisopliae* fue desarrollado en el campo de producción de caña de azúcar de la "Fazenda São José", municipio de Rio Claro (SP), perteneciente al Ingenio "São Joao", Araras (SP).

Inicialmente, en un área de 100 m x 200 m en un tablón del cultivo mantenido sin adición de productos fitosanitarios, fueron dispuestas trampas Termitrap®<sup>4</sup>, cada 10 m para detectar y monitorear focos de actividad de *H. tenuis*. Las trampas fueron identificadas con estacas y se

elaboró un mapa del lugar, indicando los focos con y sin presencia de individuos de la especie.

La recuperación y sustitución de trampas fue realizada 15 días después, evaluándose visualmente, en el laboratorio, la presencia de termitas. El número de insectos en las trampas recuperadas del campo fue estimado según tres categorías: 0, 250 a 500 y >500 individuos. Los tratamientos fueron instalados en los focos donde fueron recuperadas trampas con más de 500 termitas.

De los locales seleccionados fueron separadas muestras de 50 individuos para pruebas de antagonismo en laboratorio, con el objetivo de identificar cinco focos de infestación en el campo, presumiblemente pertenecientes a colonias diferentes. Según Andrews (1911), a pesar de existir excepciones, una de las acciones más claras de las termitas es atacar individuos de otras colonias. La intensidad de agresión parece estar bien desarrollada en los rinotermitidos, según Howick y Creffield (1980). Los individuos pertenecientes a dos grupos diferentes, cuando murieron dentro de las 24 horas posteriores a ser colocados en una misma placa, se consideraron como provenientes de colonias diferentes.

En los cinco focos seleccionados, pertenecientes, en teoría, a colonias diferentes, se dispusieron cinco tratamientos: 1) testigo, 2) Nimkol-L® 0,3% i.a. (v/v), 3) *M. anisopliae* cepa 1037, 4) Nimkol-L® 0,3% i.a. + *M. anisopliae* cepa 1037, 5) *M. anisopliae* cepa 1037 + fipronil (Regent® 800 WG) 0,003%. Este último tratamiento fue establecido como padrón de control, ya que fue el insecticida que presentó el mejor control de *H. tenuis* entre varios productos evaluados por Macedo *et al.* (1997). Nimkol-L® fue seleccionado en función de los resultados obtenidos en los ensayos de asociación con los entomopatógenos en laboratorio.

En cada foco fueron dispuestos cinco pares de trampas, una previamente tratada con el(los) producto(s) y una no tratada (blanca) en cada par. El arreglo, en el campo, fue un par de trampas central y cuatro pares equidistantes del central, todos separados 10 m entre sí.

Nimkol-L® y fipronil fueron impregnados en las trampas por inmersión, durante 90 segundos, en 2,5 litros de suspensión, dejándose escurrir el excedente y dejando las trampas secar al aire, en laboratorio. Los hongos fueron impregnados con pincel 24 horas después de la adición de los productos, dentro de una cámara de flujo laminar vertical, en la dosis de aproximadamente 0,5 g de conidios puros por trampa.

Todas las trampas fueron monitoreadas y sustituidas a los 15, 35, 60, 85, 110 y 130 días. El número de insectos

<sup>4</sup>Termitrap®: trampas de cartón corrugado desarrolladas en el Departamento de Patología de Insectos de la Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Brasil.

obtenidos en cada trampa fue estimado por peso. Para ello, fueron pesadas alícuotas de números conocidos de termitas. Después de pesado, el total de insectos de cada trampa fue mantenido en placas de Petri (15 cm de diámetro) en laboratorio durante seis días, para evaluación de la mortalidad residual. En cada placa, se dispusieron discos de cartón no tratado como fuente de alimento y un cilindro de algodón (0,5 x 0,5 cm) para adición diaria de agua destilada. Al término de ese período, la mortalidad fue evaluada por peso y por estimación de número, a través del peso de alícuotas de individuos muertos y vivos. Los insectos colectados en el último muestreo fueron mantenidos en las placas en el laboratorio hasta la muerte del total de los individuos de todos los tratamientos, con el objetivo de evaluar el tiempo máximo de supervivencia en estas condiciones.

Los resultados fueron analizados solamente de forma descriptiva, porque fue establecida sólo una repetición por tratamiento.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

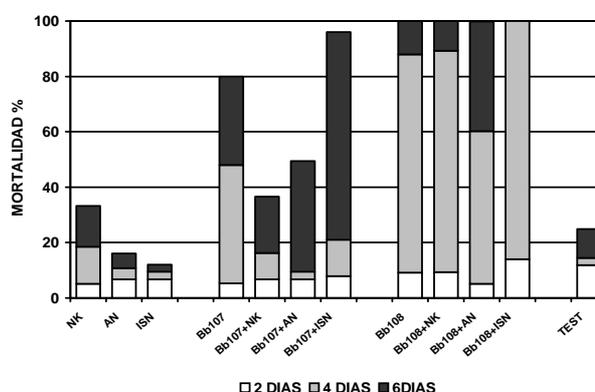
### Efecto asociado de derivados de meliáceas y hongos entomopatógenos sobre *H. tenuis* en laboratorio

La inmersión previa (2 horas) de los discos de cartón en los derivados de nim (Nimkol-L®, aceite e infusión de semillas) tuvo, en general, un efecto negativo sobre el efecto de las suspensiones de conidios de la cepa 634 de *B. bassiana* sobre el insecto. Este efecto fue significativo en el 4° día de evaluación para los tres derivados y la concentración menor de *B. bassiana* 634 ( $10^7$  conidios/ml), y para el aceite de nim en la concentración mayor del entomopatógeno ( $5 \times 10^8$  conidios/ml) (Figura 1).

Ese efecto negativo de los derivados vegetales también fue observado en la asociación de los mismos con la suspensión de *M. anisopliae* (1037) en la concentración de  $10^8$  conidios/ml (Figura 2).

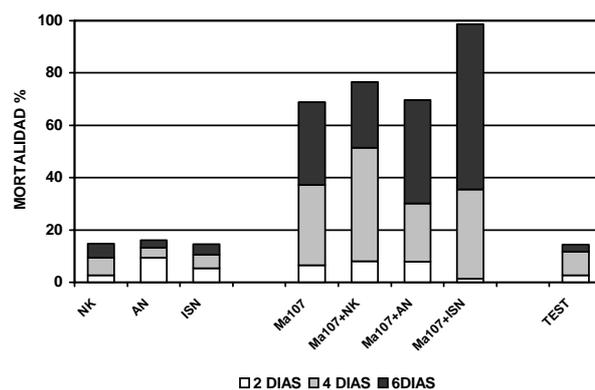
Si bien los efectos de la asociación de los derivados de nim con ambos entomopatógenos no es estrictamente comparable en las figuras 1 y 2, en la concentración menor ( $10^7$  conidios/ml) se observó una mayor mortalidad de los insectos por la cepa 1037 de *Metarhizium anisopliae* que con la cepa 634 de *Beauveria bassiana*. La cepa 634 de *B. bassiana* fue seleccionada como una de las más eficientes para el control de esta especie por Almeida *et al.* (1997) mientras que la cepa 1037 de *M. anisopliae* se destacó por la alta patogenicidad para *H. tenuis* según Lopes<sup>5</sup>.

<sup>5</sup>LOPES, R. B., ESALQ/USP, comunicación personal, 1999.



**Figura 1.** Mortalidad acumulada de *Heterotermes tenuis* alimentado con discos de cartón tratados con derivados de meliáceas y conidios de *Beauveria bassiana* (634) a los 2, 4 y 6 días.

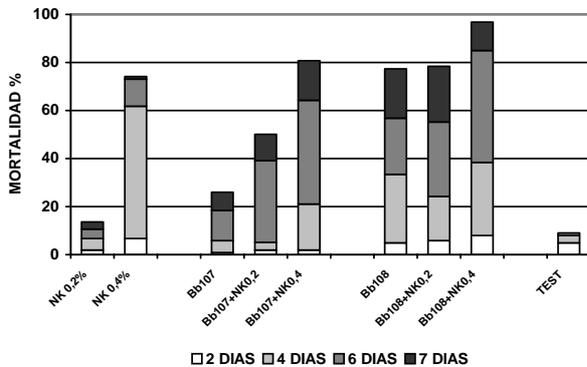
NK = Nimkol-L® 0,2% i.a.; AN = Aceite de nim 5%; ISN = Infusión de semillas de nim 5%; Bb107 = *Beauveria bassiana* 634  $10^7$  conidios/ml; Bb108 = *B. bassiana* 634  $5 \times 10^8$  conidios/ml; TEST = Testigo.



**Figura 2.** Mortalidad acumulada de *Heterotermes tenuis* alimentado con discos de cartón tratados con derivados de meliáceas y conidios de *Metarhizium anisopliae* (1037) a los 2, 4 y 6 días.

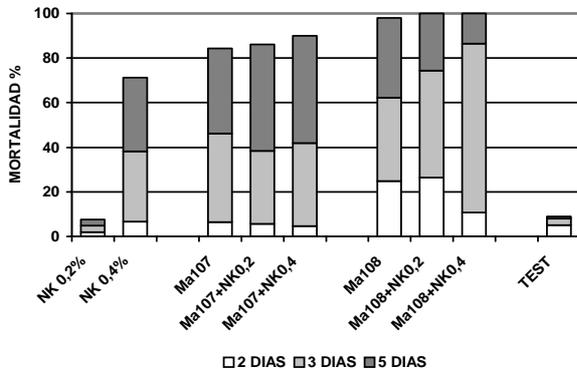
NK = Nimkol-L® 0,2% i.a.; AN = Aceite de nim 5%; ISN = Infusión de semillas de nim 5%; Ma107 = *Metarhizium anisopliae* 1037  $10^7$  conidios/ml; TEST = Testigo.

El efecto fungitóxico de Nimkol-L® sobre *M. anisopliae* y *B. bassiana* fue evitado, inoculándose los conidios transcurridas 24 horas de la impregnación del referido producto en los discos de cartón. Con ese procedimiento, se constató efecto positivo de la asociación del extracto con los entomopatógenos. La asociación de Nimkol-L®, en las dos concentraciones evaluadas (0,2 y 0,4% i.a.), mejoró la eficiencia de la cepa 634 de *B. bassiana*, principalmente en la menor concentración utilizada ( $10^7$  conidios/ml) (Figura 3). El efecto positivo de la asociación fue significativo a los 5, 6 y 7 días de evaluación.



**Figura 3.** Mortalidad acumulada de *Heterotermes tenuis* alimentado con discos de cartón tratados con Nimkol-L® y conidios de *Beauveria bassiana* (634) a los 2, 4 6 y 7 días. NK = Nimkol-L®; Bb107 = *Beauveria bassiana* 634 10<sup>7</sup> conidios/ml; Bb108 = *B. Bassiana* 634 10<sup>8</sup> conidios/ml; TEST = Testigo.

Una tendencia similar fue observada a los 3 y 4 días de evaluación para la cepa 1037 de *M. anisopliae* en la mayor concentración (10<sup>8</sup> conidios/ml) y al 5° y 6° día de evaluación en la menor concentración (10<sup>7</sup> conidios/ml) (Figura 4).

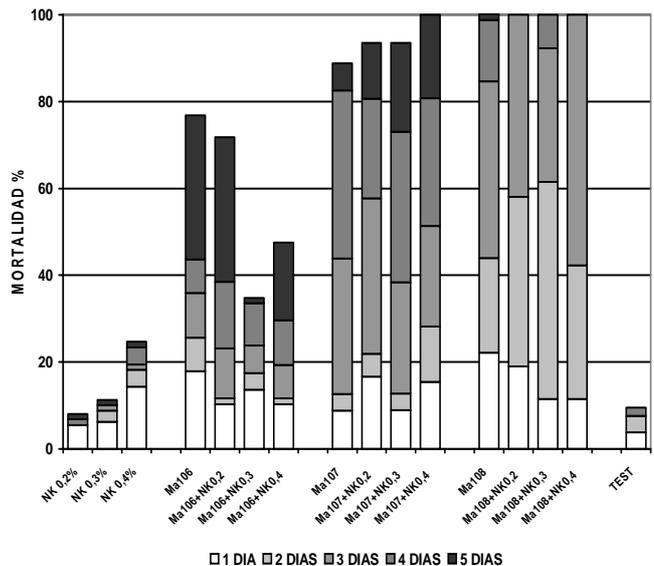


**Figura 4.** Mortalidad acumulada de *Heterotermes tenuis* alimentado con discos de cartón tratados con Nimkol-L® y conidios de *Metarhizium anisopliae* (1037) a los 2, 3 y 5 días.

NK = Nimkol-L®; Ma107 = *Metarhizium anisopliae* 1037 10<sup>7</sup> conidios/ml; Ma108 = *M. anisopliae* 1037 10<sup>8</sup> conidios/ml; TEST = Testigo.

Nuevamente, se determinó mayor eficiencia de la cepa 1037 de *M. anisopliae* que de la cepa 634 de *B. bassiana*, en relación a la mortalidad de *H. tenuis*. La asociación con los derivados de nim indicó una tendencia general a la mayor compatibilidad de la cepa 634 de *B. bassiana* en comparación a la cepa 1037 de *M. anisopliae*, hecho que concuerda con los resultados obtenidos en ensayos de compatibilidad *in vitro* (Castiglioni & Vendramim, 2003a).

Cuando se evaluó la asociación de Nimkol-L® y la cepa 1037 de *M. anisopliae*, en diferentes concentraciones, se observó una respuesta dependiente de la concentración de los componentes de la asociación. Nimkol-L® provocó un efecto inhibitorio significativo sobre el entomopatógeno en la concentración de 1x10<sup>6</sup> conidios/ml. El efecto, aunque no significativo, fue positivo cuando la asociación con Nimkol-L® fue realizada con suspensiones de conidios de mayores concentraciones. El entomopatógeno, en la concentración de 10<sup>7</sup> conidios/ml, cuando fue asociado a Nimkol-L®, tendió a provocar mayor mortalidad de *H. tenuis*. En la concentración de 10<sup>8</sup> conidios/ml, el entomopatógeno solo o asociado a las diferentes concentraciones de Nimkol-L® provocó mortalidad de 100% de las termitas. Sin embargo, se observó la tendencia de alcanzar esa mortalidad total antes en el tiempo, en los tratamientos del entomopatógeno asociado a Nimkol-L® (Figura 5).



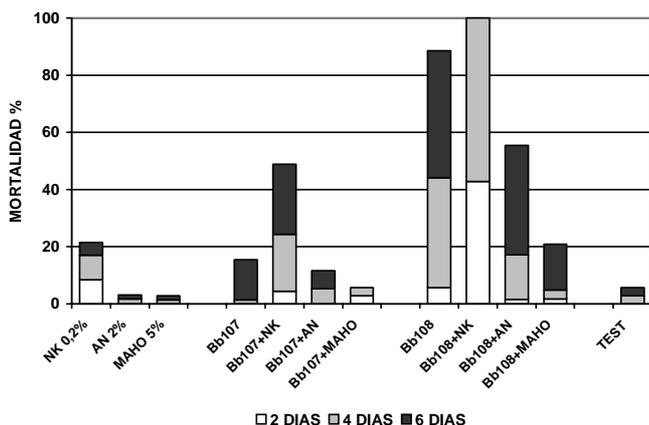
**Figura 5.** Mortalidad acumulada de *Heterotermes tenuis* alimentado con discos de cartón tratados con Nimkol-L® y conidios de *Metarhizium anisopliae* (1037) en el período de cinco días.

NK = Nimkol-L®; Ma106 = *Metarhizium anisopliae* 1037 10<sup>6</sup> conidios/ml; Ma107 = *M. anisopliae* 1037 10<sup>7</sup> conidios/ml; Ma108 = *M. anisopliae* 1037 10<sup>8</sup> conidios/ml; TEST = Testigo.

La adición de los entomopatógenos seis días después de que los insectos fueron colocados en las placas con los discos de cartón tratados con derivados de nim y paraíso, mostró interacción entre tratamientos. En la mortalidad observada desde la adición de los derivados y presentada

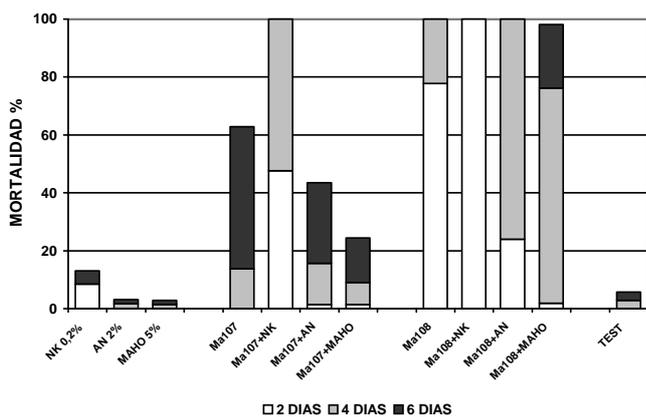
a partir de la adición de los entomopatógenos (Figuras 6 y 7), se determinó acción positiva de la asociación de éstos con Nimkol-L® y negativa con aceite de nim y extracto acuoso de hojas de *M. azedarach*.

Debido a que los tratamientos Nimkol-L®, *M. anisopliae* (1037) y *B. bassiana* (634) habían alcanzado niveles de mortalidad diferentes al momento de adición de los hongos,



**Figura 6.** Mortalidad acumulada de *Heterotermes tenuis* a los 2, 4 y 6 días de alimentación con discos de cartón tratados con derivados vegetales o agua destilada y suspensiones de conidios de *Beauveria bassiana* (634).

Nk = Nimkol-L®; AN = Aceite de nim; MAHO = Extracto acuoso de hojas de *Melia azedarach*; Bb107 = *Beauveria bassiana* 634  $10^7$  conidios/ml; Bb108 = *B. bassiana* 634  $10^8$  conidios/ml; TEST. = Testigo.



**Figura 7.** Mortalidad acumulada de *Heterotermes tenuis* a los 2, 4 y 6 días de alimentación con discos de cartón tratados con derivados vegetales o agua destilada y suspensiones de conidios de *Metarhizium anisopliae* (1037).

Nk = Nimkol-L®; AN = Aceite de nim; MAHO = Extracto acuoso de hojas de *Melia azedarach*; Ma107 = *Metarhizium anisopliae* 1037  $10^7$  conidios/ml; Ma108 = *M. anisopliae* 634  $10^8$  conidios/ml; TEST. = Testigo.

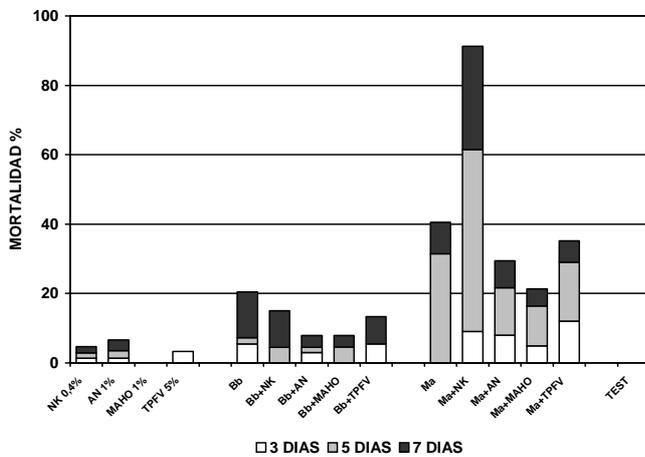
no fue posible identificar si el aumento de mortalidad observado posteriormente corresponde a un resultado de aditividad o sinergismo. Sin embargo, la magnitud de las diferencias sugiere un efecto aditivo. La mortalidad provocada por la asociación del hongo y Nimkol-L® fue significativamente mayor que la acción de la cepa 634 de *B. bassiana* en los tres primeros días de evaluación para la concentración de  $10^7$  conidios/ml y en los últimos cuatro para la concentración de  $10^8$  conidios/ml. Mientras tanto, para la cepa 1037 de *M. anisopliae*, la asociación del hongo con Nimkol-L® resultó significativamente positiva al primer día de evaluación, para la concentración de  $10^7$  conidios/ml y en los tres primeros días de evaluación para la concentración de  $10^8$  conidios/ml.

La asociación de los hongos con el aceite de nim y con el extracto acuoso de hojas de *M. azedarach* fue, en general, negativa. En todos los casos, la mortalidad de *H. tenuis* provocada por los hongos, en forma independiente, fue igual o mayor que la provocada por su asociación con esos derivados. El efecto negativo fue estadísticamente significativo para *B. bassiana* (634) en la concentración mayor ( $10^8$  conidios/ml), al último día de evaluación. Para *M. anisopliae* (1037), el efecto negativo de la asociación con esos derivados vegetales también fue constatado en la mayor concentración de la suspensión ( $10^8$  conidios/ml) y fue significativo al 2° día de evaluación en la asociación con el aceite de nim y al 2° y 3° día de evaluación para el extracto de hojas de *M. azedarach*.

Para intentar identificar sinergismo en la asociación entre los entomopatógenos y los derivados vegetales, se evaluó la mortalidad adicional sobre los individuos sobrevivientes después de seis días de alimentación con discos tratados con derivados vegetales, a partir del momento de la adición de los entomopatógenos (Figura 8).

Fueron verificadas las tendencias generales de los ensayos previos, ya que solamente la asociación de los entomopatógenos con Nimkol-L® resultó positiva. Esa asociación resultó significativa solamente para *M. anisopliae* (1037) y en el último día de evaluación. El aceite de nim (1%), el extracto acuoso de hojas de *M. azedarach* (1%) y el extracto acuoso de frutos verdes de *T. pallida* (5%) no adicionaron ventajas a la eficiencia de los patógenos, sino que se confirmó la tendencia a la asociación negativa de estos derivados con los entomopatógenos, aunque el efecto no fue significativo.

La asociación positiva Nimkol-L® y la cepa 1037 de *M. anisopliae* indica la ocurrencia de sinergismo, ya que el efecto de entomopatógeno y extracto asociados tendió a ser mayor que la sumatoria de los efectos de ambos, empleados en forma aislada (Figura 8).



**Figura 8.** Mortalidad de *Heterotermes tenuis* a partir de la adición de las suspensiones de conidios de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, después de seis días de alimentación con discos de cartón tratados con derivados vegetales o agua destilada.

NK = Nimkol-L® 0,4% (v/v); AN = Aceite de nim 1% (v/v); MAHO = Extracto acuoso de hojas de *Melia azedarach* 1% (p/v); TPFV = Extracto acuoso de frutos verdes de *Trichilia pallida* 5% (pv); Bb = *Beauveria bassiana* 634  $5 \times 10^7$  conidios/ml; Ma = *Metarhizium anisopliae* 1037  $5 \times 10^7$  conidios/ml; TEST = Testigo.

En el conjunto de ensayos realizados en laboratorio, los derivados vegetales, en las concentraciones evaluadas, causaron índices de mortalidad menores a 30% en *H. tenuis*, excepto Nimkol-L® 0,4% i.a., que provocó aproximadamente 70% de mortalidad en uno de los ensayos. Esos bajos niveles de mortalidad, sin embargo, podrían representar una situación de estrés de los insectos, favorable a una mayor eficiencia de los entomopatógenos, al utilizarlos en forma asociada.

Moino Júnior & Alves (1998) observaron alteraciones de los hábitos de limpieza de *H. tenuis*, cuando fueron afectados por el insecticida imidacloprid en concentraciones subletales. Según el autor, cuando los insectos fueron contaminados por el insecticida, hubo disminución de la eficiencia de la limpieza, para eliminación del inóculo de los patógenos, constatada por el mayor número de conidios presentes en la superficie del cuerpo.

No obstante, el comportamiento de limpieza puede representar una fuente de infección de los individuos que la efectúan, como fue demostrado por Kramm *et al.* (1982). Estos autores indicaron que termitas del género *Reticulitermes* cubiertas con conidios de *M. anisopliae* fueron limpiadas más exhaustivamente que las no expuestas al hongo. La observación directa mostró que los insectos que efectuaban la limpieza ingirieron conidios, ocurriendo una alta tasa de mortalidad entre ellos.

Kramm & West (1982), por su parte, demostraron que numerosos conidios mantienen la viabilidad después del pasaje por el tracto digestivo de las termitas subterráneas. Los autores destacan la importancia epizootiológica de ese hecho.

En el presente estudio, la acción de los derivados vegetales fue mayoritariamente negativa sobre los entomopatógenos. Esa acción inhibitoria dependió del derivado vegetal, de la concentración de ambos componentes de la asociación (derivado vegetal y cepa) y del tiempo de espera entre la aplicación de los derivados vegetales y de las suspensiones de conidios de los entomopatógenos.

La selección de la concentración del extracto vegetal y del tiempo de espera entre la aplicación de ambos productos en los discos de cartón permitió solucionar problemas de inhibición de los entomopatógenos y observar asociaciones que indicaron aditividad y sinergismo entre ambos componentes de la asociación, en el caso de Nimkol-L®.

La cepa 1037 de *M. anisopliae* fue más patógena para *H. tenuis* que la cepa 634 de *B. bassiana*. Como contrapartida, la cepa 634 (*B. bassiana*) fue comparativamente menos sensible a la acción inhibitoria de los derivados vegetales, para el conjunto de experimentos realizados. Moino Júnior (1998) determinó que la cepa E9 de *M. anisopliae* también fue más eficiente para *H. tenuis* que la cepa 634 de *B. bassiana*. El autor verificó, para la cepa E9, adelantamiento de las fases de penetración, colonización y conidiogénesis, que resultaron en una mayor rapidez en la mortalidad del insecto. En forma adicional, el autor observó que esa cepa de *M. anisopliae* fue más compatible con los insecticidas fipronil e imidacloprid que la cepa 634 de *B. bassiana*.

### Efecto de Nimkol-L® y hongos entomopatógenos sobre *Heterotermes tenuis* en condiciones de campo

La recuperación secuencial de trampas del área de muestreo indicó que hubo una tendencia al aumento del número de trampas testigo con presencia de *H. tenuis* a lo largo del período de evaluación. Esa tendencia fue observada también en las trampas blancas de los puntos de muestreo del tratamiento Nimkol-L® + *M. anisopliae* 1037 y fipronil + *M. anisopliae* 1037. En los demás lugares de muestreo la tendencia del número de trampas con presencia de termitas fue de estabilidad o reducción (Figura 9).

El número medio de individuos capturados por trampa en cada período de muestreo disminuyó sólo en los puntos de muestreo correspondientes a los tratamientos con Nimkol-L® y *M. anisopliae* 1037. Para el tratamiento con el

hongo esa tendencia fue también confirmada en las trampas blancas (Figura 9).

El tratamiento fipronil + *M. anisopliae* 1037 fue el único que presentó una evolución ascendente del número total y medio de individuos en las trampas blancas correspondientes a ese punto de muestreo. A lo largo del período de evaluación no se detectó la presencia de termitas en las trampas tratadas con esa asociación de productos. Ello podría indicar dos alternativas: el producto, en la concentración utilizada, fue repelente para el insecto o bien la eficiencia de control en la trampa fue lo suficientemente alta como para no permitir supervivencia de individuos en ellas. Sin embargo, la primera de las opciones parece ser más probable ya que no fueron detectadas señales de daño en las trampas o señales de la presencia del insecto en ningún período. Por otro lado Macedo<sup>6</sup> relató la ocurrencia de repelencia de *H. tenuis* para fipronil en trampas en el campo.

En el tratamiento de asociación del entomopatógeno con Nimkol-L®, el número medio de termitas por trampa (Figura 9) tendió a aumentar en la primera mitad del período de evaluación, aproximadamente, y a disminuir en los últimos períodos de muestreo.

En términos generales, en todos los tratamientos se observó mayor captura de individuos en las trampas blancas que en las tratadas con los productos, a su lado. Las observaciones realizadas en el laboratorio con los individuos capturados en las trampas permitieron evaluar el efecto residual de los productos utilizados en los puntos de muestreo. En términos generales, se observó una mayor mortalidad de los individuos provenientes de trampas tratadas con los diferentes productos que aquellos provenientes de las trampas blancas correspondientes a cada tratamiento, después de seis días en el laboratorio (Figura 10).

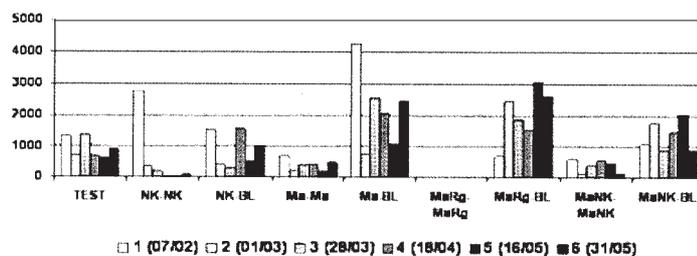
La mortalidad de los individuos provenientes de las trampas blancas del tratamiento fipronil + *M. anisopliae* 1037 fue semejante a la mortalidad de los provenientes del

punto de muestreo donde se localizó el testigo (12,8% y 10,1%, respectivamente). La mortalidad de los individuos provenientes de las trampas blancas del punto de muestreo de los tratamientos con *M. anisopliae* 1037, con Nimkol-L® y la asociación de ambos fue aproximadamente el doble que la constatada en el testigo (21,7%, 24,1% y 20,1%, respectivamente). Finalmente, los individuos provenientes de las trampas en que se aplicaron esos tratamientos alcanzaron una mortalidad entre cinco y seis veces más alta que la mortalidad en el testigo (60,8%, 52,4% y 51,0%, respectivamente).

No obstante, no es posible concluir que haya ocurrido eficiencia de control para alguno de los tratamientos en el campo. El tamaño de las colonias era desconocido, no estimado y los tratamientos fueron establecidos para monitorear las tendencias del número de individuos capturados. No es posible conocer el número de trampas que sería necesario disponer en el campo para intentar eliminar la población correspondiente a cada colonia teórica que representó cada punto de muestreo. Según Almeida (1998), sin embargo, el método de control con trampas de acción lenta, utilizando fipronil 0,003% asociado al hongo *B. bassiana* consiguió reducir la población de *H. tenuis* en caña de azúcar, en cualquier época del año.

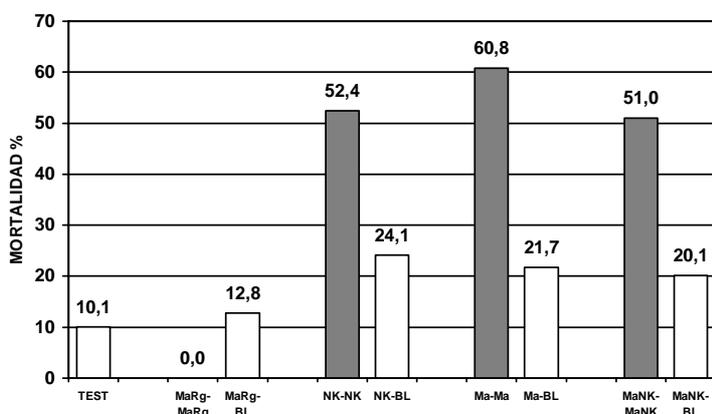
La supervivencia de los individuos capturados en el último muestreo confirmó el efecto residual de los tratamientos de las trampas. Los insectos provenientes de las trampas blancas del tratamiento fipronil + *M. anisopliae* 1037 sobrevivieron un tiempo semejante al de los insectos provenientes de las trampas del testigo (Figura 11).

También los insectos capturados en las trampas blancas de los tratamientos Nimkol-L®, *M. anisopliae* 1037 y *M. anisopliae* 1037 + Nimkol-L® presentaron una supervivencia semejante a la de las termitas provenientes del testigo, pero en los tratamientos con el extracto vegetal hubo menor tiempo de supervivencia. Los menores tiempos de supervivencia en el laboratorio fueron observados en los



**Figura 9.** Número medio de individuos de *Heterotermes tenuis* por trampa, capturados en las trampas tratadas y blancas de referencia correspondientes a los tratamientos, en seis fechas de muestreo. TEST = Testigo; NK-NK = Trampas con Nimkol-L®; NK-BL = Trampas blancas del tratamiento Nimkol-L®; Ma-Ma = Trampas con *Metarhizium anisopliae* 1037; Ma-BL = Trampas blancas del tratamiento *M. anisopliae* 1037; MaRg-MaRg = Trampas con *M. anisopliae* 1037 + Regent (Fipronil); MaRg-BL = Trampas blancas del tratamiento *M. anisopliae* 1037 + Regent; MaNK-MaNK = Trampas con *M. anisopliae* 1037 + Nimkol-L®; MaNK-BL = Trampas blancas del tratamiento *M. anisopliae* 1037 + Nimkol-L®.

<sup>6</sup>MACEDO, N., ESALQ/USP, comunicación personal, 2001.

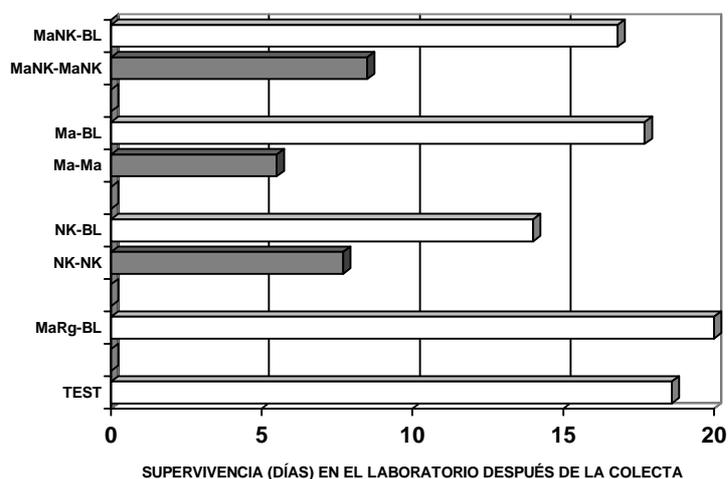


**Figura 10.** Mortalidad, en el laboratorio, de *Heterotermes tenuis* provenientes de las trampas del campo, según tratamiento, después de seis días de alimentación en discos de cartón no tratados (media de seis muestreos).

TEST. = Testigo; NK-NK = Trampas con Nimkol-L<sup>®</sup>; NK-BL = Trampas blancas del tratamiento Nimkol-L<sup>®</sup>; Ma-Ma = Trampas con *Metarhizium anisopliae* 1037; Ma-BL = Trampas blancas del tratamiento *M. anisopliae* 1037; MaRg-MaRg = Trampas con *M. anisopliae* 1037 + fipronil (Regent<sup>®</sup>); MaRg-BL = Trampas blancas del tratamiento *M. anisopliae* 1037 + fipronil; MaNK-MaNK = Trampas con *M. anisopliae* 1037 + Nimkol-L<sup>®</sup>; MaNK-BL = Trampas blancas del tratamiento *M. anisopliae* 1037 + Nimkol-L<sup>®</sup>.

**Figura 11.** Supervivencia (días) de *Heterotermes tenuis* en el laboratorio después de la colecta de las trampas del campo, según tratamiento, en la última fecha de muestreo.

TEST. = Testigo; NK-NK = Trampas con Nimkol-L<sup>®</sup>; NK-BL = Trampas blancas del tratamiento Nimkol-L<sup>®</sup>; Ma-Ma = Trampas con *Metarhizium anisopliae* 1037; Ma-BL = Trampas blancas del tratamiento *M. anisopliae* 1037; MaRg-MaRg = Trampas con *M. anisopliae* 1037 + fipronil (Regent<sup>®</sup>); MaRg-BL = Trampas blancas del tratamiento *M. anisopliae* 1037 + fipronil; MaNK-MaNK = Trampas con *M. anisopliae* 1037 + Nimkol-L<sup>®</sup>; MaNK-BL = Trampas blancas del tratamiento *M. anisopliae* 1037 + Nimkol-L<sup>®</sup>.



individuos provenientes de las trampas tratadas con *M. anisopliae* 1037 + Nimkol-L<sup>®</sup>, Nimkol-L<sup>®</sup> y *M. anisopliae* 1037, en orden decreciente (Figura 11).

La mortalidad observada en el laboratorio, asumida como efecto residual de los tratamientos, permite verificar una acción de la cepa 1037 de *M. anisopliae* y de su asociación con Nimkol-L<sup>®</sup> semejante a la observada en los ensayos de laboratorio. Aunque menores que los observados en laboratorio, los niveles de mortalidad residual de los individuos traídos del campo son promisorios, considerando que, según Hall (1994), frecuentemente los resultados del control microbiano obtenidos en laboratorio no se comprueban en ensayos de campo.

La mortalidad de los individuos capturados en las trampas blancas de los tratamientos sugiere también la acción residual de los productos utilizados y que hubo visita de los insectos a las trampas tratadas y no tratadas.

La acción aislada de Nimkol-L<sup>®</sup> fue mejor que la esperada en función de los resultados de laboratorio con concentraciones variables entre 0,2 y 0,4% i.a. y por la ausencia de transferencia del producto entre individuos (Castiglioni y Vendramim, 2003b).

## CONCLUSIONES

La acción patogénica de la cepa 1037 de *M. anisopliae* es mayor sobre *H. tenuis* que la de la cepa 634 de *B. bassiana*.

La asociación de los hongos entomopatógenos con el extracto acuoso de hojas de nim Nimkol-L<sup>®</sup>, cuando la aplicación de la suspensión de conidios es realizada como mínimo 24 horas después de la aplicación del derivado vegetal, es más eficiente que la acción de ambos por separado.

Los demás derivados vegetales evaluados, en general, afectan la eficiencia biológica de los entomopatógenos en relación a *H. tenuis*, por lo que no son apropiados para su uso asociado. Particularmente, el aceite de nim y el extracto de hojas de *M. azedarach* reducen la eficiencia biológica de los entomopatógenos en relación a este insecto.

Nimkol-L<sup>®</sup>, *M. anisopliae* (1037) y la asociación de ambos, afectan la supervivencia de *H. tenuis* en condiciones de campo. La mortalidad, en laboratorio, de las termitas capturadas en trampas con estos tratamientos, sugiere su adecuación para empleo en el control de *H. tenuis*, mediante la estrategia de introducción inoculativa.

## BIBLIOGRAFÍA

- ALMEIDA, J.E.M. 1994. Avaliação de fungos entomopatogênicos visando ao controle do cupim subterrâneo *Heterotermes tenuis* (Hagen, 1858) (Isoptera, Rhinotermitidae). Piracicaba. 105p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- ALMEIDA, J.E.M. 1998. Controle de *Heterotermes tenuis* (Isoptera, Rhinotermitidae) com isca associada a inseticidas e/ou *Beauveria bassiana* em cana-de-açúcar. Piracicaba. 131p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- ALMEIDA, J.E.M.; ALVES, S.B. & PEREIRA, R.M. 1997. Selection of *Beauveria* spp. isolates for control of the termite *Heterotermes tenuis* (Hagen, 1858). *Journal of Applied Entomology*, 121: 539-543.
- ALVES, S.B.; MOINO Jr., A. & ALMEIDA, J.E.M. 1998. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In: ALVES, S.B. (Ed.) Controle microbiano de insetos. 2.ed. Piracicaba: FEALQ. cap.8, p.217-238.
- ANDREWS, E.A. 1911. Observations on termites in Jamaica. *Journal of Animal Behavior*, 1: 193-228.
- CASTIGLIONI, E. & VENDRAMIM, J.D. 2003a. Compatibilidad de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* con Nimkol-L<sup>®</sup> para el combate de *Heterotermes tenuis*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* (Costa Rica), 69:38-44.
- CASTIGLIONI, E. & VENDRAMIM, J.D. 2003b. Evaluación de extractos de meliáceas para el control de *Heterotermes tenuis*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* (Costa Rica), 68:34-40.
- DELATE, K.M.; GRACE, J.K. & TOME, C.H.M. 1995. Potential use of pathogenic fungi in baits to control the Formosan Subterranean Termite (Isopt., Rhinotermitidae). *Journal of Applied Entomology*, 119: 429-433.
- HALL, D.W. 1994. Potential for microbial control of subterranean termites. In: ROSEN, D.; BENETT, F.D.; CAPINERA, J.L. (Ed.). *Pest management in the subtropics: biological control; a Florida perspective*. Andover: Intercept. cap. 20, p.381-393.
- HOWICK, C.D. & CREFFIELD, J.W. 1980. Intraespecific antagonism in *Coptotermes acinaciformis* (Froggat) (Isoptera:Rhinotermitidae). *Bulletin of Entomological Research*, 70: 17-23.
- KRAMM, K.R.; WEST, D.F. & ROCKENBACH, P.G. 1982. Termite pathogens: transfer of the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* between *Reticulitermes* sp. termites. *Journal of Invertebrate Pathology*, 40: 1-6.
- KRAMM, K.R. & WEST, D.F. 1982. Termite pathogens: effects of ingested *Metarhizium*, *Beauveria*, and *Gliocladium* conidia on worker termites (*Reticulitermes* sp.). *Journal of Invertebrate Pathology*, 40: 7-11.
- MACEDO, N.; BOTELHO, P.S.M. & CAMPOS, M.B.S. 1995. A grande praga dos canaviais: 1.Cupins em cana-de-açúcar: como e quando controlar. *Álcool & Açúcar* 78:32-36.
- MOINO JUNIOR, A. 1998. Fatores que afetam a eficiência de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* no controle de *Heterotermes tenuis* (Isoptera, Rhinotermitidae). Piracicaba. 133p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- MOINO JUNIOR., A. & ALVES, S.B. 1998. Efeito de imidacloprid e fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen). *Anais da Sociedade Entomológica de Brasil*, 27: 611-619.
- PIZANO, M.A. 1995. Controle de cupins de cana-de-açúcar. In: BERTI FILHO, E.; FONTES, L.R. (Ed.) *Alguns aspectos atuais da biologia e controle de cupins*. Piracicaba, FEALQ. p.103-114.
- PIZANO, M.A.; MACEDO, N. & BOTELHO, P. S. M. 1990. Racionalização no controle de cupins subterrâneos em cana-de-açúcar. *Álcool & açúcar*, 10(53): 26-27.
- SERIT, M.; ISHIDA, M.; NAKATA, K.; KIM, M. & TAKAHASHI, S. 1992. Antifeeding potency of neem (*Azadirachta indica*) extractives and limonoids against termite (*Reticulitermes speratus*). *Journal of Pesticide Science*, 17: 267-273.
- SU, N.Y.; TAMASHIRO, M. & HAVERTY, M.I. 1987. Characterization of slow-acting insecticides for the remedial control of the Formosan Subterranean Termite (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Economic Entomology*, 80: 1-4.