

LUIS EDUARDO PONTES STEFANELLI

CONTROLE BIOLÓGICO MICROBIANO: *Beauveria bassiana* E *Trichoderma harzianum* EM *Atta sexdens rubropilosa*, E *Metarhizium rileyi* EM *Spodoptera litura*

Botucatu

2022

LUIS EDUARDO PONTES STEFANELLI

CONTROLE BIOLÓGICO MICROBIANO: *Beauveria bassiana* E *Trichoderma harzianum* EM *Atta sexdens rubropilosa*, E *Metarhizium rileyi* EM *Spodoptera litura*

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Proteção de Plantas)

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Forti

Botucatu

2022

S816c Stefanelli, Luis Eduardo Pontes

 Controle biológico microbiano: *Beauveria bassiana* e
 Trichoderma harzianum em *Atta sexdens rubropilosa*, e
 Metarhizium rileyi em *Spodoptera litura* / Luis Eduardo Pontes
 Stefanelli. -- Botucatu, 2022

 109 p. : il., tabs., fotos

 Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
 Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu

 Orientador: Luiz Carlos Forti

 1. Entomologia agrícola. 2. Controle biológico. 3. Formigas
 cortadeiras. 4. Lagarta do tabaco. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca
da Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo
autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

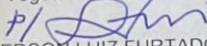
TÍTULO DA TESE: Controle biológico microbiano: *Beauveria bassiana* e *Trichoderma harzianum* em *Atta sexdens rubropilosa*, e *Metarhizium rileyi* em *Spodoptera litura*

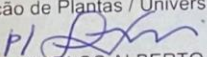
AUTOR: LUIS EDUARDO PONTES STEFANELLI

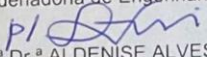
ORIENTADOR: LUIZ CARLOS FORTI

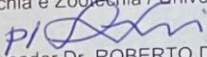
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA (PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. LUIZ CARLOS FORTI (Participação Virtual)
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu UNESP


Prof. Dr. EDSON LUIZ FURTADO (Participação Virtual)
Proteção de Plantas / Universidade Estadual Paulista - câmpus Botucatu


Prof. Dr. CARLOS ALBERTO OLIVEIRA DE MATOS (Participação Virtual)
Coordenadoria de Engenharia Industrial Madeireira / Campus de Itapeva - Unesp


Prof.^a Dr.^a ALDENISE ALVES MOREIRA (Participação Virtual)
Fitotecnia e Zootecnia / Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia


Pesquisador Dr. ROBERTO DA SILVA CAMARGO (Participação Virtual)
Entomologia Agrícola /

Botucatu, 08 de junho de 2022

A todos que na pandemia perderam amigos ou familiares, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de concluir estes estudos;

Aos meus pais, Anderson e Joara, pelo amor e apoio na minha vida, sem eles essa realização não seria possível, e ao meu irmão Thiago, também por todo incentivo;

À minha namorada Caroline, por toda paciência, amor, compreensão e carinho;

À Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrônomicas – Campus de Botucatu que tornou possível a realização desse projeto;

Aos meus orientadores professores Dr. Luiz Carlos Forti e Dra. Madoka Nakai por toda orientação, amizade, apoio, paciência, e conhecimento oferecidos durante o período do doutorado;

Aos Docentes do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Proteção de Plantas, e Seção de Pós-Graduação por toda a orientação, ensino e convivência;

Aos amigos e membros do LISP- Laboratório de Insetos Sociais Praga, que sempre incentivaram minhas pesquisas; um agradecimento especial ao Roberto e Tarcísio.

Aos amigos que fiz na cidade de Botucatu e de República pela amizade durante esses anos;

Ao time Bayer pelo incentivo e compreensão na reta final;

O presente estudo foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, o qual sou muito grato pela concessão da bolsa de estudos.

“O controle biológico através da utilização de entomopatogénos pode ser uma alternativa viável ao uso de inseticidas químicos.”

FRAGOSO, D. B. et al. Seletividade de inseticidas a vespas predadoras de *Leucoptera coffeella* (Guér. -Mènev.) (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 1, p. 139-143, 2001.

RESUMO

As formigas cortadeiras (gêneros *Atta*, *Acromyrmex* e *Amoimyrmex*) e a lagarta do tabaco (*Spodoptera litura*), são importantes pragas agrícolas no Brasil e no Japão. O uso de inseticidas sintéticos é o principal método de controle destes insetos pragas. No entanto, com o crescente relato de surgimento de insetos resistentes e a preocupação com o risco de contaminação ambiental impostos por esses produtos químicos, métodos de controle alternativos veem sendo estudados. Dentre esses novos métodos, o controle biológico através da utilização fungos entomopatogênicos pode vir a ser uma alternativa viável ao uso de inseticidas químicos. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar a patogenicidade dos fungos *B. bassiana* e *Trichoderma harzianum* para formigas cortadeiras e do fungo *M. rileyi* para *S. litura*. Além disso, foi investigada a influência do número de indivíduos contaminados dentro de um grupo no controle da disseminação de fungos entre as operárias da formiga cortadeira. O fungo *T. harzianum* apresentou alta patogenicidade para larvas e pupas de *A. sexdens rubropilosa*, causando uma mortalidade mais rápida e menores taxas de sobrevivência. Por outro lado, o fungo *B. bassiana* foi responsável por causar mortalidade mais rápida de operárias e menores taxas de sobrevivência. Adicionalmente, foi possível observar que o aumento de indivíduos contaminados com *B. bassiana* ou *T. harzianum* no grupo diminui sua taxa de sobrevivência. Além disso, iscas contendo 10 e 20% (p/p) dos fungos *B. bassiana* e *T. harzianum* não foram eficientes no controle de colônias de *A. sexdens*. Por outro lado, a pulverização de suspensões de 20% (p/p) de *B. bassiana* e 10% e 20% (p/p) de *T. harzianum* foi eficiente e resultou em 100% de mortalidade das colônias aos 11, 9 e 7 dias após a aplicação, respectivamente. Isolados de *M. rileyi* na concentração de $5,2 \times 10^8$ conídios ml^{-1} apresentaram mortalidade de 65,5–82,5% em 9 dias em larvas de *S. litura*, por contato e ingestão. Os resultados apoiam a hipótese de que fungos entomopatogênicos são eficientes no controle de formigas cortadeiras quando operárias contaminadas são alocadas em grupos de operárias saudáveis. Os fungos *B. bassiana* e *T. harzianum* são promissores como agentes de controle de colônias de formigas cortadeiras, quando pulverizados sobre o jardim de fungos, embora ainda existam alguns desafios quanto ao seu uso relacionados ao desenvolvimento de tecnologias para a aplicação do patógeno. Adicionalmente, pode-se inferir deste estudo que o isolado de *M. rileyi* possui grande potencial para uso no controle de *S. litura* na dose recomendada de $5,2 \times 10^8$ conídios ml^{-1} causando mortalidade em torno de 60-80%.

Palavras-chave: controle biológico; fungos entomopatogênicos; insetos sociais; formigas cortadeiras; lagarta do tabaco.

ABSTRACT

Leaf-cutting ants (genera *Atta*, *Acromyrmex* and *Amoimyrmex*) and tobacco caterpillar (*Spodoptera litura*) are important agricultural pests in Brazil and Japan. The use of synthetic insecticides is the main method of controlling these pests. However, with the growing report of the emergence of resistant insects and the concern about the risk of environmental contamination posed by these chemicals, alternative control methods have been studied. Among these new methods, biological control through the use of entomopathogenic fungi may become a viable alternative to the use of chemical insecticides. Therefore, the aim of this study was to evaluate the pathogenicity of the fungi *Beauveria bassiana* and *Trichoderma harzianum* for leaf-cutting ants and of the fungus *Metharizium rileyi* for tobacco caterpillar. Furthermore, we investigated whether the number of infected individuals within a group influences the control of fungal dissemination among leaf-cutting ant workers. We found that the fungus *T. harzianum* showed high pathogenicity against leaf cutting ant larvae and pupae, leading to faster mortality and lower survival rates. On the other hand, the fungus *B. bassiana* was responsible for causing faster mortality of workers and lower survival rates. Additionally, it was possible to observe that the increase of infected individuals with *B. bassiana* or *T. harzianum* in the group decreases its survival rate. Furthermore, baits containing 10 and 20% (w/w) of the fungi *B. bassiana* and *T. harzianum* were not efficient in controlling *A. sexdens* colonies. On the other hand, spraying suspensions of 20% (w/w) of *B. bassiana* and 10% and 20% (w/w) of *T. harzianum* was efficient and resulted in 100% mortality of the colonies at 11, 9 and 7 days after application, respectively. Isolates of *M. rileyi* at a concentration of 5.2×10^8 conidia ml⁻¹ showed mortality of 65.5–82.5% in 9 days in *S. litura* larvae, by contact and ingestion. The results support the hypothesis that entomopathogenic fungi are efficient in controlling leaf-cutting ants when contaminated workers are allocated to groups of healthy workers. The fungi *B. bassiana* and *T. harzianum* are promising as control agents for leaf-cutting ant colonies, when sprayed on the fungus garden, although there are still some challenges regarding their use related to the development of technologies for the application of the pathogen. Additionally, it can be inferred from this study that the *M. rileyi* isolate has great potential for use in the control of *S. litura* at the recommended dose of 5.2×10^8 conidia ml⁻¹ causing mortality around 60-80%.

Keywords: biological control; entomopathogenic fungi; social insects; leaf-cutting ants; tobacco caterpillar.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1 - Efeitos de fungos entomopatogênicos em Indivíduos e Grupos de Operárias da Formiga Cortadeira *Atta sexdens rubropilosa*

- Figura 1 – Estágios de *Atta sexdens rubropilosa* Forel 1908 (Hymenoptera: Formicidae) exposto aos diferentes entomopatógenos em condições de laboratório: (A) pupas saudáveis; (B) pupas expostas a *Beauveria bassiana*; (C) pupas expostas a *Trichoderma harzianum*; (D) larvas saudáveis; (E) larvas expostas a *Beauveria bassiana*; (F) larvas expostas a *Trichoderma harzianum*; (G) operária saudável; (H) operária exposta a *Beauveria bassiana*; (I) operária exposta a *Trichoderma harzianum*.....44
- Figura 2 – Curva de sobrevivência de larvas, pupas e operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel 1908 (Hymenoptera: Formicidae) imersas em suspensões de *Beauveria bassiana* e *Trichoderma harzianum*.....45
- Figura 3 – Curva de sobrevivência de grupos de operárias *Atta sexdens rubropilosa* Forel 1908 (Hymenoptera: Formicidae) imersas em suspensões de *Beauveria bassiana* (Bov6) e *Trichoderma harzianum* (Tri7) 46

CAPÍTULO 2 - Controle biológico em formigas cortadeiras, *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae), usando fungos entomopatogênicos

- Figura 1 – Mortalidade em colônias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) após o fornecimento de isca e pulverização da suspensão. Bov10 (*Beauveria bassiana* 10%), Bov20 (*B. bassiana* 20%), Tri10 (*Trichoderma harzianum* 10%) e Tri20 (*T. harzianum* 20%) 69

CAPÍTULO 3 - Comportamento da colônia de formiga cortadeira, *Atta sexdens rubropilosa*, durante o controle biológico

- Figura 1 – Porcentagem de cada ato comportamental realizado por *Atta sexdens rubropilosa* no primeiro dia de avaliação (a) das colônias que receberam as iscas em sua câmara de forrageamento (1: Transportar os pellets para o jardim de fungos; 2: Segurar os pellets; 3: Lamber os pellets; 4: Auto-limpeza; 5: limpeza mútua; 6: Comportamento de remoção de fungos contaminantes) e (b) as colônias que tiveram seu jardim de fungos pulverizado com suspensões (1: auto-limpeza; 2: limpeza mútua; 3: Comportamento de remoção fungos contaminantes; 4: Remoção de fungo simbiótico; 5: Sintoma de intoxicação).....86

Figura 2 – Porcentagem de cada ato comportamental realizado por <i>Atta sexdens rubropilosa</i> do segundo ao sexto dia de avaliação (a) das colônias que receberam as iscas em sua câmara de forrageamento (1: Transportar os pellets para o jardim de fungos ; 2: Segurar os pellets; 3: Lamber os pellets; 4: Auto-limpeza; 5: limpeza mútua; 6: Comportamento de remoção de fungos contaminantes) e (b) as colônias que tiveram seu jardim de fungos pulverizado com suspensões (1: Auto-limpeza; 2: limpeza mútua; 3: Comportamento de remoção de fungos; 4: Remoção de fungo simbiótico; 5: Sintoma de intoxicação).....	87
Figura 3 – Número de larvas mortas, pupas e operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> (a) das colônias que receberam as iscas em sua câmara de forrageamento e (b) das colônias que tiveram seu jardim de fungos pulverizado com suspensões.....	88
Figura 4 – Peso total de indivíduos mortos de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> Forel, 1908 e peso total de resíduos da câmara de resíduos de (a) as colônias que receberam iscas contendo o fungo em sua câmara de forrageamento e (b) as colônias que continham fungos suspensões pulverizadas em seu jardim de fungos.....	89

CAPÍTULO 4 - Patogenicidade do fungo entomopatogênico *Metharhizium rileyi* (Farlow) para *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae)

Figura 1 – Exame microscópico de isolados de <i>Metharhizium rileyi</i> : hifas vegetativas e conidióforos do isolado (400 × ampliação)	102
Figura 2 – Dias após a aplicação.....	102

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 - Efeitos de fungos entomopatogênicos em Indivíduos e Grupos de Operárias da Formiga Cortadeira *Atta sexdens rubropilosa*

- Tabela 1** – Tempos letais (TL₅₀) em horas para a atividade entomopatogênica dos fungos *Beauveria Bassiana* e *Trichoderma harzianum* contra *Atta sexdens rubropilosa* Forel 1908 (Hymenoptera: Formicidae) larvas, pupas e adultos (operárias) (n = 20).....47
- Tabela 2** – Valor de *p* da análise de sobrevivência para larvas, pupas e adultos (operárias) de *Atta sexdens rubropilosa* Forel 1908 (Hymenoptera: Formicidae) 48
- Tabela 3** – Valor de *p* da análise de sobrevivência para grupos de operárias *Atta sexdens rubropilosa* Forel 1908 (Hymenoptera: Formicidae) contaminadas com *Beauveria bassiana* (Bov6) e *Trichoderma harzianum* (Tri7).....50

CAPÍTULO 2 - Controle biológico em formigas cortadeiras, *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae), usando fungos entomopatogênicos

- Tabela 1** – Alterações comportamentais nas colônias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) após o fornecimento da isca e pulverização da suspensão.....70

CAPÍTULO 3 - Comportamento da colônia de formiga cortadeira, *Atta sexdens rubropilosa*, durante o controle biológico

- Tabela 1** – Frequência observada e porcentagem de comportamentos realizados por operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) após fornecimento de isca ou pulverização em suspensão contendo os fungos entomopatogênicos em estudo.....90
- Tabela 2** – Número de larvas pupas e operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908, (Hymenoptera: Formicidae) mortas, peso total de indivíduos mortos e peso total de resíduos da câmara de resíduos nas colônias fornecidas iscas contendo os fungos de estudo na câmara de forrageamento, ou que teve o jardim de fungos pulverizado com suspensões.....91

CAPÍTULO 4 - Patogenicidade do fungo entomopatogênico *Metarhizium rileyi* (Farlow) para *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae)

Tabela 1 – Algumas espécies de insetos de importância agrícola suscetíveis ao <i>Metarhizium rileyi</i>	103
Tabela 2 – Concentração letal (CL ₅₀) de <i>Metarhizium rileyi</i> contra larvas de <i>Spodoptera litura</i>	103
Tabela 3 – Efeito de <i>Metarhizium rileyi</i> no crescimento de larvas de <i>Spodoptera litura</i> (3º ínstar)	104
Tabela 4 – Efeito de <i>Metarhizium rileyi</i> no crescimento de larvas de <i>Spodoptera litura</i> (5º ínstar)	105

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	23
CAPÍTULO 1 - Efeitos de Fungos Entomopatogênicos em Indivíduos e Grupos de Operárias da Formiga Cortadeira <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	26
1.1 Introdução	28
1.2 Material e Métodos	29
1.2.1 Colônias estudadas	29
1.2.2 Bioensaio 1: Patogenicidade dos Fungos Contra Imaturos e Adultos de <i>Formigas Cortadeiras</i>	30
1.2.3 Bioensaio 2: Resposta do Grupo de operárias à Contaminação de <i>Companheiras de Colônia</i>	31
1.2.4 Análise dos Dados	32
1.3 Resultados.....	32
1.3.1 Bioensaio 1: Patogenicidade dos Fungos Contra Imaturos de <i>Formigas cortadeiras</i>	32
1.3.2 Bioensaio 2: Resposta do Grupo de operárias à Contaminação de <i>Companheiras de colônia</i>	33
1.4 Discussão.....	33
1.4.1 Bioensaio 1: Patogenicidade dos Fungos Contra Imaturos de <i>Formigas cortadeiras</i>	33
1.4.2 Bioensaio 2: Resposta do Grupo de operárias à Contaminação de <i>Companheiras de Colônia</i>	36
1.5 Conclusões	37
Referências	39

**CAPÍTULO 2 - CONTROLE BIOLÓGICO EM FORMIGAS
CORTADEIRAS, *Atta sexdens* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE),
USANDO FUNGOS ENTOMOPATOGENICOS 51**

2.1	INTRODUÇÃO	53
2.2	MATERIAL E MÉTODOS	55
2.2.1	Colônias Estudadas	55
2.2.2	Preparação das Suspensões.....	56
2.2.3	Preparação das Iscas	56
2.2.4	Efeito dos fungos <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Trichoderma harzianum</i> em colônias de <i>A. sexdens</i>	57
2.2.5	Análise Estatística.....	57
2.3	RESULTADOS	58
2.3	DISCUSSÃO	58
2.5	CONCLUSÃO	61
2.6	CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES	62
2.7	REFERÊNCIAS	63

**CAPÍTULO 3 - Comportamento da Colônia de Formiga Cortadeira,
Atta sexdens rubropilosa, durante o Controle Biológico 71**

3.1	INTRODUÇÃO	73
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	75
3.2.1	Colônias Estudadas	75
3.2.2	Preparação das Iscas.....	75
3.2.3	Preparação das Suspensões.....	76
3.2.4	Análise Comportamental	76
3.2.5	Análise Estatística	77
3.3	RESULTADOS	77
3.3.1	Comportamentos com isca	77
3.3.2	Comportamentos com pulverização	78
3.4	DISCUSSÃO.....	79
3.5	CONCLUSÃO	81
	REFERÊNCIAS	82

CAPÍTULO 4 – Patogenicidade do Fungo Entomopatogênico	
<i>Metharhizium rileyi</i> (Farlow) para <i>Spodoptera litura</i> (Fabricius)	
(Lepidoptera: Noctuidade).....	92
4.1 INTRODUÇÃO	93
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	94
4.2.1 <i>Insetos.....</i>	94
4.2.2 <i>Obtenção do fungo de Metharhizium rileyi e preparação da</i>	
<i>suspensão do esporo</i>	95
4.2.3 <i>Bioensaio</i>	95
4.2.4 <i>Efeito letal de conídios de Metharhizium rileyi contra larvas de</i>	
<i>Spodoptera litura</i>	96
4.2.5 <i>Isolamento de cadáveres infectados.....</i>	96
4.2.6 <i>Bioensaio de infecção.....</i>	96
4.2.7 <i>Análise Estatística.....</i>	97
4.3 RESULTADOS	97
4.4 DISCUSSÃO	97
4.5 CONCLUSÃO	98
AGRADECIMENTOS	98
REFERÊNCIAS.....	99
CONSIDERAÇÕES FINAIS	106
REFERÊNCIAS.....	107

INTRODUÇÃO GERAL

Desde o início da agricultura, os insetos-pragas são os principais responsáveis pela diminuição da produção agrícola e florestal, principalmente pela intensa desfolha. Anualmente, causam perdas em torno de 13% da produção mundial, o que representa cerca de duzentos e sessenta milhões de toneladas de grãos (ABROL; SHANKAR, 2014; PIMENTEL, 2009). Isso se deve à grande diversidade de indivíduos, à rápida adaptação nos diversos ambientes, ao ciclo de vida curto e rápido e alto potencial biótico, entre outros fatores. Dentre os esses insetos desfolhadores capazes de causar danos econômicos temos destaque para as ordens Lepidoptera e Hymenoptera.

Na ordem Hymenoptera, as formigas cortadeiras dos gêneros *Atta*, *Acromyrmex* e *Amoimyrmex*, pertencem a família Formicidae, subfamília Myrmicinae e tribo Attini (CRISTIANO et al., 2020). Possuem origem nas regiões tropicais, possivelmente ao Norte da América do Sul, mais especificamente na região amazônica (WEBER, 1972). No entanto, encontram-se presentes em quase todo o continente americano, desde o centro da Argentina, seguindo por todos os países da América do Sul (exceto no Chile) e continuando pela América Central (exceto em algumas ilhas das Antilhas) até o sul dos Estados Unidos da América (WEBER, 1970). Devido à sua alta capacidade adaptativa elas possuem ocorrência nos mais diversos tipos de ambientes, desde desertos, até florestas tropicais (WEBER, 1972; SOLOMON et al., 2008), exceto em algumas ilhas oceânicas e locais com grandes altitudes (WARD, 2006). No Brasil, são consideradas pragas nos setores agrícolas, florestais e áreas de pastagens; causam desfolhamento ao cortarem e carregarem as partes vegetais das plantas cultivadas (BRITTO et al., 2016; MOTA FILHO et al., 2021a,b), que após processadas servem de substrato para o fungo simbiote, *Leucoagaricus gongylophorus* (MUELLER et al., 2018), utilizado como principal fonte de alimentação da colônia (DELLA LUCIA, 2011).

Na ordem Lepidoptera, existe grande destaque para o gênero *Spodoptera* nas lavouras. Dentre algumas espécies deste gênero, a lagarta do tabaco, *Spodoptera litura* (Fabr.) (Lepidoptera), é uma praga agrícola global, pertencente à família Noctuidae, apesar deste inseto estar na lista de Pragas Quarentenárias Ausentes

(PQA) no Brasil em 2022, no Japão esse inseto causa grandes problemas nos sistemas agrícolas; é conhecido como “ladrão noturno”, porque os adultos voam à noite e a alimentação voraz das larvas de último ínstar é intensa à noite, enquanto, em contraste, elas se escondem no solo durante o dia (ZHANG et al., 2021).

É um inseto altamente polífago, capaz de se alimentar de mais de 120 famílias de plantas, no entanto, as culturas do amendoim, fumo, algodão são as mais afetadas (<https://www.cabi.org/isc/datasheet/44520>) (DHIR et al., 1992; XIA et al., 2020). Nessas culturas o nível de infestação de larvas até o 5º instar, sendo 1 larva/planta, durante a fase vegetativa ou reprodutiva (floração) resulta em 20% de perda de rendimento (DHIR et al., 1992). Além disso, em surtos mais severos, principalmente durante a floração as perdas de rendimento podem chegar até 100% (AHMAD; ARIF; AHMAD, 2007; AHMAD et al., 2008). Percebe-se grande dificuldade dos agricultores no controle destes insetos, principalmente pela grande dependência da utilização do controle químico.

O principal método de controle para formigas cortadeiras é o controle químico, através da utilização de iscas tóxicas a base de sulfluramida 0,3% (BRITTO et al., 2016; MOTA FILHO et al., 2021a,b), e para a lagarta do tabaco é a pulverização de inseticidas organofosforados, carbamatos e piretróides (SALEEM et al., 2008; SHAD et al., 2012; LI et al., 2021). No entanto, métodos de controle alternativos economicamente viáveis, mitigando os impactos ambientais nos ecossistemas, estão sendo empregados no controle desses insetos. A busca recorrente por esses métodos se deve ao crescente relato do surgimento de populações de lagartas do tabaco resistentes a algumas moléculas inseticidas (TONG et al., 2013; BHARANI; NAMASIVAYAM, 2017; AYYUB et al., 2019); e também devido, a sulfluramida principal ingrediente ativo no controle de formigas cortadeiras, estar inclusa no Anexo B da Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes (POP's), devido ao seu precursor o perfluorooctanossulfonato (PFOS) ser um contaminante ambiental altamente persistente (AVENDAÑO; LIU, 2015; NASCIMENTO et al., 2018).

Com todos esses problemas, aliados às diversas críticas da sociedade quanto ao uso excessivo de inseticidas químicos, o controle biológico através da utilização de entomopatogênicos pode ser uma alternativa viável ao uso de inseticidas químicos (CRUZ, 1995; FRAGOSO et al., 2001). Por exemplo: o controle biológico por meio do fungo entomopatogênico *Metarhizium rileyi*, anteriormente conhecido como *Nomuraea rileyi* (KEPLER et al., 2014), vem apresentando potencial para controlar

alguns lepidópteros, principalmente larvas da família Noctuidae, que atacam plantações (RAJAN; MUTHUKRISHNAN, 2009). Adicionalmente, o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* para infectar operárias nas colônias, ou *Trichoderma* spp. como antagonista do fungo simbiótico, tem se mostrado promissor no controle de formigas cortadeiras (ORTIZ; ORDUZ, 2001; VERMA et al., 2007; FOLGARAIT et al., 2011).

O objetivo deste estudo foi avaliar a patogenicidade dos fungos *B. bassiana* e *Trichoderma harzianum* para formigas cortadeiras e do fungo *M. rileyi* para *S. litura*.

CAPÍTULO 1

Efeitos de Fungos Entomopatogênicos em Indivíduos e Grupos de Operárias da Formiga Cortadeira *Atta sexdens rubropilosa*¹

Luis Eduardo Pontes Stefanelli ¹, Tarcísio Marcos Macedo Mota Filho ^{1*}, Roberto da Silva Camargo ¹, Carlos Alberto Oliveira de Matos ² and Luiz Carlos Forti ¹

¹ Laboratório de Insetos Sociais-Praga, Departamento de Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Caixa Postal 237, Botucatu, SP 18603-970, Brasil

² Campus Experimental de Itapeva, UNESP, Itapeva, SP 18409-010, Brasil

* Autor a quem a correspondência deve ser endereçada.

Stefanelli, L. E. P., Mota Filho, T. M. M., Camargo, R. D. S., Matos, C. A. O. D., Forti, L. C. (2021). Effects of entomopathogenic fungi on individuals as well as groups of workers and immatures of *Atta sexdens rubropilosa* leaf-cutting ants. **Insects**, v. 12, n. 1, p. 10, 2021. doi.org/10.3390/insects12010010

<https://www.mdpi.com/2075-4450/12/1/10>

Resumo Simples

O ingrediente ativo sulfluramida usado em iscas tóxicas para o controle de formigas cortadeiras foi incluído no Anexo B da Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes. O uso de fungos entomopatogênicos para o controle desses insetos tem exibido resultados promissores. *Trichoderma harzianum* apresentou alta patogenicidade contra larvas e pupas de *A. sexdens rubropilosa*, levando a uma mortalidade mais rápida e diminuição nas taxas de sobrevivência. *Beauveria bassiana* foi responsável por causar mortalidade mais rápida de operárias e menores taxas de sobrevivência. Um indivíduo contaminado com *B. bassiana* ou *T. harzianum* em um grupo diminui sua taxa de sobrevivência, sustentando a hipótese de que fungos entomopatogênicos são eficientes no controle de formigas cortadeiras quando operárias contaminadas são alocadas em grupos de operárias saudáveis.

¹ Capítulo redigido de acordo com as normas do periódico *Insects*, onde foi publicado.

Resumo

Em 2009, a sulfluramida, o principal ingrediente em iscas tóxicas para o controle de formigas cortadeiras, foi incluída no Anexo B da Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes. Isso resultou no interesse no uso de fungos entomopatogênicos como *Beauveria bassiana* e *Trichoderma harzianum* para o controle de formigas cortadeiras. A eficiência desses fungos no controle desses insetos e a forma como as formigas reagem individualmente ou em grupo aos riscos biológicos apresentados por esses fungos é pouco conhecida. Por esse motivo, avaliamos os efeitos de *B. bassiana* e *T. harzianum* em larvas, pupas e operárias de *Atta sexdens rubropilosa*. Além disso, investigamos se o número de indivíduos contaminados dentro de um grupo influencia no controle da disseminação de fungos entre as operárias. Descobrimos que o fungo *T. harzianum* apresentou alta patogenicidade contra larvas e pupas de *A. sexdens rubropilosa*, ocasionando uma mortalidade mais rápida e menores taxas de sobrevivência. Por outro lado, o fungo *B. bassiana* foi responsável por causar mortalidade mais rápida de operárias e menores taxas de sobrevivência. Além disso, observamos que o aumento de indivíduos contaminados com *B. bassiana* ou *T. harzianum* no grupo diminui sua taxa de sobrevivência. Os resultados apoiam a hipótese de que fungos entomopatogênicos são eficientes no controle de formigas cortadeiras quando operárias contaminadas são alocadas em grupos de operárias saudáveis.

Palavras-chave: *Beauveria bassiana*; Formicidae; Formigas cortadeiras; Sulfluramida; *Trichoderma harzianum*

1.1 Introdução

Formigas cortadeiras do gênero *Atta* Fabricius 1805 e *Acromyrmex* Mayr 1865 (Hymenoptera: Formicidae) são insetos eussociais encontrados exclusivamente na região Neotropical [1]. Cultivam o fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, do qual se alimentam, com várias espécies de plantas de interesse econômico. Elas são conhecidas por serem as principais pragas florestais, da agricultura e de pastagens [2,3].

As formigas cortadeiras são controladas com produtos químicos, especialmente com iscas tóxicas [3]. A utilização de iscas representa o método de controle mais barato e prático disponível no mercado [4]. Principalmente por não exigir uma mão de obra e equipamentos especializados para aplicação, além do controle de ninhos de difícil acesso [5]. As iscas formicidas, basicamente são formuladas no formato de pellets, e consistem em uma mistura de substrato atrativo (geralmente polpa cítrica desidratada), óleo de soja e um princípio ativo [6]; além disso, esse princípio ativo atua por ingestão. A sulfluramida 0,3% (p/p) é o único princípio ativo eficiente no controle de todas as espécies de formigas cortadeiras [3]. A produção e a degradação da sulfluramida (EC/LIST n. 223-980-3; CAS n. 4151-50-2) por meio de mecanismos biológicos e abióticos produz perfluorooctanossulfonato (PFOS), um contaminante ambiental altamente persistente [7,8]. O PFOS tem sido associado à perda de peso, redução do colesterol sérico e dos hormônios tireoidianos, além de efeitos hepatotóxicos e carcinogênicos em humanos e em alguns animais criados em condições de laboratório [9, 10]. Em 2009, a sulfluramida foi incluída no Anexo B da Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes, com permissão para uso restrito ao controle de formigas cortadeiras no Brasil até que um novo composto seja encontrado para substituí-lo [11].

O controle biológico com o fungo *Beauveria bassiana* infectando operárias em suas colônias ou com *Trichoderma harzianum* como antagonista do fungo simbiótico tem se mostrado uma alternativa eficiente para o controle de formigas cortadeiras [12]. Porém, no campo, a ação dos fungos é limitada por variados e eficientes mecanismos de defesa por parte das formigas [13]. A auto-limpeza, a limpeza mútua, a limpeza do ninho e a associação com a bactéria *Pseudonocardia* são mecanismos de defesa que atuam formando uma barreira imunológica de natureza social e inibindo a ação dos parasitas [14]. A glândula metapleural das formigas produz substâncias (ácido

indolacético (24-45%), ácido palmítico (10-25%), ácido 4-oxooctanóico (9-24%) e ácido acético (3-9%) ácido valérico, ácido hexanóico, ácido heptanóico, ácido octanóico, ácido nonanóico, ácido decanóico, ácido palmitoléico, 2-nonanona, 2-nonanol, álcool furfurílico e indol) com ação antifúngica e antibiótica [15,16]. A limpeza mútua é eficaz na remoção de parasitas como *Metarhizium anisopliae* de suas cutículas [17].

Além disso, a densidade de formigas contaminadas em um grupo de formigas saudáveis influencia a disseminação de patógenos dentro da colônia, com a taxa de transmissão de patógenos sendo inversamente proporcional à densidade da população saudável [17]. Colônias de insetos sociais desenvolveram defesas imunológicas coletivas contra parasitas. Esses “sistemas de imunidade social” resultam da cooperação de membros individuais do grupo para combater o aumento do risco de transmissão de doenças resultante da sociabilidade e da convivência em grupos [18].

Conhecer os mecanismos de resistência individual e em grupo das formigas cortadeiras é essencial quando se pretende implementar métodos seguros e eficientes de controle microbiano [19]. O presente estudo avaliou a patogenicidade de *B. bassiana* e *T. harzianum* em imaturos e operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel 1908 (Hymenoptera: Formicidae) em condições de laboratório. Além disso, descrevemos as taxas de mortalidade de operárias e imaturos e sua influência no controle da disseminação de esporos de fungos entomopatogênicos entre operárias.

1.2 Materiais e Métodos

1.2.1 Colônias Estudadas

Colônias de *A. sexdens rubropilosa*, com aproximadamente quatro meses de idade, foram coletadas em março de 2020 no município de Botucatu, São Paulo, Brasil. Posteriormente, foram submetidos à temperatura de $24 \pm 2^\circ \text{C}$, umidade relativa de 80% e fotoperíodo de 12 h de luz no Laboratório de Insetos Sociais-Praga (LISP) da Faculdade de Ciências Agrônômicas da Universidade Estadual de São Paulo, até o início dos bioensaios.

As colônias foram alojadas individualmente em recipientes de plástico acrílico de 1,5 L (GEP Comercial TM). As bases dos recipientes foram cobertas com uma fina camada de gesso de 1,0 cm para manter o jardim de fungos úmido. O recipiente do jardim de fungos foi conectado a dois recipientes plásticos equidistantes de 250 mL:

um para forrageamento das plantas fornecidas e outro para descarte de resíduos. Folhas de *Acalypha* spp. foram fornecidas a cada dois dias na arena de forrageamento para manter o crescimento do fungo simbiote.

1.2.2 Bioensaio 1: Patogenicidade dos Fungos Contra Imaturos e Adultos de Formigas Cortadeiras

A patogenicidade de *B. bassiana* e *T. harzianum* foi avaliada em indivíduos imaturos e adultos (operárias com comprimento da cabeça de 1,2 a 2,2 mm) de *A. sexdens rubropilosa*. Para tanto, foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, com tratamentos compostos por três estágios de desenvolvimento (larva, pupa e adulto) e quatro concentrações de dois produtos comerciais de propriedade da empresa Koppert Biological Systems®; Cidade: Piracicaba-SP, Brasil; Sendo: Boveril WP PL63®, composto por 5% de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., cepa PL63 (mínimo de $1,0 \times 10^8$ conídios viáveis g⁻¹), e Trichodermil SC 1306®, composto por 4,8% de *Trichoderma harzianum* Rifai, cepa ESALQ-1306 (mínimo de $2,0 \times 10^9$ conídios viáveis mL⁻¹).

Os indivíduos foram coletados das colônias de laboratório com uma pinça entomológica de alumínio flexível (Log Nature™). Em seguida, foram mergulhados por dois segundos em suspensões de água destilada e Tween 80® 1% nas seguintes concentrações: $1,0 \times 10^3$ (Bov3), $1,0 \times 10^4$ (Bov4), $1,0 \times 10^5$ (Bov5) e $1,0 \times 10^6$ (Bov6) conídios mL⁻¹, para *B. bassiana*, e $2,0 \times 10^4$ (Tri4), $2,0 \times 10^5$ (Tri5), $2,0 \times 10^6$ (Tri6) e $2,0 \times 10^7$ (Tri7) conídios mL⁻¹ para *T. harzianum*. Houve dois controles negativos: (i) grupos imersos em solução aquosa de Tween 80® a 1% (Controle 1) e (ii) grupos imersos em água destilada (Controle 2) (metodologia adaptada) [20, 21]. O Tween 80® 1% promove uma suspensão homogênea permitindo a aplicação uniforme de conídios em imaturos e adultos. Para cada tratamento, houve quatro repetições (placas de Petri estéreis), cada uma contendo grupos de cinco indivíduos. Usamos concentrações de acordo com o protocolo experimental desenvolvido por Loureiro e Monteiro [20, 21].

Posteriormente, os grupos foram colocados em placas de Petri estéreis contendo papel filtro umedecido com água destilada no fundo e mantidos em incubadora BOD (Eletrolab™), sendo submetidos à temperatura de 27 ± 1 ° C, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e um fotoperíodo de 12h para manter as condições ideais para o desenvolvimento dos fungos e dos insetos (larvas, pupas e operárias).

Durante o bioensaio, as operárias não receberam nenhum alimento [20, 21]. As avaliações foram realizadas diariamente durante cinco dias, sendo registrada a mortalidade dos indivíduos em cada tratamento. Utilizamos a mudança de coloração dos imaturos e fungos colonizando as operárias como critério de mortalidade (Figura 1).

1.2.3 Bioensaio 2: Resposta do Grupo de operárias à Contaminação de Companheiras de Colônia

Com base no Bioensaio 1: patogenicidade dos fungos contra imaturos e adultos de formigas cortadeiras, foram utilizados os tratamentos Bov6 e Tri7, por fornecerem os menores tempos letais de 50% de mortalidade (TL₅₀). Para cada tratamento em estudo, as operárias foram divididas em grupos, sendo cada grupo composto por cinco repetições, dispostas da seguinte forma:

- (1) Grupo 1:19 — 1 operária contaminada + 19 operárias saudáveis = 20 operárias
- (2) Grupo 2:18 — 2 operárias contaminadas + 18 operárias saudáveis = 20 operárias
- (3) Grupo 4:16 — 4 operárias contaminadas + 16 operárias saudáveis = 20 operárias
- (4) Grupo 8:12 — 8 operárias contaminadas + 12 operárias saudáveis = 20 operárias
- (5) Grupo 16:4 — 16 operárias contaminadas + 4 operárias saudáveis = 20 operárias
- (6) Grupo 18:2 — 18 operárias contaminadas + 2 operárias saudáveis = 20 operárias
- (7) Grupo 19:1 — 19 operárias contaminadas + 1 operária saudável = 20 operárias

Os grupos foram transferidos para potes de acrílico de 7,5 cm de diâmetro e 5,5 cm de altura, com tampas herméticas, contendo uma camada de gesso de 1,0 cm no fundo e uma pequena quantidade (3,0 g) do fungo simbiótico pertencente à colônia da qual as operárias foram removidas. Posteriormente, os indivíduos foram marcados com caneta de cor branca (Edding[®], Ahrensburg, Alemanha) e posteriormente contaminados por imersão em suspensão de esporos por dois segundos. Esta caneta foi utilizada devido à sua excelente aderência, secagem rápida e boa visibilidade. Essa técnica tem sido amplamente utilizada para formigas cortadeiras, além disso, a tinta seca não impede a movimentação das formigas [22]. A marcação foi feita para distinguir indivíduos contaminados de saudáveis. As avaliações foram realizadas diariamente durante cinco dias, e a mortalidade de indivíduos contaminados e não contaminados foi registrada de acordo com a Figura 1.

1.2.4 Análise dos dados

O tempo letal (TL₅₀) para ocasionar 50,0% de mortalidade em imaturos e adultos de *A. sexdens rubropilosa* foi obtido pela análise PROBIT (Finney, 1971), usando SAS [23].

O estimador de Kaplan-Meier (também conhecido como estimador do limite do produto) foi usado para calcular a função de sobrevivência [24]. Este estimador é uma adaptação desta função de sobrevivência empírica:

$$\hat{S}(t) = \frac{n^{\circ}.de\ indivíduos\ que\ sobreviveram\ até\ o\ tempo\ t}{n^{\circ}.total\ de\ indivíduos\ no\ estudo}$$

Esta função implica na ausência de censuras e presença de informações incompletas ou parciais [25]. Onde $\hat{S}(t)$ é uma função de escada com degraus que informam o momento em que ocorreu a morte do indivíduo. O tamanho das etapas é de $1/n$ (n = tamanho da amostra), que é multiplicado pelo número de empates caso ocorram.

O teste Log-rank, ou Mantel Haenszel, foi empregado para testar a hipótese de não existência de diferenças nas funções de sobrevivência entre os tratamentos. Os valores de P foram ajustados pelo método de Benjamini e Hochberg [26], que controla a taxa de falsas descobertas (a proporção esperada de falsas descobertas entre as hipóteses rejeitadas).

Os pacotes ggplot2, survival e survminer do software R, versão 4.0.0, foram usados para computação estatística e gráficos [27].

1.3 Resultados

1.3.1 Bioensaio 1: Patogenicidade dos Fungos Contra Imaturos e Adultos de Formigas Cortadeiras

Com base nos tempos letais (TL₅₀), foi observado atividade entomopatogênica dos fungos *B. bassiana* e *T. harzianum* para operárias, larvas e pupas de *A. sexdens rubropilosa* (Tabela 1 e Figura 1). De maneira geral, os TL₅₀ para ambos os estágios de desenvolvimentos são inversamente proporcionais às concentrações de conídios nas soluções. Para os estágios de larva e pupa, *T. harzianum* expressou maior patogenicidade para operárias com TL₅₀ variando de 25,251 (Tri4) a 7,385 (Tri7) horas

(Tabela 1), e de 28,602 (Tri4) a 11,503 (Tri7) horas para larvas e pupas, respectivamente. Por outro lado, *B. bassiana* expressou maior patogenicidade para as operárias, com o TL₅₀ variando entre 125,746 (Bov3) e 9,949 (Bov6) horas. No geral, a fase adulta foi menos suscetível à ação dos fungos em estudo.

As curvas de sobrevivência de larvas de *A. sexdens rubropilosa* em diferentes concentrações de conídios de *B. bassiana* e *T. harzianum* não apresentaram diferença significativa entre elas, mas foram significativamente diferentes das curvas dos controles negativos, Controle 1 e Controle 2 (Tabela 2 e Figura 2).

Para as pupas, de modo geral, houve tendência a diferença de sobrevivência entre as diferentes concentrações de *T. harzianum* e *B. bassiana* (Tabela 2 e Figura 2), sendo menores as diferenças entre as concentrações com *T. harzianum*.

Em operárias, a sobrevivência na concentração de Bov6 foi inferior à das demais concentrações de *B. bassiana* e *T. harzianum* (Tabela 2 e Figura 2). A sobrevivência na concentração Tri6 não difere apenas da sobrevivência em Tri4 e Tri5. A sobrevivência na concentração Tri7, por sua vez, difere de todas as outras concentrações.

1.3.2 Bioensaio 2: Resposta do Grupo de operárias à Contaminação de Companheiras de Colônia

Em relação aos grupos contaminados com *B. bassiana*, a sobrevivência do grupo 19:1 diferiu significativamente dos grupos 1:19, 2:18 e 4:16 (Tabela 3 e Figura 1 e Figura 3). Comparando a sobrevivência dos grupos de *T. harzianum*, o grupo 18:2 diferiu dos grupos 1:19, 2:18 e 4:16. Quanto ao grupo 19:1, ele difere dos grupos 1:19, 2:18, 4:16, 8:12 e 16:4. Assim, pode-se inferir que o aumento de indivíduos contaminados por *B. bassiana* ou *T. harzianum* no grupo resulta em menores taxas de sobrevivência.

1.4 Discussão

1.4.1 Bioensaio 1: Patogenicidade dos Fungos Contra Imaturos e Adultos de Formigas Cortadeiras

Nosso presente estudo, conduzido em condições de laboratório, mostrou que os tratamentos contendo conídios de *B. bassiana* e *T. harzianum* foram eficientes no controle de *A. sexdens rubropilosa*, pois causaram a morte de larvas, pupas e

operárias. Todos os insetos mortos exibiam crescimento micelial em seu tegumento, conforme apresentado na Figura 1.

Beauveria bassiana tem um ciclo biológico de aproximadamente 168 h [28], e *T. harzianum*, de 120 horas em condições laboratoriais [29]. Com isso, a morte dos estágios de desenvolvimento está provavelmente associada a metabólitos secundários tóxicos para os insetos sintetizados por esses fungos, após penetrarem no exoesqueleto dos insetos [30]. As espécies de *Beauveria* são conhecidas por produzirem metabólitos secundários com propriedades inseticidas, como beauvericina [31], bassianolida [32] e bassiacridina [33]. Por exemplo, o bassianolide foi tóxico para *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) quando incorporado em sua dieta ou injetado nas larvas [32]. Beauvericina mostrou atividade inseticida contra *Calliphora erythrocephala* (Diptera: Calliphoridae), *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) e *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) [34, 35]. *Trichoderma harzianum*, apesar de não ser um fungo entomopatogênico, também apresenta efeito tóxico sobre os insetos, o qual é atribuído aos metabólitos secundários sintetizados após a penetração no exoesqueleto. Estudos relatam que metabólitos ainda não identificados, produzidos por *T. harzianum*, são tóxicos para *Periplaneta americana* [36]. Além disso, extratos de isolados de *Trichoderma* spp produziram metabólitos secundários que apresentaram toxicidade contra *A. sexdens rubropilosa*, por ingestão, contato ou exposição a metabólitos voláteis [37].

Os TL₅₀ para larvas, pupas e operárias obtidos neste estudo foram mais curtos (Tabela 1) do que os encontrados por Loureiro e Monteiro [21] para os isolados JAB 06 e AM 9 de *B. bassiana*, em soldados de *A. sexdens sexdens*, com um TL₅₀ de 2,60 e 2,72 dias, observado para as doses de $1,0 \times 10^9$ conídios mL⁻¹ e $1,0 \times 10^8$ conídios mL⁻¹, respectivamente. Nossos resultados do TL₅₀ também foram inferiores aos relatados por Loureiro e Monteiro [20], para operárias de *A. sexdens sexdens*, com os isolados JAB 06 e AM 9 de *B. bassiana* fornecendo um TL₅₀ de 2,80 ($1,0 \times 10^9$ conídios mL⁻¹) e 2,16 ($1,0 \times 10^9$ conídios mL⁻¹) dias, respectivamente. No que diz respeito ao fungo *T. harzianum*, os resultados se mostraram inferiores para larvas, pupas e operárias quando comparados aos resultados obtidos por Mussi-Dias et al. [37], segundo os quais o isolado de *Trichoderma* spp. causou 50% de mortalidade para as operárias após 2, 1,5 e 4 dias quando ingerido, pulverizado nas operárias ou por exposição a voláteis, respectivamente.

As taxas de sobrevivência de larvas, pupas e operárias de *A. sexdens rubropilosa* contaminadas com *B. bassiana* e *T. harzianum* (Tabela 2, Figura 1) foram inferiores às de operárias *Atta bisphaerica* contaminadas com 1 µL de suspensão de *B. bassiana* em concentrações (conídios mL⁻¹) de 10⁵ (20 dias), 10⁶ (20 dias), 10⁷ (9 dias), 10⁸ (6 dias) e 10⁹ (6 dias) [19]. Os resultados de sobrevivência para os dois estágios também foram inferiores aos encontrados por Dornelas et al. [38], segundo os quais, foi observado que no décimo dia de avaliação, todas as operárias de *A. sexdens* contaminadas com 1 µL (1,0 × 10⁷ conídios mL⁻¹) de suspensão de *Metarhizium anisopliae*.

A variação na TL₅₀ e nas taxas de sobrevivência dos estágios de desenvolvimento de *A. sexdens rubropilosa* contaminadas com os diferentes fungos pode estar associada com a capacidade de infecção e penetração dos fungos, à susceptibilidade do hospedeiro e ao número de metabólitos tóxicos produzidos por esses fungos. Além disso, a variabilidade genética presente em fungos entomopatogênicos [39] pode ser um dos fatores responsáveis pelas diferenças de virulência entre isolados e espécies, conforme relatado por Diehl-Fleig et al. [40]

Nossos resultados evidenciam que os fungos *B. bassiana* e *T. harzianum* são promissores para a prospecção de produtos de controle biológico. No geral, para ambos os fungos, os tempos letais (TL₅₀) e a sobrevivência estimada obtida neste estudo foram superiores para as operárias do que para as larvas e pupas (Tabela 1 e Tabela 2, Figura 1 e Figura 2). Fungos entomopatogênicos, como mencionado anteriormente, infectam seu hospedeiro por meio da penetração. A penetração pode ocorrer em qualquer parte da cutícula, embora locais preferenciais tenham sido observados em vários insetos [41]. Porém, estágios de desenvolvimento que apresentam cutícula mais rígida, ou seja, mais esclerotizada, podem dificultar a ação desses fungos [42]. Este fato poderia explicar o TL₅₀ e as taxas de sobrevivência das operárias, pois sua cutícula é totalmente esclerotizada e oferece proteção contra dessecação, parasitismo e predação [43]. No caso específico das operárias, quando os patógenos entram em contato com a superfície de sua cutícula, essas formigas realizam limpeza mútua [44], além de produzirem substâncias antifúngicas em sua glândula metapleurale que inibem a ação dos patógenos [15]. Esses mecanismos de defesa não estão presentes nas fases de larva e pupa.

1.4.2 Bioensaio 2: Resposta do Grupo de operárias à Contaminação de Companheiras de Colônia

Em geral, o número de operárias contaminados com *B. bassiana* ou *T. harzianum* influenciou a sobrevivência de todos os grupos, sendo que a maior sobrevivência foi encontrada nos grupos com maior número de operárias saudáveis (Tabela 3 e Figura 3). Resultados semelhantes foram encontrados por Hughes et al. [17] que relataram que uma única operária contaminada com o fungo *Metarhizium anisopliae*, ao entrar em contato com um grupo de operárias saudáveis, apresentou maior sobrevivência em relação as operárias contaminadas que permaneceram isolados. Essa maior sobrevivência está relacionada a inúmeros mecanismos de defesa por parte das formigas.

Dentre esses mecanismos, merecem destaque: os comportamentos higiênicos (auto-limpeza e limpeza mútua), a remoção de esporos de fungos entomopatogênicos para prevenir infecção do jardim de fungo [15]; a gestão de resíduos produzidos para evitar a propagação de microrganismo potencialmente nocivos para o jardim de fungo [45]; e a associação mutualística com bactérias filamentosas (*Pseudonocardia*) alojadas na cutícula de formigas que produzem antibióticos que inibem microrganismos [46].

Digno de nota também é a presença da cavidade infrabucal, uma estrutura de filtração dentro da cavidade oral das formigas [47] na qual esporos potencialmente perigosos e resíduos que as operárias acumulam enquanto se limpam ou removem esporos do jardim de fungos são armazenados [48], e que, uma vez preenchido, comprime e expulsa o material desta cavidade na forma de uma pelota para pilhas de resíduos fora de seu ninho, a fim de evitar que microorganismos infectem novamente o jardim [49]; e a produção de inúmeras substâncias pela glândula metapleural que são capazes de atuar como um agente de defesa da colônia [50].

Porém, podemos observar que em grupos em que o número de operárias contaminadas é igual ou superior a quatro, o benefício de pertencer a um grupo não apresenta vantagens no controle da disseminação de patógenos e, conseqüentemente, significa menores taxas de sobrevivência para os grupo, conforme observado para os grupos que possuíam operárias contaminadas com *T. harzianum* (Tabela 3 e Figura 2). Isso provavelmente é causado porque as formigas estão contaminadas com uma grande quantidade de conídios de fungos e não podem

controlar com eficiência a disseminação de esporos. Nesse contexto, a limpeza mútua não funciona mais com o aumento de indivíduos infectados, o que foi observado por Camargo et al. [51].

Essas informações tornam-se essenciais para o controle de formigas cortadeiras por meio de fungos entomopatogênicos. Diversas investigações têm tentado adaptar o uso de fungos entomopatogênicos para o controle de formigas cortadeiras por meio de iscas granuladas com substrato atraente [52, 53, 54]. Alguns são eficientes em condições de laboratório, mas, em condições de campo, esbarram na imunidade social das formigas. Porque quando iscas com esporos de fungos são usadas, poucas operárias têm contato direto com os esporos [55]. As demais operárias são contaminadas por meio de interações entre indivíduos, conforme comprovado por Camargo et al. [51], que utilizou um corante traçador cuja disseminação foi atribuída ao contato entre operárias. Porém, quando se trata de fungos entomopatogênicos, essa disseminação não ocorre, pois as formigas reconhecem os agentes entomopatogênicos e utilizam mecanismos de defesa individuais e grupais que inibem a ação dos fungos [15]. Estes resultados mostram que, para maior eficiência no controle biológico com fungos entomopatogênicos, deve haver um grande número de operárias contaminadas e máximo contato entre fungo e hospedeiro.

1.5 Conclusões

Imaturos e adultos de *Atta sexdens rubropilosa* são suscetíveis à ação entomopatogênica dos fungos *B. bassiana* e *T. harzianum*. A vida em grupo influenciou na sobrevivência das operárias, sendo observada menor sobrevivência nos grupos com maior número de operárias contaminadas.

Contribuições dos autores

LEPS, TMMMF, RdSC, LCF e CAOdm escreveram o artigo; RdSC e LCF conceberam e projetaram os experimentos; LEPS e TMMMF realizaram os experimentos; LCF contribuiu com reagentes/materiais/ferramentas de análise. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

Financiamento

Esta pesquisa não recebeu financiamento externo.

Agradecimentos

Luis Eduardo Pontes Stefanelli e Tarcísio Marcos Macedo Mota Filho agradecem o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001. Luiz Carlos Forti agradece o apoio do Conselho Nacional de Ciência, Pesquisa e Tecnologia (CNPq-PQ) (doação nº 301938 / 2017-2).

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Referências

1. Hölldobler, B.; Wilson, E.O. *The Ants*; Harvard University Press: Cambridge, MA, USA, 1990.
2. Montoya-Lerma, J.; Giraldo-Echeverri, C.; Armbrrecht, I.; Farji-Brener, A.; Calle, Z. Leaf-cutting ants revisited: Towards rational management and control. *Int. J. Pest Manag.* **2012**, *58*, 225–247.
3. Britto, J.S.; Forti, L.C.; Caldato, N.; Zanuncio, J.C.; Oliveira, M.A.; Bonetti Filho, R.Z.; Loeck, A.E.; Lemes, P.G.; Nagamoto, N.S.; Camargo, R.S. Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. *Int. J. Res. Environ. Stud.* **2016**, *3*, 11–92.
4. Forti, L.C.; Della Lucia, T.M.C.; Yassu, W.K.; Bento, J.M.; Pinhão, M.A. Metodologias para experimentos com iscas granuladas para formigas cortadeiras. In *As formigas Cortadeiras*; Della Lucia, T.M.C., Ed.; Folha de Viçosa: Viçosa, Brazil, 1993; pp. 191–211.
5. Zanetti, R.; Zanuncio, J.C.; Santos, J.C.; Da Silva, W.L.P.; Ribeiro, G.T.; Lemes, P.G. An overview of integrated management of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in Brazilian forest plantations. *Forests* **2014**, *5*, 439–454.
6. Verza, S.S.; Forti, L.C.; Matos, C.A.; Garcia, M.G.; Nagamoto, N.S. Attractiveness of citrus pulp and orange albedo extracts to *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* **2006**, *47*, 391–400.
7. Avendaño, S.M.; Liu, J. Production of PFOS from aerobic soil biotransformation of two perfluoroalkyl sulfonamide derivatives. *Chemosphere* **2015**, *119*, 1084–1090.
8. Nascimento, R.A.; Nunoo, D.B.O.; Bizkarguenaga, E.; Schultes, L.; Zabaleta, I.; Benskin, J.P.; Spanó, S.; Leonel, J. Sulfluramid use in Brazilian agriculture: A source of per-and polyfluoroalkyl substances (PFASs) to the environment. *Environ. Pollut.* **2018**, *242*, 1436–1443.
9. Lau, C.; Butenhoff, J.L.; Rogers, J.M. The developmental toxicity of perfluoroalkyl acids and their derivatives. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2004**, *198*, 231–241.
10. Stahl, T.; Mattern, D.; Brunn, H. Toxicology of perfluorinated compounds. *Environ. Sci. Eur.* **2011**, *23*, 38.

11. Stockholm Convention. The New POPs under the Stockholm Convention. 2019. Available online: <http://chm.pops.int/Convention/ThePOPs/TheNewPOPs/tabid/2511/Default.aspx> (accessed on 7 August 2020).
12. Verma, M.; Brar, S.K.; Tyagi, R.D.; Surampalli, R.Y.; Valero, J.R. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochem. Eng. J.* **2007**, *37*, 1–20.
13. Machado, V.; Diehl-Fleig, E.; Silva, M.D.; Lucchese, M.D.P. Reações observadas em colônias de algumas espécies de *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae) quando inoculadas com fungos entomopatogênicos. *Cien. Cult.* **1988**, *40*, 1106–1108.
14. Currie, C.R.; Stuart, A.E. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. *Proc. R. Soc. B.* **2001**, *268*, 1033–1039.
15. Morgan, E.D. Chemical sorcery for sociality: Exocrine secretions of ants (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecol. News* **2008**, *11*, 79–90.
16. Ortius-Lechner, D.; Maile, R.; Morgan, E.D.; Boomsma, J.J. Metapleural gland secretion of the leaf-cutter ant *Acromyrmex octospinosus*: New compounds and their functional significance. *J. Chem. Ecol.* **2000**, *26*, 1667–1683.
17. Hughes, W.O.H.; Eilenberg, J.; Boomsma, J.J. Trade-offs in group living: Transmission and disease resistance in leaf-cuttings ants. *Proc. R. Soc. B.* **2002**, *269*, 1811–1819.
18. Walker, T.N.; Hughes, W.O. Adaptive social immunity in leaf-cutting ants. *Biol. Lett.* **2009**, *5*, 446–448.
19. Ribeiro, M.M.; Amaral, K.D.; Seide, V.E.; Souza, B.M.; Della Lucia, T.M.C.; Kasuya, M.C.M.; Souza, D.J. Diversity of fungi associated with *Atta bisphaerica* (Hymenoptera: Formicidae): The activity of *Aspergillus ochraceus* and *Beauveria bassiana*. *Psyche* **2012**, *2012*, 1–6.
20. Loureiro, E.D.S.; Monteiro, A.C. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Paecilomyces farinosus*, patogênicos para operárias de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae). *Arq. Inst. Biol.* **2004**, *71*, 35–40.
21. Loureiro, E.D.S.; Monteiro, A.C. Patogenicidade de isolados de três fungos entomopatogênicos a soldados de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae). *Rev. Árvore* **2005**, *29*, 553–561.

22. Camargo, R.S.; Forti, L.C.; Lopes, J.F.S.; Andrade, A.P.P.; Ottati, A.L.T. Age polytheism in the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus brunneus* Forel, 1911 (Hym., Formicidae). *J. Appl. Entomol.* **2007**, *131*, 139–145.
23. SAS OnDemand for Academics. Available online: https://www.sas.com/en_us/software/on-demand-for-academics.html. (accessed on 6 August 2020).
24. Kaplan, E.L.; Meier, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Stat. Assoc.* **1958**, *53*, 457–481.
25. Colosimo, E.A.; Giolo, S.R. *Análise de Sobrevivência Aplicada*; Blucher: São Paulo, Brazil, 2006.
26. Benjamini, Y.; Hochberg, Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Series B Stat. Methodol.* **1995**, *57*, 289–300.
27. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Available online: <https://www.R-project.org/> (accessed on 21 June 2020).
28. Alves, S.B.; Rossi, L.S.; Lopes, R.B.; Tamai, M.A.; Pereira, R.M. *Beauveria bassiana* yeast phase on agar medium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *J. Invertebr. Pathol.* **2002**, *81*, 70–77.
29. Romero-Arenas, O.; Huerta Lara, M.; Damián Huato, M.A.; Domínguez Hernández, F.; Arellano Victoria, D.A. The characteristics of *Trichoderma harzianum* as a limiting agent in edible mushrooms. *Rev. Colomb. Biotechnol.* **2009**, *11*, 143–151.
30. Téllez-Jurado, A.; Cruz Ramírez, M.G.; Mercado Flores, Y.; Asaff Torres, A.; Arana-Cuenca, A. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Rev. Mex. Mic.* **2009**, *30*, 73–80.
31. Wang, Q.; Xu, L. Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: A short review. *Molecules* **2012**, *17*, 2367–2377.
32. Kanaoka, M.; Isogai, A.; Murakoshi, S.; Ichinoe, M.; Suzuki, A.; Tamura, S. Bassianolide, a new insecticidal cyclodepsipeptide from *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii*. *Agric. Biol. Chern.* **1978**, *42*, 629–635.
33. Quesada-Moraga, E.; Vey, A. Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Mycol. Res.* **2004**, *108*, 441–452.

34. Grove, J.F.; Pople, M. The insecticidal activity of beauvericin and the enniatin complex. *Mycopathologia* **1980**, *70*, 103–105.
35. Fornelli, F.; Minervini, F.; Logrieco, A. Cytotoxicity of fungal metabolites to lepidopteran (*Spodoptera frugiperda*) cell line (SF-9). *J. Invertebr. Pathol.* **2004**, *85*, 74–79.
36. Abdul-Wahid, O.A.; Elbanna, S.M. Evaluation of the insecticidal activity of *Fusarium solani* and *Trichoderma harzianum* against cockroaches; *Periplaneta Americana*. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2012**, *6*, 1024–1032.
37. Mussi-Dias, V.; Freire, M.D.G.M.; Santos, A.V.; Moreira, D.D.O.; Carolino, A.T.; Samuels, R.I. Screening of Fungi Isolated from the Brazilian Restinga for Insecticidal Activity. *Microbiol. Res. J. Int.* **2020**, *30*, 48–63.
38. Dornelas, A.S.P.; Sarmiento, A.R.; Santos, G.R.; Nascimento, M.O.; Souza, D.J. Fungos Filamentosos Associados às Espécies *Atta sexdens* (Linnaeus) e *Atta laevigata* (F. Smith) (Hymenoptera: Formicidae). *EntomoBrasilis* **2016**, *9*, 26–30.
39. Alves, S.B. Fungos entomopatogênicos. In *Controle Microbiano de Insetos*; Alves, S.B., Ed.; Fealq: Piracicaba, Brazil, 1998; pp. 289–381.
40. Diehl-Fleig, E.; Silva, M.E.; Pacheco, M.R.M. Testes de patogenicidade dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em *Atta sexdens piriventris* (Santschi, 1919) em diferentes temperaturas. *Cien. Cult.* **1988**, *40*, 1103–1105.
41. Ortiz-Urquiza, A.; Keyhani, N.O. Action on the surface: Entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects* **2013**, *4*, 357–374.
42. Rohde, C.; Alves, L.F.; Neves, P.M.; Alves, S.B.; Silva, E.R.; Almeida, J.E. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. contra o cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Neotrop. Entomol.* **2006**, *35*, 231–240.
43. Chapman, R.F. *The Insects—Structure and Function*, 4th ed.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 1998.
44. Wilson, E.O. *The Insect Societies*; Belknap Press of Harvard University Press: Cambridge, MA, USA, 1971.

45. Hart, A.G.; Ratnieks, F.L. Task partitioning, division of labor and nest compartmentalization collectively isolate hazardous waste in the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **2001**, *49*, 387–392.
46. Currie, C.R.; Scott, J.A.; Summerbell, R.C.; Malloch, D. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature* **1999**, *398*, 701–704.
47. Quinlan, R.J.; Cherrett, J.M. Studies on the role of the infrabuccal pocket of the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hym., Formicidae). *Insectes Soc.* **1978**, *25*, 237–245.
48. Bailey, I.W. Some relations between ants and fungi. *Ecology* **1920**, *1*, 174–189.
49. Febvay, G.; Kermarrec, A. Morphologie et fonctionnement du filtre infrabuccal chez une attine *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hymenoptera: Formicidae): Role de la poche infrabuccale. *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* **1981**, *10*, 441–449.
50. Little, A.E.F.; Murakami, T.; Mueller, U.G.; Currie, C.R. Defending against parasites: Fungus-growing ants combine specialized behaviours and microbial symbionts to protect their fungus gardens. *Biol. Lett.* **2006**, *2*, 12–16.
51. Camargo, R.S.; Puccini, C.; Forti, L.C.; Matos, C.A.O. Allogrooming, self-grooming, and touching behavior: Contamination routes of leaf-cutting ant workers using a fat-soluble tracer dye. *Insects* **2017**, *8*, 59.
52. Diehl-Fleig, E.; Silva, M.E.; Specht, A.; Bortolás, E.P. Emprego do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* em iscas para o controle das formigas cortadeiras *Acromyrmex* spp. em floresta implantada de *Eucalyptus grandis*. *Congr. Florest. Estadual* **1992**, *7*, 1139–1150.
53. Specht, A.; Diehl-Fleig, E.; Silva, M.D. Atratividade de iscas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. a formigas do gênero *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). *An. Soc. Entomol. Brasil* **1994**, *23*, 99–104.
54. Lopez, E.; Orduz, S. *Metarhizium anisopliae* and *Trichoderma viride* for control of nests of the fungus-growing ant, *Atta cephalotes*. *Biol. Control* **2003**, *27*, 194–200.
55. Pereira, R.M.; Stimac, J.L. Biocontrol options for urban pest ants. *J. Agric. Entomol.* **1997**, *14*, 231–248.

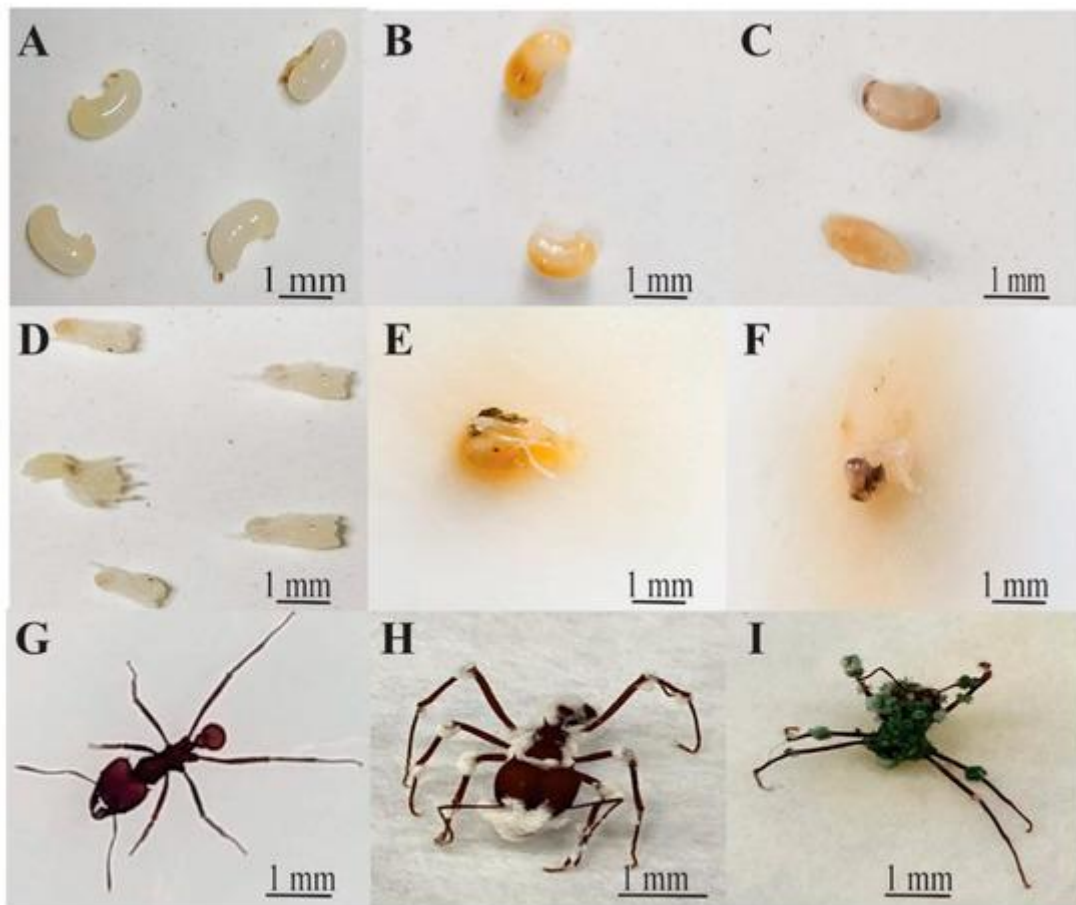


Figura 1. Estágios de *Atta sexdens rubropilosa* Forel 1908 (Hymenoptera: Formicidae) exposto aos diferentes entomopatógenos em condições de laboratório: (A) pupas saudáveis; (B) pupas expostas a *Beauveria bassiana*; (C) pupas expostas a *Trichoderma harzianum*; (D) larvas saudáveis; (E) larvas expostas a *Beauveria bassiana*; (F) larvas expostas a *Trichoderma harzianum*; (G) operária saudável; (H) operária exposta a *Beauveria bassiana*; (I) operária exposta a *Trichoderma harzianum*.

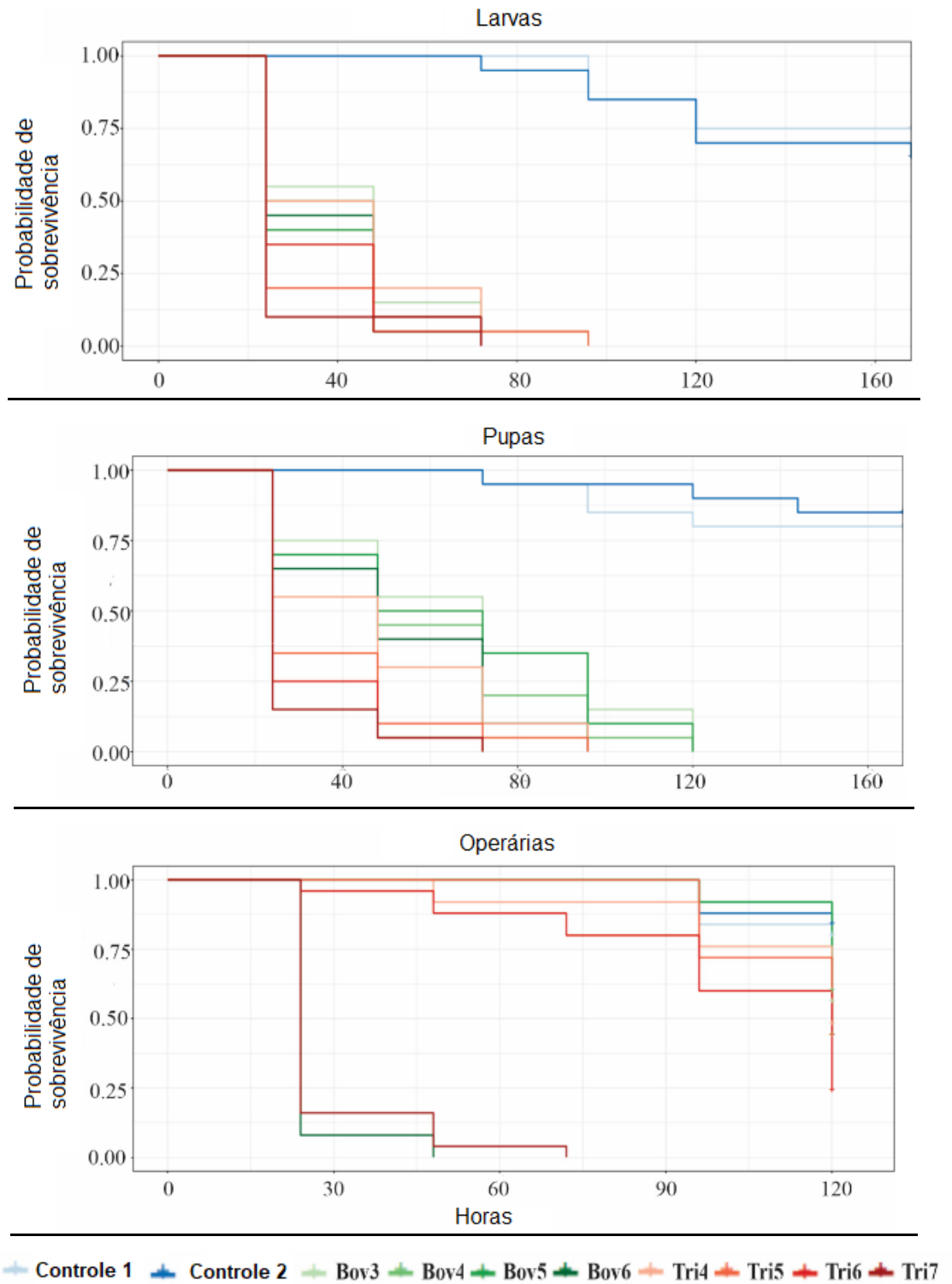


Figura 2. Curva de sobrevivência de larvas, pupas e operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel 1908 (Hymenoptera: Formicidae) imersas em suspensões de *Beauveria bassiana* e *Trichoderma harzianum*

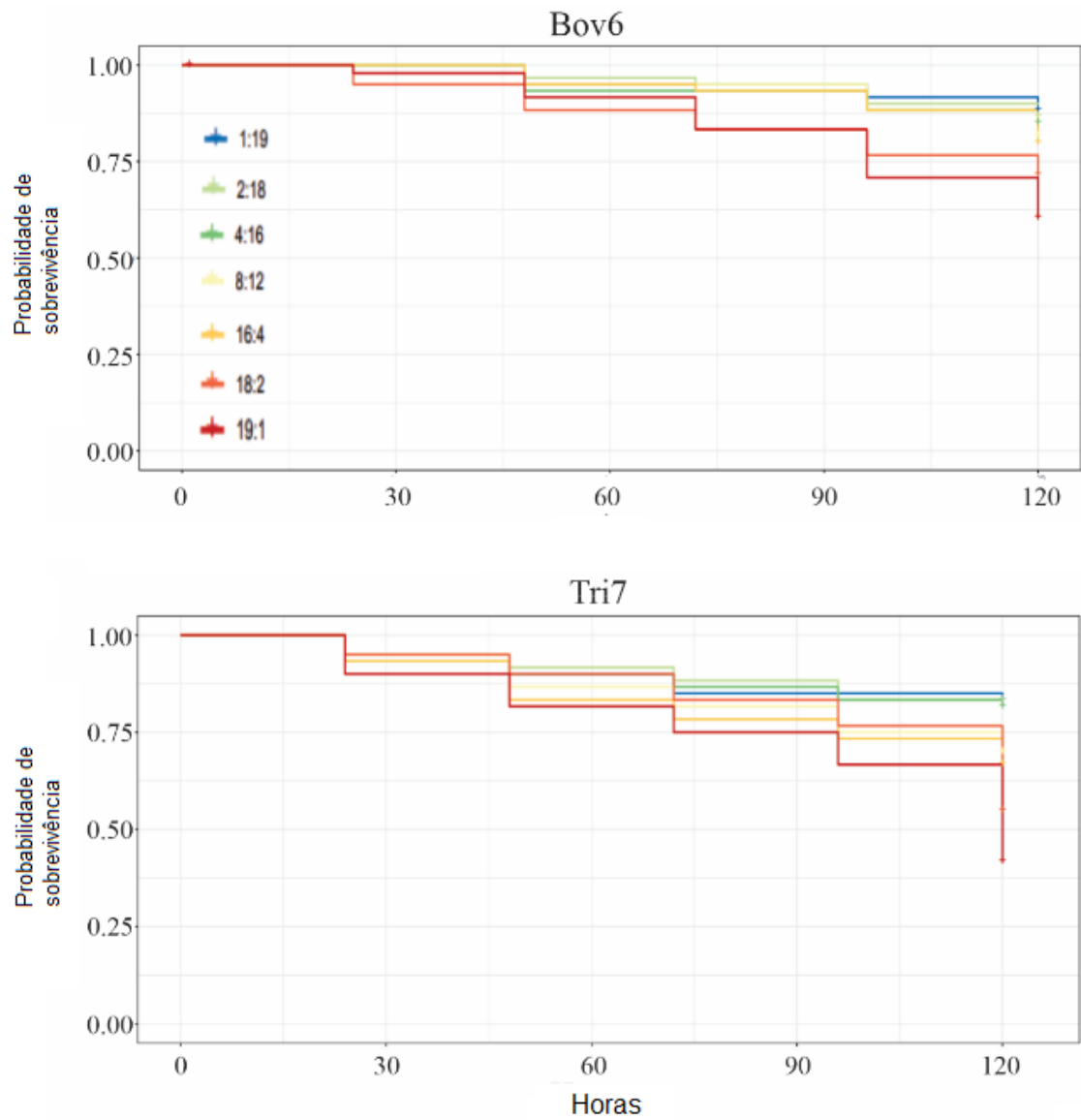


Figura 3. Curva de sobrevivência de grupos de operárias *Atta sexdens rubropilosa* Forel 1908 (Hymenoptera: Formicidae) imersas em suspensões de *Beauveria bassiana* (Bov6) e *Trichoderma harzianum* (Tri7).

Tabela 1. Tempos letais (TL₅₀) em horas para a atividade entomopatogênica dos fungos *Beauveria Bassiana* e *Trichoderma harzianum* contra *Atta sexdens rubropilosa* Forel 1908 (Hymenoptera: Formicidae) larvas, pupas e adultos (operárias) (n = 20)

Tratamentos	Larvas				Pupas				Adultos			
	TL ₅₀	IC 95%	X ²	p-valor	TL ₅₀	IC 95%	X ²	p-valor	TL ₅₀	IC 95%	X ²	p-valor
Bov3	26,184	17,57-32,741	0,679	0,878	45.581	34.662-55.663	5,4560	0,141	125,746	116,547–158,214	0,056	0,997
Bov4	23.479	14.619-29.762	1.483	0,686	37,854	28,268-46,196	3.0391	0,386	125.576	115.837-163.423	0,082	0,994
Bov5	21.491	11.663-27.629	0,951	0,813	41.710	30.585-51.501	5,8373	0,120	117,410	110,806-129,714	0,016	0,999
Bov6	22.870	14,551-28,002	0,201	0,977	33,641	25,116-40,931	4.0577	0,255	9,949	0,00049-18,707	0,739	0,864
Tri4	25,251	15,755-32,280	1.322	0,724	28,602	18.930-36.142	3.043	0,385	129.563	107,324–204,560	2.980	0,395
Tri5	21.088	10,072-28,675	1,133	0,769	18.630	6,930-26,471	0,896	0,826	113,733	105.355–129.468	1.575	0,665
Tri6	20.040	9,006–25,808	0,299	0,960	16.450	2.848-23.398	0,452	0,929	99,269	84,208-127,522	5,329	0,149
Tri7	7,385	0,000-18,387	2.751	0,432	11,503	0,0026-20,453	0,723	0,868	12,431	0,307–20,157	0,585	0,899

Tabela 2. Valor de p da análise de sobrevivência para larvas, pupas e adultos (operárias) de *Atta sexdens rubropilosa* Forel 1908 (Hymenoptera: Formicidae)

Trat	Estágio	Controle 1	Controle 2	Bov3	Bov4	Bov5	Bov6	Tri4	Tri5	Tri6
Controle 2	Larvas	0,690	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pupas	0,670	-	-	-	-	-	-	-	-
	Adultos	0,764	-	-	-	-	-	-	-	-
Bov3	Larvas	$4,16 \times 10^{-4}$	$6,41 \times 10^{-4}$	-	-	-	-	-	-	-
	Pupas	$4,90 \times 10^{-6}$	$3,32 \times 10^{-4}$	-	-	-	-	-	-	-
	Adultos	0,180	0,089	-	-	-	-	-	-	-
Bov4	Larvas	$9,55 \times 10^{-4}$	$1,02 \times 10^{-5}$	0,690	-	-	-	-	-	-
	Pupas	$7,85 \times 10^{-4}$	$1,48 \times 10^{-5}$	0,330	-	-	-	-	-	-
	Adultos	0,262	0,136	0,820	-	-	-	-	-	-
Bov5	Larvas	$3,61 \times 10^{-4}$	$3,61 \times 10^{-4}$	0,448	0,690	-	-	-	-	-
	Pupas	$3,37 \times 10^{-5}$	$2,98 \times 10^{-5}$	0,735	0,486	-	-	-	-	-
	Adultos	0,048	0,019	0,500	0,363	-	-	-	-	-
Bov6	Larvas	$3,61 \times 10^{-4}$	$4,16 \times 10^{-4}$	0,448	0,690	0,982	-	-	-	-
	Pupas	$3,32 \times 10^{-5}$	$1,38 \times 10^{-5}$	0,087	0,468	0,154	-	-	-	-
	Adultos	$7,5 \times 10^{-13}$	$7,5 \times 10^{-13}$	$7,5 \times 10^{-13}$	$7,5 \times 10^{-13}$	$7,5 \times 10^{-13}$	-	-	-	-
Tri4	Larvas	$3,61 \times 10^{-4}$	$5,81 \times 10^{-4}$	0,991	0,690	0,448	0,448	-	-	-
	Pupas	$1,99 \times 10^{-5}$	$7,39 \times 10^{-4}$	0,042	0,254	0,078	0,631	-	-	-
	Adultos	0,044	0,019	0,421	0,322	0,820	$2,8 \times 10^{-12}$	-	-	-
Tri5	Larvas	$3,61 \times 10^{-4}$	$3,61 \times 10^{-4}$	0,321	0,381	0,690	0,690	0,374	-	-
	Pupas	$6,49 \times 10^{-4}$	$3,17 \times 10^{-4}$	0,003	0,019	0,006	0,064	0,120	-	-

Trat	Estágio	Controle 1	Controle 2	Bov3	Bov4	Bov5	Bov6	Tri4	Tri5	Tri6
	Adultos	0,026	0,010	0,302	0,217	0,640	$7,5 \times 10^{-13}$	0,835	-	-
Tri6	Larvas	$3,61 \times 10^{-4}$	$3,61 \times 10^{-4}$	0,302	0,448	0,690	0,690	0,310	0,919	-
	Pupas	$3,17 \times 10^{-4}$	$3,17 \times 10^{-4}$	0,001	0,002	0,001	0,005	0,028	0,414	-
	Adultos	0,001	$9,1 \times 10^{-5}$	0,010	0,006	0,037	$2,2 \times 10^{-11}$	0,107	0,136	-
Tri7	Larvas	$3,61 \times 10^{-4}$	$4,16 \times 10^{-4}$	0,084	0,130	0,416	0,366	0,119	0,690	0,603
	Pupas	$3,17 \times 10^{-4}$	$3,17 \times 10^{-4}$	$9,56 \times 10^{-9}$	0,001	0,001	0,002	0,012	0,211	0,631
	Adultos	$3,7 \times 10^{-13}$	$3,7 \times 10^{-13}$	$3,7 \times 10^{-13}$	$3,7 \times 10^{-13}$	$3,7 \times 10^{-13}$	0,349	$2,1 \times 10^{-12}$	$3,7 \times 10^{-13}$	$3,7 \times 10^{-11}$

* valores de p significativo em negrito ($p < 0,05$).

Tabela 3. Valor de p da análise de sobrevivência para grupos de operárias *Atta sexdens rubropilosa* Forel 1908 (Hymenoptera: Formicidae) contaminadas com *Beauveria bassiana* (Bov6) e *Trichoderma harzianum* (Tri7)

Grupo	Tratar	1:19	2:18	4:16	8:12	16: 4	18: 2
2:18	Bov6	0,820	-	-	-	-	-
	Tri7	0,977	-	-	-	-	-
4:16	Bov6	0,727	0,820	-	-	-	-
	Tri7	0,865	0,865	-	-	-	-
8:12	Bov6	0,517	0,661	0,766	-	-	-
	Tri7	0,165	0,165	0,216	-	-	-
16: 4	Bov6	0,439	0,517	0,661	0,820	-	-
	Tri7	0,093	0,093	0,137	0,810	-	-
18: 2	Bov6	0,074	0,111	0,182	0,364	0,439	-
	Tri7	0,010	0,010	0,017	0,236	0,433	-
19: 1	Bov6	0,016	0,018	0,029	0,062	0,074	0,506
	Tri7	0,0001	0,0001	0,0002	0,018	0,048	0,181

* valores de p significativo em negrito ($p < 0,05$).

CAPÍTULO 2

CONTROLE BIOLÓGICO EM FORMIGAS CORTADEIRAS, *Atta sexdens* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE), USANDO FUNGOS ENTOMOPATOGENICOS²

Tarcísio Marcos Macedo Mota Filho^{2*}, Luis Eduardo Pontes Stefanelli², Roberto da Silva Camargo³, Carlos Alberto Oliveira de Matos⁴ e Luiz Carlos Forti⁵

² Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Botucatu, SP - Brasil. E-mail: <tarcisio972010@hotmail.com> e <luis.stefanelli@unesp.br>.

³ Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Doutor em Agronomia, Botucatu, SP - Brasil. E-mail: <camargobotucatu@yahoo.com.br>.

⁴ Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Departamento de Engenharia Industrial Madeireira, Itapeva, SP - Brasil. E-mail: <carlos.matos@unesp.br>.

⁵ Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Departamento de Produção Vegetal, Botucatu, SP - Brasil. E-mail: <luiz.forti@unesp.br>.

*Autor correspondente

Mota Filho, T. M. M., Stefanelli, L. E. P., Camargo, R. D. S., Matos, C. A. O. D., e Forti, L. C. BIOLOGICAL CONTROL IN LEAF-CUTTING ANTS, *Atta sexdens* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE), USING PATHOGENIC FUNGI. **Revista Árvore**, v. 45, 2021. doi.org/10.1590/1806-908820210000016

<https://www.scielo.br/j/rarv/a/5JbLR8QrJYm4k4HMxGyQmLq/#>

RESUMO – O controle químico com iscas tóxicas contendo o ingrediente ativo sulfluramida a 0,3% (p/p) é o principal método de controle de formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*. No entanto, desde 2009, quando a sulfluramida foi incluída no Anexo B da Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes, há uma intensa busca por novos métodos que sejam eficientes no controle desses insetos. Dentre os novos métodos, o controle biológico por fungos

² Capítulo redigido de acordo com as normas do periódico Árvore, onde foi publicado.

entomopatogênicos tem mostrado resultados promissores em condições de laboratório. O objetivo deste estudo, dado o contexto apresentado, foi avaliar o potencial dos fungos **Beauveria bassiana** e **Trichoderma harzianum** no controle de **Atta sexdens**. Colônias de **A. sexdens** foram expostas aos fungos por meio de iscas formuladas fornecidas em câmara de forrageamento, ou de suspensões pulverizadas no jardim de fungos, e tiveram suas alterações comportamentais registradas durante 21 dias. Para ambas as formulações, foram utilizadas concentrações de 10 e 20% (p/p) dos fungos em estudo. Os resultados permitiram concluir que iscas contendo 10 e 20% (p/p) dos fungos **B. bassiana** e **T. harzianum** não foram eficientes no controle de colônias de **A. sexdens**. Por outro lado, a pulverização de suspensões de 20% (p/p) de **B. bassiana** e 10% e 20% (p/p) de **T. harzianum** foi eficiente e resultou em 100% de mortalidade das colônias aos 11, 9 e 7 dias após a aplicação, respectivamente. Esses achados indicam que os fungos **B. bassiana** e **T. harzianum** são promissores como agentes de controle de colônias de **A. sexdens**, quando pulverizados sobre o jardim de fungos, embora ainda existam alguns desafios quanto ao seu uso relacionados ao desenvolvimento de tecnologias para a aplicação do patógeno.

Palavras-Chave: Attini, **Beauveria bassiana**, **Trichoderma harzianum**

2.1 INTRODUÇÃO

As formigas cortadeiras do gênero *Atta* Fabricius, 1805 e *Acromyrmex* Mayr, 1865 (Hymenoptera: Formicidae) são insetos eussociais desfolhadores que ocorrem exclusivamente na região Neotropical (Schultz e Meier, 1995). Pelo fato delas cultivarem o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* necessário para sua alimentação, podem realizar o corte de várias espécies de plantas de interesse econômico, e são apontadas como as principais pragas de plantios florestais, da agricultura e áreas de pastagens (Montoya-Lerma et al., 2012).

O método químico é o único com tecnologia disponível visando o controle das formigas cortadeiras para uso em pequena, média e grande escala, destacando-se a termonebulização, o pó seco e as iscas formicidas como as técnicas mais eficientes (Della Lucia et al., 2014). Dentre essas técnicas de controle, o emprego de iscas formicidas é a mais utilizada atualmente, em virtude da sua elevada viabilidade econômica e operacional (Britto et al., 2016). As iscas formicidas são compostas por uma mistura de um princípio ativo que atua por ingestão, dissolvido em óleo de soja e incorporado a um substrato atrativo (polpa cítrica desidratada) prensado em forma de pellets (Verza et al., 2006). A sulfluramida é o ingrediente ativo mais comum nessas iscas, pois é eficiente no controle de todas as espécies de formigas cortadeiras (Britto et al., 2016).

No entanto, a produção e a degradação da sulfluramida por mecanismos biológicos e abióticos no solo produzem perfluorooctanossulfonato (PFOS), um contaminante ambiental altamente persistente (Avendaño e Liu, 2015; Nascimento et al., 2018). Estudos têm associado a exposição a PFOS com perda de peso, redução do colesterol sérico e dos hormônios tireoidianos, além de efeitos hepatotóxicos e carcinogênicos em humanos e em alguns animais criados em condições de laboratório (Lau et al., 2004; Stahl et al., 2011). Por esta razão, em 2006, a Convenção de Estocolmo classificou o PFOS como um poluente orgânico persistente e o adicionou ao Anexo B, apesar de permitir que a produção de PFOS e substâncias relacionadas continuasse em países em desenvolvimento e recentemente industrializados, bem como sua aplicação, em uso condições de isenção, quando justificado (Löfstedt Gilljam et al., 2016). Assim, em 2009, o Brasil se tornou elegível e obteve o direito de continuar utilizando sulfluramida apenas para controlar formigas cortadeiras (gêneros

Atta e *Acromyrmex*) até que um novo ingrediente ativo igualmente eficaz seja encontrado para substituí-lo (Convenção de Estocolmo, 2009).

Nesse contexto, pesquisas têm sido realizadas nos últimos anos com o objetivo de desenvolver novas estratégias de controle economicamente viáveis e com menor impacto negativo ao meio ambiente, animais e humanos, a serem utilizadas no controle de formigas cortadeiras (Morini et al., 2005). Dentre essas estratégias, o controle biológico por meio do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Balsamo) para infectar operárias nas colônias, ou *Trichoderma* spp. como antagonista do fungo simbiótico, tem se mostrado promissor em condições de laboratório (Verma et al., 2007; Folgarait et al., 2011). Evidências adicionais foram apresentadas por Loureiro e Monteiro (2005), que relataram que isolados de *B. bassiana* proporcionaram mortalidade de 87% entre operárias em colônias de laboratório de *Atta sexdens* após quatro dias de aplicação, e por Ortiz e Orduz (2001), que verificaram, in vitro, que algumas cepas de *Trichoderma lignorum*, comumente encontradas no solo, inibem satisfatoriamente o crescimento micelial do simbionte de *A. cephalotes*.

No entanto, os resultados laboratoriais promissores geralmente obtidos com esses entomopatógenos não têm alta eficiência comprovada em nível de campo (Della Lucia et al., 2014) porque, em muitas condições naturais, as formigas associadas a seu fungo simbiótico são capazes de detectar e se recuperar da infecção por agentes patogênicos (Montoya-Lerma et al., 2012; Britto et al., 2016). Um dos principais mecanismos de defesa das formigas é a liberação de secreções glandulares antifúngicas. Essas secreções são produzidas e liberadas pelas glândulas metapleurais das formigas, que contêm compostos que impedem a germinação do patógeno e agem como um antibiótico, protegendo o organismo contra os patógenos (Morgan, 2008). A auto-limpeza, a limpeza mútua e a limpeza do ninho também podem ser a causa da baixa eficácia dos patógenos, ao lado da associação com bactérias da espécie *Pseudonocardia*, que atuam como verdadeiras amigas das formigas, formando uma barreira imunológica de defesa e inibindo a ação do parasita (Currie e Stuart, 2001; Mattoso et al., 2012). Além disso, as condições climáticas no interior do ninho podem influenciar no controle da dispersão do patógeno, por exemplo, e de conhecimento de que altas temperaturas e baixa umidade dificultam o desenvolvimento de entomopatógenos e fungos oportunistas em ninhos de formigas cortadeiras (Goffré e Folgarait, 2018).

Para contornar os efeitos dos mecanismos de defesa das formigas contra parasitas, autores como Specht et al. (1994) formularam esporos de fungos patogênicos em iscas tóxicas com diferentes ingredientes atrativos para evitar que os esporos fossem reconhecidos pelas operárias e, assim, desmontar seu mecanismo de defesa coletivo. Porém, mesmo quando diferentes ingredientes atrativos são utilizados, as iscas contendo fungos patogênicos precisam de muito tempo (cerca de 60 dias) para realizar um controle eficaz (Lopez e Orduz, 2003) ou mesmo para se mostrarem ineficazes (Britto et al., 2016). Isso pode ser explicado pelo fato da infecção fúngica ocorrer através da cutícula dos hospedeiros (Pereira e Stimac, 1997). Quando são utilizadas iscas contendo esporos de fungos, apenas o aparelho bucal entra em contato com os esporos, e é nessa área que se encontram várias substâncias antibióticas que acabam inativando a ação dos fungos (Little et al., 2006). Além disso, a cavidade infrabucal, uma estrutura de filtração dentro da cavidade oral das formigas, é um componente chave no comportamento higiênico desses insetos cortadores de folhas (Quinlan e Cherrett, 1978). Os esporos e restos potencialmente perigosos que as operárias acumulam enquanto se limpam ou arrancam do jardim de fungos são armazenados nessa cavidade (Bailey, 1920), que, uma vez preenchida, expelle o material comprimido da cavidade na forma de um pellet. Por esse motivo, segundo Pereira e Stimac (1997), as formulações fúngicas utilizadas para o controle das formigas devem promover o máximo contato entre os esporos dos fungos e a cutícula das formigas.

Diante disso, propomos que a pulverização de suspensões sobre o jardim de fungo pode ser uma alternativa quanto ao uso de fungos entomopatogênicos para o controle de formigas cortadeiras, uma vez que proporciona maior contato da cutícula das formigas com os fungos entomopatogênicos, possibilitando maior eficiência de controle. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência da pulverização de suspensões dos fungos *B. bassiana* e *T. harzianum* no controle de formigas cortadeiras e, adicionalmente, comparar a eficiência desta nova metodologia com a eficiência de iscas contendo conídios de *B. bassiana* e *T. harzianum*, ou o ingrediente ativo sulfluramida (0,3%).

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Colônias estudadas

Trinta e três colônias de *A. sexdens* com aproximadamente quatro meses de idade foram coletadas no município de Botucatu, estado de São Paulo, Brasil, e mantidas no Laboratório de Insetos Pragas Sociais (LISP), Faculdade de Ciências Agrárias, UNESP, Botucatu. Cada colônia continha um recipiente para o jardim de fungo, e estes foram alimentados com folhas de *Acalypha* spp. (Euphorbiaceae). As colônias foram submetidas à temperatura de 24 ± 2 ° C, umidade relativa de 80% e fotoperíodo de 12 horas de luz.

2.2.2 Preparação das Suspensões

Para o preparo das suspensões, foram utilizados dois produtos comerciais da empresa Koppert Biological Systems®: o Boveril WP PL63® composto por 5% de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., cepa PL63 (mínimo de 1.0×10^8 conídios viáveis g⁻¹) e o Trichodermil SC 1306® composto por 4.8% de *Trichoderma harzianum* (Rifai), cepa ESALQ-1306 (mínimo de 2.0×10^9 conídios viáveis ml⁻¹).

Para a obtenção das suspensões nas concentrações de 10 e 20% (p/p) cada produto comercial foi misturado individualmente em solução aquosa de água destilada e Tween 80® a 1%, e homogeneizado durante dois minutos com o auxílio de um bastão de vidro (Adaptado de Currie e Stuart, 2001). O tratamento controle consistiu de solução aquosa de água destilada e Tween 80® 1%. Posteriormente, as suspensões foram armazenadas individualmente em béqueres de 50.0 ml envolvidos em papel-alumínio até a pulverização do produto.

2.2.3 Preparação das iscas

Polpas cítricas provenientes de cultivo orgânico foram desidratadas em estufa a 50 °C por 72 horas e posteriormente trituradas até a obtenção de um pó. Para a obtenção de pastas com diferentes concentrações dos produtos em estudo e dos tratamentos controle, a polpa cítrica em pó, a carboximetilcelulose, o óleo de soja e o produto comercial (Boveril WP PL63® ou Trichodermil SC 1306®) foram misturados em 2,5 ml de água destilada. Para as pastas contendo 10% dos produtos utilizou-se 70% de polpa cítrica em pó, 15% de carboximetilcelulose, 5% de óleo de soja e 10% dos produtos. Para iscas com 20% utilizaram-se as mesmas porcentagens de óleo de

soja e carboximetilcelulose, no entanto, utilizou-se somente 60% de polpa cítrica em pó. Além disso, realizaram-se dois tratamentos controle: Controle 1 (testemunha) constituído por polpa cítrica em pó (80%), carboximetilcelulose (15%), óleo de soja (5%); e Controle 2 (padrão), constituído por polpa cítrica em pó (79.7 %), carboximetilcelulose (15%), óleo de soja (5%) e sulfluramida (0,3%). A pasta obtida foi colocada em uma seringa de 60.0 ml para produzir os pellets (Adaptado de Sousa et al., 2017). As iscas foram deixadas para secar à temperatura de 25 ± 2 °C por 24 h e posteriormente cortadas com o comprimento de aproximadamente 2 mm semelhante ao da isca comercial padrão.

2.2.4 Efeito dos fungos *Beauveria bassiana* e *Trichoderma harzianum* em colônias de *A. sexdens*.

As colônias de *A. sexdens* contendo aproximadamente 350.0 cm³ de jardim de fungo, foram distribuídas em quatro colônias para cada isca e suspensão em estudo, totalizando quarenta e quatro colônias. Posteriormente, o lixo e os restos de folhas foram retirados das câmaras de lixo e de forrageamento e as colônias ficaram sem receber o substrato vegetal por 24 horas. Após esse período, cada colônia recebeu 0.3 g de isca na arena de forrageamento ou a pulverização de 10.0 ml de suspensão no jardim de fungo. Nas colônias que receberam a suspensão, a aplicação foi realizada com borrifador manual de 500.0 ml, simulando uma aplicação convencional de produto fitossanitário.

As avaliações foram realizadas no 1°, 2°, 3°, 5°, 7°, 9°, 11°, 14°, 17° e 21° dias após o fornecimento da isca e a aplicação da suspensão, conforme metodologia de Nagamoto et al. (2004). Para as colônias que receberam iscas na câmara de forrageamento foram avaliadas as seguintes variáveis: porcentagem de carregamento dos pellets, incorporação dos pellets, corte de folhas, operárias com sintomas de intoxicação, operárias mortas, presença de fungos contaminantes e morte da colônia. Para as colônias que receberam a aplicação da suspensão no jardim de fungo avaliaram-se somente a porcentagem de corte de folhas, operárias com sintomas de intoxicação, operárias mortas, presença de fungos contaminantes e morte da colônia. As avaliações seguiram uma escala de quantificação visual variando de 0 a 100%.

2.2.5 Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos a uma análise de variância não paramétrica, o teste de Friedman, seguida por um teste de comparação múltipla post-hoc utilizando o critério da diferença mínima significativa de Fisher (LSD). Em ambos os testes considerou o nível de significância igual 5% ($\alpha = 0,05$). Utilizou-se o ambiente R versão 4.0.0 para a computação estatística (R Core Team, 2020).

2.3 RESULTADOS

Após a pulverização das suspensões, o corte de folhas foi significativamente afetado, sendo que a suspensão contendo *T. harzianum* 20% foi responsável por proporcionar as menores porcentagens de corte de folhas (Tabela 1). Maiores porcentagens de operárias com sintoma de intoxicação, operárias mortas e presença de fungos contaminantes foram observados nas colônias que receberam a pulverização da suspensão *T. harzianum* 20%. De modo geral, as suspensões dos fungos em estudo ocasionaram a morte das colônias, exceto para as colônias que receberam a suspensão contendo *B. bassiana* 10% (Figura 1).

No primeiro dia de avaliação, 100% dos pellets foram transportados para o jardim de fungos das colônias, exceto os pellets no tratamento com *T. harzianum* 20% (Tabela 1). Porém, para ambos os tratamentos, 100% dos pellets transportados foram incorporados ao jardim de fungos. A menor porcentagem de corte de folhas foi encontrada no controle padrão (Sulfluramida 0,03%). Além disso, os tratamentos *B. bassiana* 20% e *T. harzianum* 20% apresentaram menor porcentagem de corte de folhas em relação ao controle, *B. bassiana* 10% e *T. harzianum* 10%. Apenas o controle padrão, *B. bassiana* 20% e *T. harzianum* 20% proporcionaram a intoxicação de operárias. As iscas contendo diferentes fungos não causaram a morte das operárias, presença de fungos contaminantes e a morte das colônias (Figura 1). Por outro lado, o controle padrão ocasionou a morte de operárias, presença de fungos contaminantes e a morte das colônias.

2.4 DISCUSSÃO

Os presentes resultados expressaram que as suspensões líquidas de esporos utilizadas interferiram na sobrevivência das operárias e no crescimento de fungos contaminantes no jardim de fungos. Assim, o objetivo de quebrar as barreiras de defesa das formigas cortadeiras com uma nova metodologia foi alcançado,

principalmente comparando a pulverização da suspensão de conídios com o controle padrão (sulfluramida 0,3%). As colônias expostas à pulverização por *T. harzianum* apresentaram mortalidade de 100% nos tratamentos *T. harzianum* 20% e *T. harzianum* 10%. O agente de controle biológico *T. harzianum* controla os fungos ascomicetos, deuteromicetos e basidiomicetos. Por ser nesta última categoria que se enquadra o fungo simbiótico cultivado por formigas cortadeiras (*Leucoagaricus gongylophorus*), o *T. harzianum* pode atuar com duas estratégias de controle distintas: as formigas, além de terem sua morte causada por micotoxinas como os tricotecenos, também pode morrer de fome. Além disso, esse agente biológico produz metabólitos que impedem a germinação de esporos (fungistase), causando a morte das células (antibiose) (Cuervo-Mulet et al., 2008). Este fungo ainda compete por espaço e nutrientes (Benitez et al., 2004), e isso pode ser visto pelo alto crescimento de *T. harzianum* no jardim de fungos, provavelmente devido ao fungo ter encontrado um substrato adequado para se desenvolver na colônia. Sabe-se que esse patógeno tem sido reconhecido como uma espécie ubíqua que coloniza os mais diversos substratos e nichos ecológicos (Kubicek et al., 2003).

Quando se trata de *B. bassiana*, a patogenicidade também está diretamente relacionada à produção de micotoxinas, como a beauvericina. As micotoxinas são metabólitos fúngicos secundários que fazem parte dos mecanismos de infecção e podem permitir uma resposta tóxica em diferentes organismos. Eles são produzidos por uma série de reações consecutivas, que são catalisadas por enzimas intermediárias do metabolismo primário (Volcy e Pardo, 1994). *Beauveria bassiana* também produz as toxinas oosporeína, bassianolida e beauveriolida, que são peptídeos estruturalmente relacionados à beauvericina, cuja toxicidade para animais, plantas e insetos ainda é pouco conhecida (Namatame et al., 1999) e cuja contribuição para a mortalidade de operárias nos tratamentos com *B. bassiana* 10% e *B. bassiana* 20% merecem mais pesquisas. A ação desse fungo sobre o inseto é facilitada pela ação de uma grande variedade de metabólitos secundários produzidos durante o processo de infecção. O patógeno passa a germinar os conídios e produzir hifas na cutícula do inseto (Arboleda et al., 2004). As hifas invasivas são capazes de penetrar nas articulações (Castellanos, 1997) e aparelhos bucais, iniciando uma atividade de degradação na cutícula e atingindo a hemocela, onde o patógeno também crescerá e, em muitos casos, evoluirá e colonizará todo o inseto. Além disso, toxinas são liberadas a fim de bloquear o desenvolvimento fisiológico do inseto e podem causar a

morte deste (Paterson et al., 1994; Castellanos, 1997). Esses processos determinam a gravidade da doença produzida e a capacidade do fungo em bloquear os mecanismos de resposta imune do inseto (Abbas et al., 1995).

Em formigas cortadeiras, a ação dos agentes patogênicos varia dependendo da casta e do indivíduo, sendo alguns indivíduos mais suscetíveis do que outros, e dependendo da forma de aplicação do fungo utilizada (Diehl-Fleig et al., 1988), conforme observado em o presente estudo, no qual a forma de aplicação foi eficiente na relação fungo-hospedeiro patógeno e contribuiu decisivamente para um controle efetivo. A metodologia de aplicação de fungos por pulverização mostrou-se mais eficiente do que o controle com formicidas. Considerando as evidências de que ambas as formulações possuíam a mesma proporção de produto formulado, é pertinente a hipótese de que a eficiência pode ter decorrido principalmente do tipo de formulação e aplicação do produto.

Para se defenderem de patógenos causadores de doenças, os insetos sociais desenvolveram uma série de defesas sofisticadas nos níveis individuais e coletivas (Cremer et al., 2018). Os insetos sociais são capazes de encontrar patógenos fúngicos rapidamente e ajustar imediatamente seu comportamento e fisiologia para formar uma nova estrutura de rede para se defender (Stroeymeyt et al., 2018). Embora seu mecanismo de reconhecimento de toxinas seja desconhecido, as toxinas fúngicas realmente são capazes de induzir imunidade social (Liu et al., 2019), principalmente entre as operárias, conforme observado nos tratamentos em que foram fornecidas iscas tóxicas.

Foi possível observar que a sanidade do jardim de fungos começou a declinar imediatamente antes do aumento da mortalidade das formigas, sugerindo que as formigas expostas às toxinas dos fungos *T. harzianum* e *B. bassiana* podem ter cessado o comportamento de exercer atividades na colônia, como limpeza do jardim de fungo, limpeza mutua e a auto-limpeza, etc. Embora esse modelo tenha sido aplicado em condições de laboratório, seus resultados mostraram uma série de características referentes à biologia social das formigas cortadeiras em condições de campo, onde são organismos extremamente eficientes como para a eliminação dos riscos biológicos.

De fato, no presente estudo, as formigas foram capazes de reconhecer e reagir de forma extremamente rápida à presença de patógenos nas duas doses aplicadas de iscas tóxicas, podendo também exibir comportamentos como isolar e cobrir o

material contaminante, além de retirar pedaços de fungo contendo o material contaminado por toxinas, em 24 horas. O gênero *Atta* não foi afetado pela isca contendo os fungos, provavelmente devido à ecologia do grupo; assim, o processo de trofalaxia era improvável e a consequente contaminação dos indivíduos da colônia, visto que apenas algumas formigas que tiveram contato com o material peletizado apresentavam leve sintoma de intoxicação. Essas toxinas são suprimidas com o auxílio de estratégias de defesa, como a secreção de compostos antibióticos que podem reduzir a viabilidade dos esporos, enquanto a auto-limpeza e a limpeza mútua podem reduzir o número e, possivelmente, a viabilidade dos esporos na cutícula (Hughes et al., 2002). Porém, utilizando a metodologia de pulverização, o material não pôde ser separado, pois as formigas já possuíam uma grande quantidade de toxinas impregnadas em todo o seu tegumento. Além disso, no processo de pulverização, o jardim de fungos também foi alvo de pulverização de conídios, dificultando a limpeza do fungo simbiótico pelas operárias.

A mortalidade no tratamento *B. Bassiana* 20% foi de 100%, indicando um valor expressivo para a mortalidade dos indivíduos em relação ao grupo controle.

Além disso, houve alta mortalidade entre as operárias menores e, conforme sugerido por Jaccoud et al. (1999), a casta das pequenas operárias pode desempenhar um papel fundamental na defesa contra doenças. Provavelmente, pequenas operárias possuem glândulas proporcionalmente menores, com menor produção e liberação de antibióticos, portanto, nesta casta, ocorrem maiores taxas de mortalidade (Vieira, 2015).

A busca por métodos alternativos de controle das formigas cortadeiras tem se intensificado no sentido de substituir os agrotóxicos tradicionais aplicados principalmente a partir de outras substâncias com maior especificidade, menor persistência e maior segurança para o meio ambiente. Um grupo promissor de fungos entomopatogênicos pode ser usado como agente de controle biológico para formigas cortadeiras, incluindo os fungos *T. harzianum* e *B. bassiana* atuando como bioinseticidas. Porém, a aplicação de iscas formuladas com patógenos não apresenta boas perspectivas de uso, principalmente devido às estratégias de defesa das formigas cortadeiras. O presente estudo comprovou que o controle biológico em formigas cortadeiras pode ser uma realidade em um futuro próximo. No entanto, ainda existem alguns desafios para sua utilização, que incluem aprimorar a tecnologia de aplicação do patógeno para que esse produto chegue às colônias de forma eficaz, e

que justificam incentivos a investimentos em pesquisas na área. Os fungos avaliados mostraram seu potencial como agentes de controle contra operárias de *A. sexdens* quando pulverizados no jardim de fungos.

2.5 CONCLUSÃO

Os fungos *Beauveria bassiana* e *Trichoderma harzianum* demonstraram potencial como agentes de controle de colônias de *Atta sexdens* quando pulverizados no jardim de fungos. Assim, apresentamos novas perspectivas sobre o uso do controle biológico para colônias de formigas cortadeiras.

2.6 CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

T.M.M.M.F., L.E.P.S., R.d.S.C., L.C.F. e C.A.O.d.M. escreveram o manuscrito; R.d.S.C. e L.C.F. conceberam e projetaram os experimentos; T.M.M.M.F. e L.E.P.S. realizaram os experimentos; L.C.F. contribuiu com reagentes/materiais/ferramentas de análise. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito

2.7 REFERÊNCIAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Revinter; 1995.

Arboleda VJW, Delgado BF, Valencia JA. Detección de beauvericina en el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* mediante el uso de anticuerpos policlonales. *Revista Colombiana de Entomología*. 2004; 30(2): 125–130.

Avendaño SM, Liu J. Production of PFOS from aerobic soil biotransformation of two perfluoroalkyl sulfonamide derivatives. *Chemosphere*. 2015; 119:1084–1090. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.09.059>

Bailey IW. Some relations between ants and fungi. *Ecology*. 1920; 1(3):174–189. doi: <https://doi.org/10.2307/1929134>

Benítez T, Rincón AM, Limón MC, Codon AC. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. 2004; 7(4): 249-260. doi: <https://doi.org/10.2436/im.v7i4.9480>

Britto JS, Forti LC, Oliveira MA, Zanetti R, Wilcken CF, Zanuncio JC, et al. Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. *International Journal of Research in Environmental*. 2016; 3: 11–92.

Castellanos D. Importancia en la patogenicidad de la acción enzimática el hongo *Beauveria bassiana* sobre la broca del café. *Revista Colombiana de Entomología*. 1997; 23:65–71.

Cremer S, Pull CD, Fuerst MA. Social immunity: emergence and evolution of colony-level disease protection. *Annual Review of Entomology*. 2018; 63:105-123. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043110>

Cuervo-Mulet RA, López-Villalobos ID, Trujillo-Perdomo JF, Fernández-Daza FF, Vélez-Correa SL. Riesgos en salud laboral asociados al uso de un bioinsecticida con esporas de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma lignorum*. *Entramado*. 2018; 14(2): 244-255. doi: <http://dx.doi.org/10.18041/1900-3803/entramado.2.4762>

Currie CR, Stuart AE. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 2001; 268(1471):1033-1039. doi: <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1605>

Della Lucia TM, Gandra LC, Guedes RN. Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. *Pest Management Science*. 2014; 70(1): 14-23. doi: <http://dx.doi.org/10.1002/ps.3660>

Diehl-Fleig E, Silva ME, Pacheco MRM. Testes de patogenicidade dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em *Atta sexdens* piriventris (Santschi, 1919) em diferentes temperaturas. *Ciência e Cultura*. 1988; 40: 1103–1105.

Folgarait P, Gorosito N, Poulsen M, Currie CR. Preliminary in vitro insights into the use of natural fungal pathogens of leaf-cutting ants as biocontrol agents. *Current Microbiology*. 2011; 63(3): 250. doi: <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9944-y>

Goffré D, Folgarait P. J. Insights into the biodiversity and causes of distribution of potential entomopathogens associated with leaf-cutting ants. *Insectes sociaux*. 2018; 65(1): 03-115. doi: 10.1007/s00040-017-0592-5.

Hughes WO, Eilenberg J, Boomsma JJ. Trade-offs in group living: transmission and disease resistance in leaf-cutting ants. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 2002; 269(1502):1811-1819. doi: <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2113>

Jaccoud DB, Hughes WOH, Jackson CW. The epizootiology of a *Metarhizium* infection in mininests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* *rubropilosa*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 1999; 93(1): 51-61. doi:

<https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.1999.00561.x>

Kubicek CP, Bissett J, Druzhinina I, Kullnig-Gradinger C, Szakacs G. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genetics and Biology*. 2003; 38(3):310-319. doi: [https://doi.org/10.1016/S1087-1845\(02\)00583-2](https://doi.org/10.1016/S1087-1845(02)00583-2)

Lau C, Butenhoff JL, Rogers JM. The developmental toxicity of perfluoroalkyl acids and their derivatives. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2004; 198(2): 231-241. doi: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.11.031>

Little AE, Murakami T, Mueller UG, Currie CR. (2006). Defending against parasites: fungus-growing ants combine specialized behaviours and microbial symbionts to protect their fungus gardens. *Biology Letters*. 2006; 2(1): 12-16. doi: <https://doi.org/10.1098/rsbl.2005.0371>

Liu L, Zhao XY, Tang QB, Lei CL, Huang QY. The mechanisms of social immunity against fungal infections in eusocial insects. *Toxins*. 2019; 11(5):244. doi: <https://doi.org/10.3390/toxins11050244>

Löfstedt Gilljam J, Leonel J, Cousins IT, Benskin JP. Is ongoing sulfluramid use in South America a significant source of perfluorooctanesulfonate (PFOS)? Production inventories, environmental fate, and local occurrence. *Environmental Science & Technology*. 2016; 50(2): 653-659. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b04544>

Lopez E, Orduz S. *Metarhizium anisopliae* and *Trichoderma viride* for control of nests of the fungus-growing ant, *Atta cephalotes*. *Biological Control*. 2003; 27(2): 194-200. doi: [https://doi.org/10.1016/S1049-9644\(03\)00005-7](https://doi.org/10.1016/S1049-9644(03)00005-7)

Loureiro ES, Monteiro AC. Patogenicidade de isolados de três fungos entomopatogênicos a soldados de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae). *Revista Árvore*. 2005; 29: 553–561. doi: 10.1590/S0100-67622005000400007.

Mattoso TC, Moreira DD, Samuels RI. Symbiotic bacteria on the cuticle of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* protect workers from attack by entomopathogenic fungi. *Biology Letters*. 2012; 8(3): 461-464. doi: <https://doi.org/10.1098/rsbl.2011.0963>

Montoya-Lerma J, Giraldo-Echeverri C, Armbrrecht I, Farji-Brener A, Calle Z. Leaf-cutting ants revisited: towards rational management and control. *International Journal of Pest Management*. 2012; 58(3): 225-247. doi: <http://dx.doi.org/10.1080/09670874.2012.663946>

Morgan ED. Chemical sorcery for sociality: exocrine secretions of ants (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecol News*. 2008; 11: 79–90.

Morini MSC, Bueno OC, Bueno FC, Leite AC, Hebling MJA, Pagnocca FC, et al. Toxicity of sesame seed to leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*. 2005; 45(1): 195–204.

Nagamoto NS, Forti LC, Andrade APP, Boaretto MAC, Wilcken CF. Method for the evaluation of insecticidal activity over time in *Atta sexdens rubropilosa* workers (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*. 2004; 44(2): 413-432.

Namatame I, Tomoda H, Tabata N, Si S, Omura S. Structure elucidation of fungal Beauveriolide-III, a novel inhibitor of lipid droplet formation in mouse macrophages. *The Journal of Antibiotics*. 1999; 52(1): 7-12. doi: <https://doi.org/10.7164/antibiotics.52.7>

Nascimento RA, Nunoo DBO, Bizkarguenaga E, Schultes L, Zabaleta I, Benskin JP, et al. Sulfluramid use in Brazilian agriculture: A source of per-and polyfluoroalkyl substances (PFASs) to the environment. *Environmental Pollution*. 2018; 242: 1436-1443. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.122>

Ortiz A, Orduz S. In vitro evaluation of *Trichoderma* and *Gliocladium* antagonism against the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. *Mycopathologia*.

2001;150(2):53-60. doi: <https://doi.org/10.1023/A:1010843413085>

Paterson IC, Charnley AK, Cooper RM, Clarkson JM. Partial characterization of specific inducers of a cuticle-degrading protease from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Microbiology. 1994; 140(11): 3153-3159. doi: <https://doi.org/10.1099/13500872-140-11-3153>

Pereira RM, Stimac JL. Biocontrol options for urban pest ants. Journal of agricultural entomology. 1997; 14:231–248.

Quinlan RJ, Cherrett JM. Studies on the role of the infrabuccal pocket of the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hym., Formicidae). Insectes Sociaux. 1978; 25(3): 237-245. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/BF02224744>

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2020. Available: <https://www.R-project.org/>

Schultz TR, Meier R. A phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. Systematic Entomology. 1995; 20(4):337-370. doi: <https://doi.org/10.1111/j.13653113.1995.tb00100.x>

Sousa KKA, Camargo RS, Forti LC. Communication or toxicity: what is the effect of cycloheximide on leaf-cutting ant workers? Insects. 2017; 8(4): 126. doi: <http://dx.doi.org/10.3390/insects8040126>

Specht A, Diehl-Fleig E, Silva MD. Atratividade de iscas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. a formigas do gênero *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). Anais da Sociedade Entomológica do Brasil. 1994; (23): 99-104.

Stahl T, Mattern D, Brunn H. Toxicology of perfluorinated compounds. Environmental Sciences Europe. 2011; 23(1): 38. doi: <https://doi.org/10.1186/2190-4715-23-38>

Stockholm Convention. The new POPs under the Stockholm Convention. 2009.

Available:

<http://chm.pops.int/Convention/ThePOPs/TheNewPOPs/tabid/2511/Default.aspx>

Stroeymeyt N, Grasse AV, Crespi A, Mersch DP, Cremer S, Keller L. Social network plasticity decreases disease transmission in a eusocial insect. *Science*. 2018; 362(6417): 941-945. doi: <https://doi.org/10.1126/science.aat4793>

Verma M, Brar SK, Tyagi RD, Surampalli RY, Valero JR. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*. 2007; 37(1): 1-20. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.05.012>

Verza SS, Forti LC, Matos CA, Garcia MG, Nagamoto NS. Attractiveness of citrus pulp and orange albedo extracts to *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*. 2006; 47(2): 391-400.

Vieira AS, Camargo-Mathias MI, Roces F. Comparative morpho-physiology of the metapleural glands of two *Atta* leaf-cutting ant queens nesting in clayish and organic soils. *Arthropod Structure & Development*. 2015;44(5):444-454. doi: 10.1016/j.asd.2015.06.005.

Volcy CH, Pardo V. Principios de micología. Medellín: Universidad Nacional de Colombia; 1994.

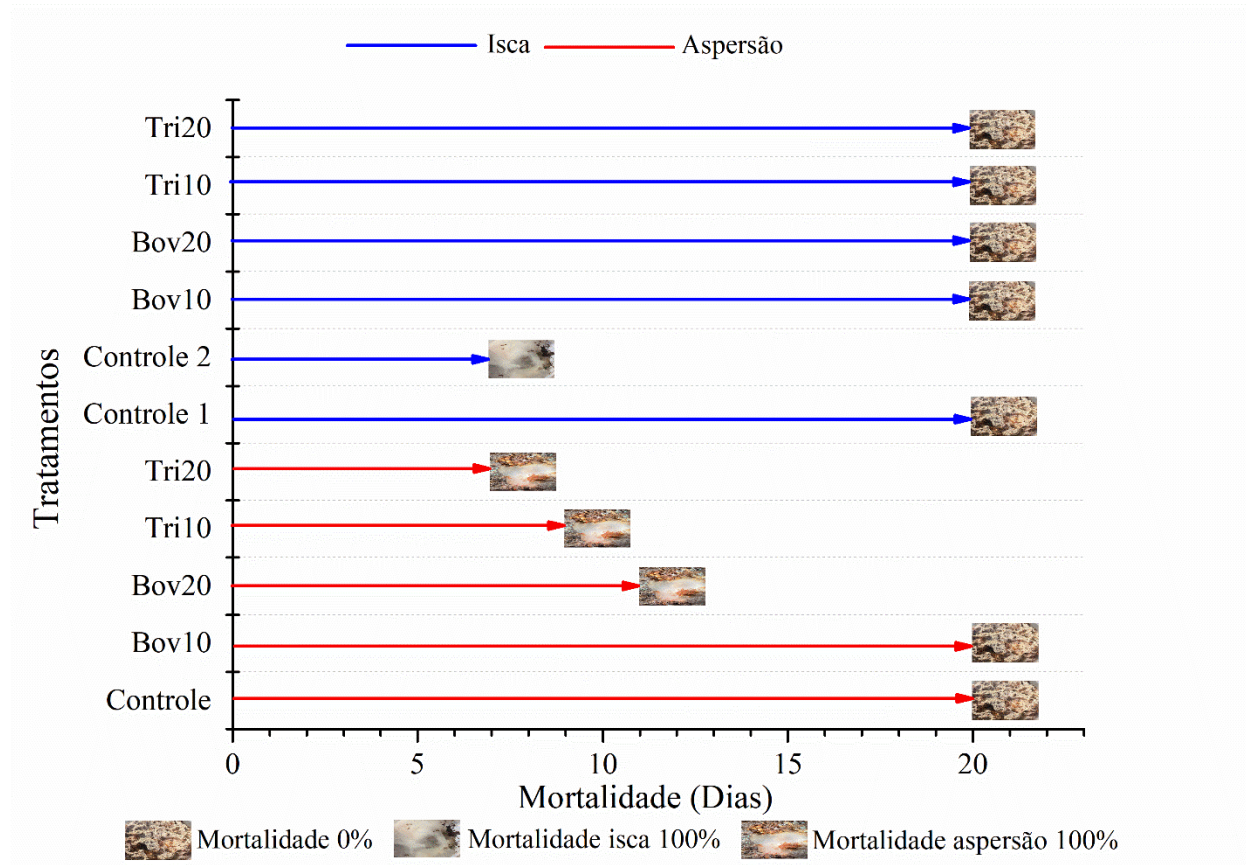


Figura 1 - Mortalidade em colônias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) após o fornecimento de isca e pulverização da suspensão. Bov10 (*Beauveria bassiana* 10%), Bov20 (*B. bassiana* 20%), Tri10 (*Trichoderma harzianum* 10%) e Tri20 (*T. harzianum* 20%)

Tabela 1 - Alterações comportamentais nas colônias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) após o fornecimento da isca e pulverização da suspensão.

Tratamentos	Pulverização					
	Carregamento (%)	Incorporação (%)	Corte de folhas (%)	Sintoma de intoxicação (%)	Operárias mortas (%)	Fungos contaminantes (%)
Testemunha	-	-	97,73 ± 3,15 a*	0,0 ± 0,0 e	0,0 ± 0,0 e	0,0 ± 0,0 e
<i>B. bassiana</i> 10%	-	-	32,39 ± 20,12 b	22,50 ± 11,36 d	41,93 ± 18,59 d	13,07 ± 18,96 d
<i>B. bassiana</i> 20%	-	-	3,98 ± 5,78 c	80,57 ± 22,81 c	75,34 ± 26,20 c	66,56 ± 36,68 c
<i>T. harzianum</i> 10%	-	-	1,70 ± 2,92 cd	90,57 ± 13,62 b	88,07 ± 16,12 b	77,33 ± 26,38 b
<i>T. harzianum</i> 20%	-	-	0,0 ± 0,0 d	96,59 ± 8,08 a	95,34 ± 6,47 a	91,36 ± 21,69 a
Isca						
Testemunha	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a	96,88 ± 3,29 a	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b
Padrão	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a	6,25 ± 19,76 c	63,18 ± 47,02 a	58,75 ± 48,10 a	100,0 ± 0,0 a
<i>B. bassiana</i> 10%	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a	91,88 ± 9,34 a	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b
<i>B. bassiana</i> 20%	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a	83,75 ± 18,68 b	1,13 ± 3,77 a	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b
<i>T. harzianum</i> 10%	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a	89,38 ± 13,52 a	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b
<i>T. harzianum</i> 20%	87,5 ± 25,0 b	100,0 ± 0,0 a	84,38 ± 25,90 b	2,27 ± 1,0 a	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b

* Média ± desvio padrão - Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem significativamente entre pelo teste não paramétrico de comparação múltipla post-hoc utilizando o critério da diferença mínima significativa de Fisher (LSD) ($\alpha=0,05$)

CAPÍTULO 3

Comportamento da Colônia de Formiga Cortadeira, *Atta sexdens rubropilosa*, durante o Controle Biológico³

Luis Eduardo Pontes Stefanelli ¹, Tarcisio Marcos Macedo Mota Filho ^{1*}, Roberto da Silva Camargo ¹, Carlos Alberto Oliveira de Matos ² e Luiz Carlos Forti ¹

¹ Depto. De Proteção de Plantas, Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

² Universidade Estadual Paulista (UNESP), Itapeva, SP, Brasil.

* Id do e-mail do autor correspondente: tarcisio972010@hotmail.com

Stefanelli, L. E. P., Mota Filho, T. M. M., Camargo, R. S., Matos, C. A. O., Forti, L. C. Colony Behavior of *Atta sexdens rubropilosa* Leaf-Cutting Ants During Biological Control. **International Journal of Agriculture Innovations and Research**, v. 9, n. 3, p. 2319-1473, 2021.

https://www.ijair.org/administrator/components/com_jresearch/files/publications/IJAIR_3266_FINAL.pdf

Resumo – Os fungos entomopatogênicos ocorrem naturalmente nos ecossistemas e podem representar uma ótima ferramenta de controle biológico nos programas de Manejo Integrado de Pragas. No entanto, em se tratando de insetos sociais, pode-se constatar que esses insetos desenvolveram uma grande quantidade de mecanismos ou estratégias de defesa capazes de combater esses agentes biológicos. Essas estratégias de defesa estão relacionadas com uma série de comportamentos, como por exemplo auto-limpeza, limpeza mútua e com a secreção de substâncias antifúngicas capazes de inibir as toxinas fúngicas. O presente estudo teve como objetivo principal observar esses comportamentos através de uma nova metodologia de aplicação de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 e *Trichoderma harzianum* Rifai, 1969 para o controle de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908. Desta forma, realizou-se a aplicação desses agentes microbianos através de uma

³ Capítulo redigido nas normas do periódico International Journal of Agriculture Innovations and Research, onde foi publicado.

*pulverização de suspensão de esporos e também a partir da confecção de duas iscas formicidas contendo 20% (m/m) de dois produtos comerciais Boveril WP PL63® e Trichodermil SC 1306®. O presente estudo suporta a hipótese de que essa nova tecnologia de aplicação (pulverização dos conídios) do controle biológico para formigas cortadeiras pode contribuir para uma maior quantidade de comportamentos exibidos, ou até mesmo para a intoxicação, contaminação ou morte das operárias da colônia. Foram observados valores de intoxicação na ordem de 80% para *T. harzianum* e também foi possível aferir que a natureza do fungo entomopatogênico interfere nas respostas comportamentais.*

Palavras-chave – *Beauveria bassiana*, Biocontrole, Fungos Entomopatogênicos, Patogenicidade, *Trichoderma harzianum*

3.1 INTRODUÇÃO

As formigas cortadeiras *Atta* Fabricius, 1805 e *Acromyrmex* Mayr, 1865 (Hymenoptera: Formicidae) são insetos eussociais que ocorrem exclusivamente na região Neotropical, desde o norte-leste dos Estados Unidos, latitude 40° N, até o centro da Argentina, latitude 41° S [1]. No Brasil a relevância das desses insetos é do ponto de vista econômico, uma vez que se constituem nas principais pragas em cultivos de *Eucalyptus* e *Pinus* [2] e além disso, podem atacar diversas culturas agrícolas e áreas de pastagens, ocasionando consideráveis perdas de rentabilidade [3].

O uso de iscas tóxicas representa atualmente o principal método de controle de formigas cortadeiras [3]-[4]. Além de apresentar excelente controle, é o único método que apresenta viabilidade técnica, econômica e operacional [3]. Estas são constituídas por ingrediente ativo que age por ingestão vinculado a óleo mineral e incorporado ao substrato atrativo, geralmente polpa cítrica desidratada [5].

O ingrediente ativo sulfluramida é o mais utilizado nas formulações das iscas principalmente em decorrência da eficiência desta substância para o controle de todas as espécies de formigas cortadeiras [3]. No entanto, a sulfluramida está envolvida em várias questões ambientais, principalmente que para a sua produção utiliza-se o PFOSF (fluoreto de perfluorooctano sulfonilo) e a partir da sua degradação produz o PFOS (sulfonato de perfluorooctano) ambos considerados contaminantes ambientais altamente persistentes [6]-[7]-[8].

A exposição aos baixos níveis de PFOS e PFOSF não são amplamente compreendidos [9], no entanto, estudos de Haughom e Spydevold [10] e Luebker *et al* [11] demonstraram a relevância das interações dessas substâncias fluoroquímicas e seus efeitos hepatotóxicos em camundongos. Além disso, em animais onde ocorreu a bioacumulação dessas substâncias através da alimentação reduziu a síntese de ácidos graxos e de colesterol sérico [10].

Diante desta problemática, no ano de 2006, a Convenção de Estocolmo classificou o PFOS e PFOSF como poluente orgânico persistente no solo e o incluiu no Anexo B, o que fez com que o Brasil aplicasse um Plano Nacional de Implementação com perspectivas de eliminação de seu uso [12]. Em decorrência dessa possibilidade do uso da sulfluramida representar uma potencial fonte de toxicidade para o ambiente, pesquisadores passaram a reunir seus esforços para

avaliar seu impacto nos ecossistemas e apresentar novas estratégias e perspectivas de novos métodos de controle para formigas cortadeiras [13].

Nos últimos anos a utilização de controle microbiano através de fungos patogênicos, pode representar uma alternativa no controle de formigas. Dentre esses organismos se encontram os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 e o micoparasita, *Trichoderma harzianum* Rifai, 1969 [14]-[15]. A utilização dos patógenos para controle de formigas cortadeiras, geralmente é incorporado a iscas com substrato atrativo [16]-[17]-[18]. Contudo, quando se utilizam iscas contendo esporos dos fungos apenas as peças bucais entram em contato com os esporos e é nessa região onde se encontram várias substâncias antibióticas que acabam inativando a ação dos fungos [19]. Além disso, no processo de preparação da isca as formigas acabam reconhecendo os agentes contaminante, e realizam comportamentos higiênicos de defesa como grooming (auto limpeza, limpeza mútua) e higienização do ninho que acabam impedindo a ação dos agentes patogênicos [20]. Dessa forma, quando se utiliza-se agentes de controle microbiológicos como fungos, o método de aplicação destes deve proporcionar o máximo de contato com os indivíduos da colônia e com a cutícula do indivíduo [21].

Como hipóteses, sugere-se que a aplicação dos fungos patogênicos através da pulverização de conídios pode interferir no comportamento das operárias e que a natureza do fungo aplicado exerce uma resposta diferencial na colônia; por fim, uma comparação das respectivas frequências de comportamento observadas quando a mesma concentração de conídios é aplicada na forma de isca formicida, avaliando se as formigas são capazes de reconhecer a composição do material contaminado durante a manipulação, realizar o isolamento das substâncias prejudiciais e etc.

Em síntese, comparar se esta nova tecnologia pode contribuir para maior quantidade de comportamentos exibidos ou até mesmo para uma elevação da intoxicação, contaminação ou morte das operárias da colônia. Como a frequência dos atos comportamentais apresentados pode ser um excelente indicativo de fatores intimamente relacionados com a imunidade social da colônia, o presente estudo é relevante para a compreensão dos mecanismos de defesa das formigas cortadeiras contra parasitas.

Desta forma, o objetivo do presente estudo é avaliar o comportamento exibido pelas operárias de colônias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 quando expostas ao controle biológico por meio iscas granuladas na arena de forrageamento e através

da pulverização de uma suspensão no jardim de fungo da colônia contendo conídios dos fungos *B. bassiana* e *T. Harzianun*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Colônias de Estudo

Doze colônias de *A. sexdens rubropilosa* foram coletadas na cidade de Botucatu, São Paulo, Brasil e mantidas em condições controladas (temperatura de 24 ± 2 ° C, umidade relativa de 80% e fotoperíodo de 12 horas de luz) no Laboratório de Insetos Sociais Praga da Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Botucatu, até a realização do bioensaio. Cada colônia foi alojada em um recipiente plástico de 500 mL com uma camada de gesso de 1,0 cm no fundo para manter a umidade do jardim de fungo. Diariamente, folhas da planta *Acalypha* spp. foram fornecidas para a manutenção do crescimento do fungo simbiote.

3.2.2 Preparação das Iscas

Realizou-se a confecção de duas iscas contendo 20% (m/m) de dois produtos comerciais da empresa Koppert Biological Systems®. O Boveril WP PL63® composto por 5% de *B. bassiana*, cepa PL63 (mínimo 1.0×10^8 conídios viáveis g⁻¹) e o Trichodermil SC 1306® composto por 4.8% de *T. harzianum*, cepa ESALQ-1306 (mínimo 2.0×10^9 conídios viáveis mL⁻¹).

A confecção foi realizada de forma artesanal. Polpas de laranja provenientes de cultivo orgânico foram desidratadas em estufa a 50 °C por 72 horas e, em seguida, foram trituradas até a obtenção de um pó. Posteriormente, misturou-se a polpa cítrica em pó (60%), carboximetilcelulose (15%), óleo de soja (5%) e o produto comercial (20% de Boveril WP PL63® ou Trichodermil SC 1306®) em 2.5 mL de água destilada para a obtenção de pastas com diferentes concentrações dos produtos em estudo. A pasta formada foi colocada em uma seringa de 60.0 mL para produzir os *pellets* (Adaptado de Sousa *et al* [22]. As iscas foram secadas à temperatura de 25 ± 2 °C por 24 h e posteriormente cortadas com o comprimento de aproximadamente 2 mm semelhante ao da isca comercial padrão.

3.2.3 Preparação das Suspensões

Foram preparadas duas suspensões de 15.0 mL, uma contendo 20% (m/m) de Boveril WP PL63® e outra contendo 20% (m/m) de Trichodermil SC 1306®. Para a obtenção das suspensões, o produto comercial foi individualmente misturado em solução aquosa de água destilada e Tween 80® a 1% e homogeneizado durante dois minutos com o auxílio de um bastão de vidro (Adaptado de Currie e Stuart [20]). Posteriormente, as suspensões foram armazenadas individualmente em béqueres de 50.0 mL envolvidos em papel-alumínio até a pulverização do produto.

3.2.4 Análise Comportamental

As colônias de *A. sexdens rubropilosa* contendo aproximadamente 350.0 cm³ de jardim de fungo foram distribuídas em três colônias para cada isca e suspensão em estudo, totalizando doze colônias. Posteriormente, o lixo e os restos de folhas foram retirados das câmaras de lixo e de forrageamento e as colônias ficaram sem receber o substrato vegetal por 24 horas. Após esse período, cada colônia recebeu 0.3 g de isca na arena de forrageamento ou a pulverização de 5.0 mL de suspensão no jardim de fungo. Nas colônias que receberam a suspensão, a pulverização foi realizada com borrifador manual de 500.0 mL, simulando uma aplicação convencional de produto fitossanitário. Após o fornecimento das iscas ou da aplicação, o recipiente do jardim de fungo foi fechado com uma tampa de vidro transparente, para permitir a observação dos comportamentos realizados na colônia.

As observações foram realizadas durante seis dias, e seguiram uma proposta de escaneamento adaptada descrita por Sousa *et al* [22], em que um grupo de indivíduos é analisado rapidamente e o comportamento de cada um deles é registrado. No primeiro dia, as observações foram realizadas durante cinco horas em intervalos regulares de trinta minutos. Para as colônias que receberam a isca, os comportamentos analisados foram: transporte do pellet para o jardim de fungo (1), segurar o pellet (2), lambear o pellet (3), auto-limpeza (4), limpeza mútua (5) e remoção de fungos contaminantes (6). Para as colônias que receberam a pulverização da suspensão no jardim de fungo os atos comportamentais analisados foram: auto-limpeza (1), limpeza mútua (2), remoção de fungos contaminantes (3), retirar o fungo simbionte contaminado (4) e presença de sintoma de intoxicação (5). Esses atos comportamentais foram quantificados pela frequência das operárias envolvidas em

cada um deles. Vinte e quatro horas após o primeiro dia de avaliação, voltou-se a realizar o fornecimento de substrato vegetal na câmara de forrageamento para a manutenção do crescimento do fungo simbiote.

Do segundo dia até o último dia de observações, os mesmos atos comportamentais supracitados foram analisados, com as observações realizadas durante uma hora e em intervalos de quinze minutos. Além disso, diariamente foram contabilizados o número de larvas, pupas e operárias mortas e também o peso total dos indivíduos mortos e dos resíduos da câmara de lixo.

3.2.5 Análise Estatística

Tanto para as colônias que receberam isca contendo os fungos na câmara de forrageamento, quanto para as que receberam a pulverização das suspensões na câmara de jardim de fungo; utilizou-se o Teste da Soma de Ranks de Wilcoxon com correção da continuidade (Teste U de Mann-Whitney) para comparar a superioridade da frequência dos atos comportamentos realizados pelas operárias entre *B. bassiana* versus *T. harzianum* ($\alpha = 0,05$). Utilizou-se o ambiente R versão 4.0.0 para a computação estatística [23].

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Comportamentos com isca

Dentre os atos comportamentais observados no primeiro dia de avaliação após o fornecimento da isca, o mais executado pelas operárias das colônias que receberam iscas contendo *B. bassiana* foi o de transportar os *pellets* para o jardim de fungo (Fig. 1a e Tabela 1). Em contraste, para as colônias que receberam iscas contendo *T. harzianum*, o comportamento de lambr os *pellets* foi o de maior frequência (Fig. 1a e Tabela 1). Não houve mudanças bruscas nos comportamentos das operárias em relação às diferentes iscas e portanto, não se observou diferença significativa nos seguintes atos comportamentais: transporte do pellet para o jardim de fungo ($W = 493.5$, $p = 0.5064$), segurar os *pellets* ($W = 378.5$, $p = 0.2863$), lambr os *pellets* ($W = 404$, $p = 0.5001$); auto-limpeza ($W = 439.5$, $p = 0.8805$), limpeza mútua ($W = 483.5$, $p = 0.6082$) e remoção de fungos contaminantes ($W = 371$, $p = 0.236$).

Entre o segundo e o sexto dia de avaliação o comportamento mais frequente em colônias que receberam iscas à base de *B. bassiana* e *T. harzianum* foi a auto-limpeza, sendo estatisticamente semelhantes ($W = 112.5$, $p = 1$) (Fig. 2a e Tabela 1).

Também não houve diferenças significativas nos atos comportamentais de limpeza mútua ($W = 121.5$, $p = 0.7187$) e remoção de fungos contaminantes ($W = 97$, $p = 0.4944$). Devido ao fato de todos os *pellets* já terem sido incorporados no jardim de fungo, os seguintes atos comportamentais não foram observados entre o segundo e sexto dia de avaliação: transporte dos *pellets* para o jardim de fungo, segurar os *pellets* e lamber os *pellets*.

Não foi observada diferença significativa no número de larvas mortas de colônias que receberam iscas contendo de *B. bassiana*, em relação as que receberam isca contendo *T. harzianum* ($W = 112.5$, $p = 1$) (Fig. 3a e Tabela 2). Em ambas as colônias não foram encontradas pupas mortas. Por outro lado, o número de operárias mortas foi superior nas colônias que receberam iscas contendo *T. harzianum* em relação as que receberam iscas contendo *B. bassiana* ($W = 51.5$, $p = 0.0087$). O mesmo foi observado no peso de operárias mortas, que foi superior nas colônias que receberam isca contendo *T. harzianum* em comparação às que receberam isca contendo *B. bassiana* ($W = 50$, $p = 0.0079$) (Fig. 4a e Tabela 2). O peso dos resíduos na câmara de lixo das colônias foi estatisticamente semelhante ($W = 147$, $p = 0.1584$).

3.3.2 Comportamentos com pulverização

No primeiro dia de avaliação após a pulverização das suspensões, a frequência de operárias com comportamento de sintoma de intoxicação foi superior nas colônias que receberam a pulverização da suspensão de conídios de *T. harzianum*, em relação às que receberam a suspensão de *B. bassiana* ($W = 0$, $p = 2.886 \times 10^{-10}$) (Fig. 1b e Tabela 1). Por outro lado, a frequência do comportamento de limpeza mútua foi superior nas colônias que receberam aplicação da suspensão de *B. bassiana*, do que as que receberam a suspensão de *T. harzianum* ($W = 111$, $p = 8.707 \times 10^{-6}$). Nos demais atos comportamentais: auto-limpeza ($W = 279$, $p = 0.1394$), remoção de fungos contaminantes ($W = 371.5$, $p = 0.899$) e retirada do fungo simbionte ($W = 462.5$, $p = 0.07242$) não foram observadas diferenças significativas.

Entre o segundo e o sexto dia de avaliação o comportamento com maior frequência em ambas as colônias foi o de presença de operárias com sintoma de intoxicação (Fig. 2b e Tabela 1). Apenas o comportamento de retirar o fungo simbionte contaminado apresentou diferença estatística, sendo superior nas colônias que receberam a aplicação da suspensão de *B. bassiana* (10.25%) em relação às que receberam a suspensão de *T. harzianum* (2.08%) ($W = 174.5$, $p = 0.0085$). Os demais

atos comportamentais: auto-limpeza ($W = 97.5$, $p = 0.5462$), limpeza mútua ($W = 108$, $p = 0.8672$), remoção de fungos contaminantes ($W = 141.5$, $p = 0.2079$) e presença de sintomas de intoxicação ($W = 76.5$, $p = 0.1402$), foram estatisticamente semelhantes. Também não foi observada diferença significativa, no número de larvas mortas ($W = 99$, $p = 0.5836$), no número de pupas mortas ($W = 80$, $p = 0.1831$), no número de operárias mortas ($W = 126.5$, $p = 0.575$) (Fig. 3b e Tabela 2), no peso de indivíduos mortos ($W = 82.5$, $p = 0.2211$) e no peso dos resíduos da câmara de lixo ($W = 81$, $p = 0.1985$) (Fig. 4b e Tabela 2).

3.4 DISCUSSÃO

O presente estudo suporta a hipótese de que essa nova tecnologia de aplicação do controle biológico para formigas cortadeiras pode contribuir para maior quantidade de comportamentos exibidos e até mesmo para a intoxicação, contaminação ou morte das operárias da colônia.

Este estudo indicou a capacidade de operárias removerem os micro-organismos patogênicos potencialmente destruidores do jardim de fungos. Quando as colônias foram pulverizadas com esporos de patógenos fúngicos, as operárias se moveram para as áreas menos infectadas como a arena de forrageamento e a arena de lixo.

Como observado, no 1º dia de avaliação após a pulverização das suspensões, a frequência de operárias com comportamento resultante de sintomas de intoxicação foi maior nas colônias que receberam a pulverização da suspensão de conídios de *T. harzianum*, em relação às que receberam a suspensão de *B. bassiana* (Fig. 1b e Tabela 1). O número de operárias realizando o comportamento de autolimpeza aumentou imediatamente após a pulverização em ambos os tratamentos fúngicos (Tabela 1).

Por outro lado, o comportamento de limpeza mútua foi mais frequente nas colônias que receberam aplicação da suspensão de *B. bassiana*, do que nas que receberam a suspensão de *T. harzianum*. Neste caso sugere-se que a quantidade de toxinas suprimidas com o auxílio de estratégias de defesa como a secreção de compostos antibióticos a fim de reduzir a viabilidade dos esporos na cutícula foi utilizada de forma mais eficiente para a suspensão de *B. Bassiana* e isto pode ser evidenciado pela menor presença de sintomas de intoxicação e pelo aumento da

autolimpeza (Tabela 1), um indicativo de que, desta forma, as operárias estavam tentando realizar o processo de desinfecção. Em se tratando de *B. bassiana* a patogenicidade também tem relação direta com a produção de micotoxinas como a beauvericina [24]. Curiosamente a resposta nas colônias tratadas com *T. harzianum* foi mais drástica, sustentando a hipótese de que este fungo compete por espaço e nutrientes [25] e além disso é capaz de controlar o crescimento de basidiomicetos, o filo onde é enquadrado o fungo simbiote cultivado pelas formigas cortadeiras (*Leucoagaricus gongylophorus* Heim, 1957). Desta forma, as formigas além de terem a morte causada por micotoxinas, tais como os tricocenos, também podem ter problemas com sua fonte primária de energia. Além disso, esse agente biológico produz metabólitos que previnem a germinação de esporos (fungistase) e ocasiona a morte de células (antibiose) [26], e deste modo confere pertinência para a hipótese da resposta envolvendo a relação da natureza do fungo aplicado, pois, cada fungo exerceu uma resposta diferente na colônia, principalmente no que tange aos atos comportamentais.

Os procedimentos envolvidos na preparação do substrato para a cultura do fungo simbiótico implicam na manipulação deste substrato pelas operárias (lamber, cortar, ingerir exsudatos) e as formigas são capazes de perceber a composição do material durante a execução dessas tarefas comportamentais [27]. Em virtude deste fato, as formigas provavelmente foram capazes de isolar esse material contaminado na manipulação da isca, sustentando a nossa hipótese de reconhecimento do material contaminado (Tabela 1) e exibindo grande frequência no comportamento de transporte.

A ação dos agentes patogênicos varia em função das atividades desempenhadas pelos indivíduos na colônia e da forma de aplicação utilizada no estudo, em que alguns indivíduos podem ser mais susceptíveis que outros [28]. Como observado no presente estudo a forma de aplicação foi preponderante para o controle eficaz, sendo eficiente na relação hospedeiro – patógeno fúngico e desta forma contribuiu para a ocorrência de uma grande quantidade de indivíduos mortos e de resíduos na câmara de lixo nos tratamentos que receberam a suspensão de esporos (Fig. 4b). Ainda se observa que os tratamentos que receberam pulverização também apresentaram valores consideráveis de larvas, pupas e operárias mortas (Fig. 3b).

Nota-se que a metodologia de aplicação por pulverização se mostrou mais eficiente do que o controle através de iscas formicidas, Já que ambos apresentavam

a mesma proporção de produto formulado, a observação de maiores pesos totais de formigas mortas e de resíduos de lixo nos tratamentos com suspensões de esporos em comparação com os tratamentos compostos por iscas formicidas sustenta a hipótese de que isto pode ter ocorrido principalmente em decorrência do tipo de formulação e da aplicação do produto. Adicionalmente foi observado maior quantidade de comportamentos exibidos e até mesmo da quantidade de morte dos indivíduos.

Em síntese o controle microbiano pode representar uma alternativa promissora num futuro próximo, mas tem ainda como principal desafio, o de necessariamente romper os mecanismos e estratégias desenvolvidas pelas formigas cortadeiras. A aplicação de agentes biológicos de forma efetiva pode proporcionar benefícios ambientais incontáveis. Pesquisas envolvendo uma agricultura mais sustentável e com menores impactos ambientais nos ecossistemas devem ser incentivadas.

A frequência dos atos comportamentais exibidos pode ser um excelente indicativo intimamente relacionado a fatores como a imunidade social da colônia e o presente estudo apresenta relevante no sentido de aprimorar o conhecimento dos mecanismos de defesa das formigas cortadeiras contra agentes biológicos.

3.5 CONCLUSÃO

Os fungos avaliados mostraram seu potencial como agentes de controle de colônias de *Atta sexdens rubropilosa* quando pulverizados no jardim de fungos. Esta pesquisa sustenta a hipótese de que esta nova tecnologia de aplicação (spray de conídios) para o controle biológico de formigas cortadeiras pode contribuir para uma maior quantidade de comportamentos exibidos, intoxicação e morte das operárias da colônia. Valores de intoxicação de 80% foram observados para *T. harzianum*, e também foi possível avaliar que a natureza do fungo entomopatogenico interfere nas respostas comportamentais. Dessa forma, representam novas perspectivas no uso do controle biológico para colônias de formigas cortadeiras.

AGRADECIMENTOS

Luis Eduardo Pontes Stefanelli e Tarcisio Marcos Macedo Mota Filho agradecem o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior] - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001. Luiz Carlos Forti agradece o apoio do Conselho Nacional de Ciência, Pesquisa e Tecnologia (CNPq-PQ) (doação nº 301938 / 2017-2).

REFERÊNCIAS

- [1]. A.G. Farji-Brener, and J.C. Corley. Successful invasions of hymenopteran insects into NW Patagonia. *Ecología austral*, v. 8, n. 2, pp.237-249, 1998.
- [2]. J.C. Zanuncio, L.A Couto, G.P. Santos, and T.V. Zanuncio, 1992. Eficiência da isca granulada Mirex-S, à base de sulfluramida, no controle de formigas cortadeira *Atta laevigata* (F. Smith, 1858) (Hymenoptera: Formicidae). *Revista Árvore*, v. 16, n. 3, p. 24. (Zanuncio et al. Efficiency of Mirex-S granulated bait, based on sulfluramid, in the control of leaf-cutting ants *Atta laevigata* (F. Smith, 1858) (Hymenoptera: Formicidae). *Arvore magazine* v. 16, n. 3, p. 24).
- [3]. J.S. De Britto, L.C. Forti, M.A. Oliveira, R. Zanetti, C.F. Wilcken, J.C. Zanuncio, A.E. Loeck, N. Caldato, N.S. Nagamoto, P.G. Lemes, and R.S. Camargo, "Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*", *International Journal of Research in Environmental Studies*, v. 3, p. 11-92, 2016.
- [4]. L.C. Forti, D.R. Pretto, N.S. Nagamoto, C.R. Padovani, R.S. Camargo, and A.P.P. Andrade. Dispersal of the delayed action insecticide sulfluramid in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, v. 50, n. 3, pp. 1149-1164, 2007.
- [5]. N.S. Nagamoto, L.C. Forti, A.P.P. Andrade, M.A.C. Boaretto, and, C.F. Wilcken. Method for the evaluation of insecticidal activity over time in *Atta sexdens rubropilosa* workers (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, v. 44, n. 2, pp. 413-432, 2004.
- [6]. S.M. Avendaño, and J. Liu. Production of PFOS from aerobic soil biotransformation of two perfluoroalkyl sulfonamide derivatives. *Chemosphere*, vol. 119, pp. 1084-1090, 2015. Available: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.09.059>
- [7]. J. Löfstedt Gilljam, J. Leonel, I.T. Cousins, and J.P. Benskin. Is ongoing sulfluramid use in South America a significant source of perfluorooctanesulfonate (PFOS)? Production inventories, environmental fate, and local occurrence. *Environ. Sci. Technol.*, v. 50, n. 2, p.653-659, 2016. Available:

<https://doi.org/10.1021/acs.est.5b04544>

- [8]. R.A. Nascimento, D.B.O. Nunoo, E. Bizkarguenaga, L. Schultes L, I. Zabaleta, J.P. Benskin, S. Spanó, and J. Leonel. Sulfluramid use in Brazilian agriculture: A source of per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) to the environment. *Environ. Pollut.*, v. 242, pp. 1436-1443, 2018. Available: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.122>
- [9]. P.A. Fair, E. Driscoll, M.A. Mollenhauer, S.G. Bradshaw, S.H. Yun, K. Kannan, G.D. Borssat, D.E. Keil, and M.M. Peden-Adams. Effects of environmentally-relevant levels of perfluorooctane sulfonate on clinical parameters and immunological functions in B6C3F1 mice. *J. Immunotoxicol*, v. 8, n.1, pp.17-29, 2011. Available: <https://doi.org/10.3109/1547691X.2010.527868>
- [10]. B. Haugom, and Ø. Spydevold. The mechanism underlying the hypolipemic effect of perfluorooctanoic acid (PFOA), perfluorooctane sulphonic acid (PFOSA) and clofibric acid. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-lipids and lipid metabolism*, v. 1128, n. 1, pp.65-72, 1992. Available: [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(92\)90258-W](https://doi.org/10.1016/0005-2760(92)90258-W)
- [11]. D.J. Luebker, K.J. Hansen, N.M. Bass, J.L. Butenhoff, and A.M. Seacat. Interactions of fluorochemicals with rat liver fatty acid-binding protein. *Toxicology*, v. 176, n. 3, pp. 175-185, 2002. Available: [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00081-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00081-1)
- [12]. Ministry of the Enviroment, 2015a. Foreword In: National Implementation Plan – Brazil: Stockholm Convention p. 31. Available: <http://chm.pops.int/Implementation/NIPs/NIPTransmission/tabid/253/Default.aspx> x Acess 02 Aug 2020
- [13]. Ministry of the Enviroment, 2015b. Inventory of new POPs of industrial use *In*: National Implementation Plan – Brazil: Stockholm Convention, pp 87–99. Available: <http://chm.pops.int/Implementation/NIPs/NIPTransmission/tabid/253/Default.aspx> x Acess 02 Aug 2020
- [14]. M. Verma, S.K. Brar, R.D. Tyagi, R.Y. Surampalli, and F. Valero. Antagonistic

- fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. *Biochem. Eng. J.*, v. 37, n. 1, pp. 1-20, 2007. Available: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.05.012>
- [15]. P. Folgarait, N. Gorosito, M. Poulsen, and C.R. Currie. Preliminary in vitro insights into the use of natural fungal pathogens of leaf-cutting ants as biocontrol agents. *Curr. Microbiol.*, v. 63, n. 3, pp. 250-258, 2011. Available: <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9944-y>
- [16]. E. Diehl-Fleig, M.E. Silva, and E.P. Bortolás. Emprego do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* em iscas para o controle das formigas cortadeiras *Acromyrmex* spp. em floresta implantada de *Eucaliptus grandis*. In: Anais do 7º Congresso Florestal Estadual, Nova Prata, (Use of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in baits for the control of leaf-cutting ants *Acromyrmex* spp. in implanted forest of *Eucaliptus grandis* In: *Proceedings of the 7th State Forestry Congress, "New Silver"*) pp. 1139-1150, 1992.
- [17]. A. Specht, E. Diehl-Fleig, and M.E. Silva, 1994. Atratividade de iscas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. a formigas do gênero *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). Attractiveness of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill baits. ants of the genus *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae) *An. Soc. Entomol. Bras.*, v. 23, n. 1, pp. 99-104.
- [18]. E. Lopez, and S. Orduz. *Metarhizium anisopliae* and *Trichoderma viride* for control of nests of the fungus-growing ant, *Atta cephalotes*. *Biological Control*, v. 27, n. 2, pp. 194-200, 2003. Available: [https://doi.org/10.1016/S1049-9644\(03\)00005-7](https://doi.org/10.1016/S1049-9644(03)00005-7)
- [19]. A.E.F. Little, T. Murakami, U.G. Mueller, and C.R. Currie. Defending against parasites: fungus-growing ants combine specialized behaviours and microbial symbionts to protect their fungus gardens. *Biol. Lett.*, vol. 2, n.1, pp. 12-16, 2006. Available: <https://doi.org/10.1098/rsbl.2005.0371>
- [20]. C. R. Currie, and A. E. Stuart, "Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants", *Proc. R. Soc. Lond. B*, vol. 268, p. 1033-1039, 2001. Available: <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1605>

- [21]. R.M. Pereira, and J.L. Stimac. Biocontrol options for urban pest ants. *J. Agric. Entomol.*, vol. 14, pp.231-248, 1997.
- [22]. K.K.A. Sousa, R.S. Camargo, and L.C. Forti. Communication or toxicity: what is the effect of cycloheximide on leaf-cutting ant workers?. *Insects* vol. 8, n.4, p.126, 2017. Available: <https://doi.org/10.3390/insects8040126>
- [23]. R Core Team. 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>. Access 21 Jun 2020
- [24]. D.W. Roberts. Toxins of entomopathogenic fungi. In: Burges HD (eds) *Microbial Control of Pests and Plant Disease 1970–1980*. Academic Press, London, 1981, pp. 441-463.
- [25]. T. Benítez, A.M. Rincón, M.C. Limón, and A.C. Codon. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.*, v.7, n. 4, pp. 249-260, 2004.
- [26]. R.A. Cuervo-Mulet, I.D. López-Villalobos, J.F. Trujillo-Perdomo, F.F. Fernández-Daza, and S.L.Vélez-Correa. Riesgos en salud laboral asociados al use de un bioinsecticida con esporas de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma lignorum*. (Cuervo-Mulet et al. Occupational health risks associated with the use of a bioinsecticide with *Beauveria bassiana* and *Trichoderma lignorum* spores. *Entramado*, v. 14, n. 2, pp. 244-255, 2018. Available: <http://dx.doi.org/10.18041/19003803/entramado.2.4762>
- [27]. R.S. Camargo, L.C. Forti, C.A.O. Matos, J.F. Lopes, and A.P.P. Andrade. Physical resistance as a criterion in the selection of foraging material by *Acromyrmex subterraneus brunneus* Forel 1911 (Hym., Formicidae). *J. Appl. Entomol*, vol. 128, n.5, pp. 329-331, 2004. Available: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2004.00844.x>
- [28]. E. Diehl-Fleig, M.E. Silva, and M.R.M. Pacheco, “Pathogenicity tests of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in *Atta sexdens piriventris* (Santschi, 1919) at different temperatures”, *Ciência e Cultura (Science and Culture)*, v. 40, p. 1103-1105, 1988.

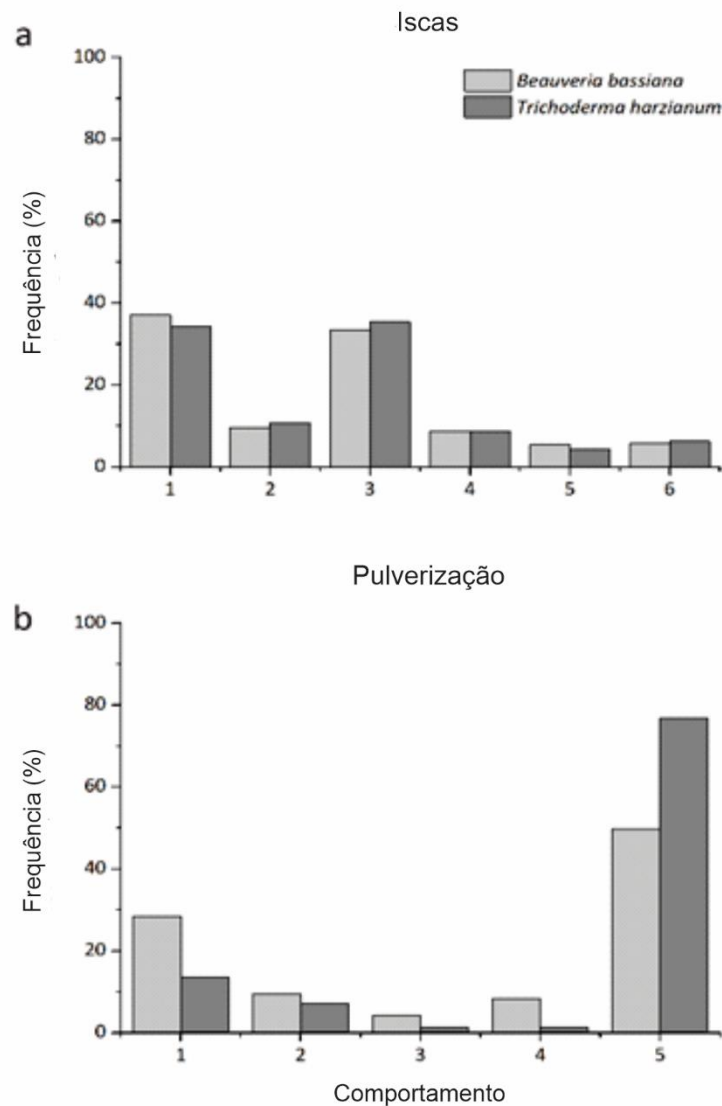


Fig. 1. Porcentagem de cada ato comportamental realizado por *Atta sexdens rubropilosa* no primeiro dia de avaliação (a) das colônias que receberam as isclas em sua câmara de forrageamento (1: Transporte dos pellets para o jardim de fungos; 2: Segurar os pellets; 3: Lambendo os pellets; 4: Auto-limpeza; 5: limpeza mútua; 6: Comportamento de remoção de ervas daninhas) e (b) as colônias que tiveram seu jardim de fungos pulverizado com suspensões (1: auto-limpeza; 2: limpeza mútua; 3: Comportamento de remoção de ervas daninhas; 4: Remoção de fungos simbióticos; 5: Sintoma de intoxicação).

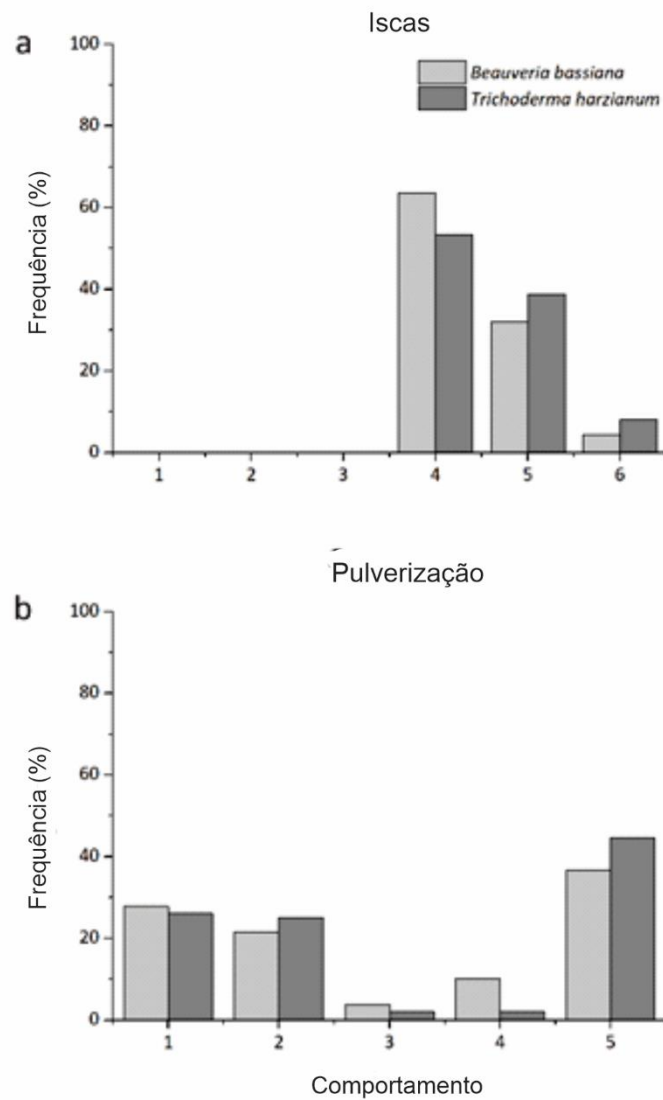


Fig. 2. Porcentagem de cada ato comportamental realizado por *Atta sexdens rubropilosa* do segundo ao sexto dia de avaliação (a) das colônias que receberam as isclas em sua câmara de forrageamento (1: Transporte dos pellets para o jardim de fungos ; 2: Segurar os pellets; 3: Lambendo os pellets; 4: Auto-limpeza; 5: limpeza mútua; 6: Comportamento de remoção de ervas daninhas) e (b) as colônias que tiveram seu jardim de fungos pulverizado com suspensões (1: Auto-limpeza; 2 : limpeza mútua; 3: Comportamento de remoção de ervas daninhas; 4: Remoção de fungos simbióticos; 5: Sintoma de intoxicação).

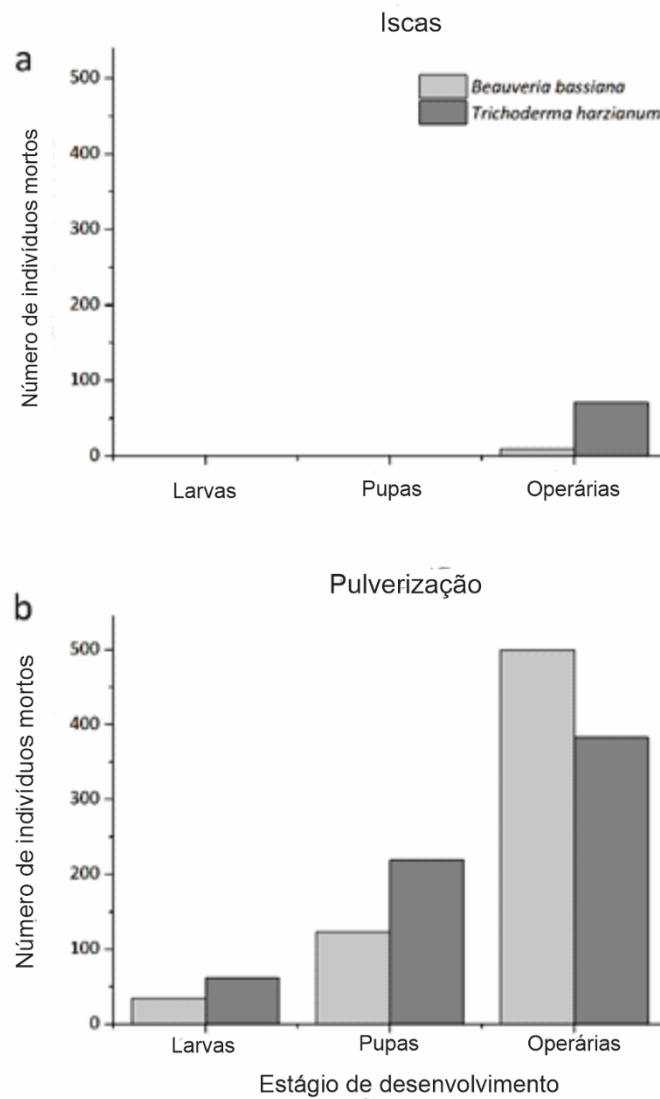


Fig. 3. Número de larvas mortas, pupas e operárias de *Atta sexdens rubropilosa* (a) das colônias que receberam as iscas em sua câmara de forrageamento e (b) das colônias que tiveram seu jardim de fungos pulverizado com suspensões.

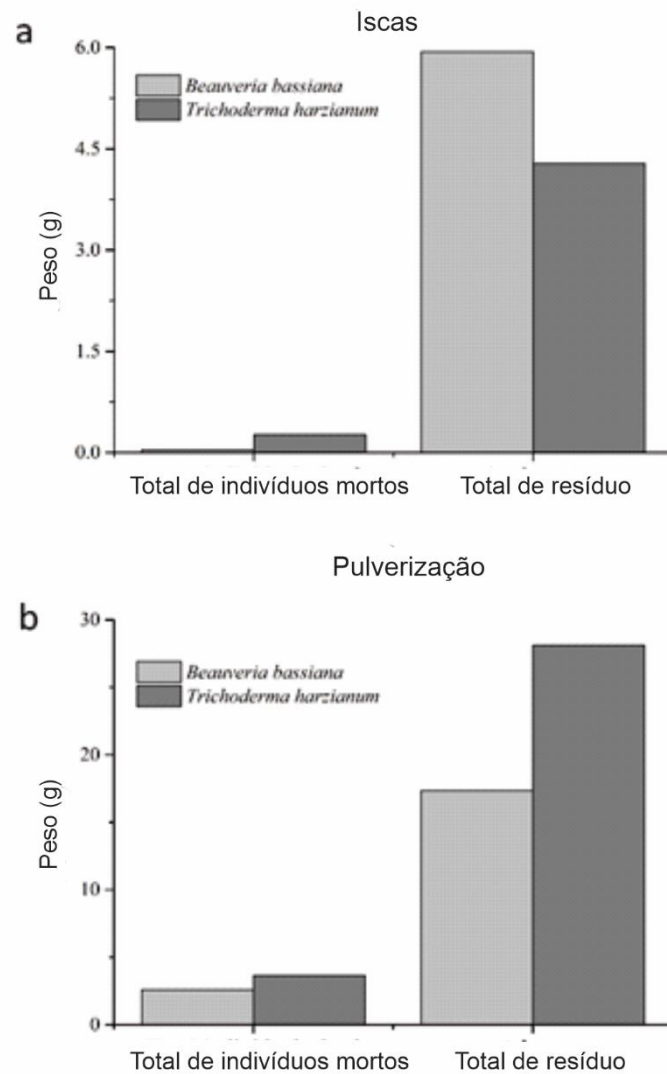


Fig. 4. Peso total de indivíduos mortos de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 e peso total de resíduos da câmara de resíduos de (a) as colônias que receberam iscas contendo o fungo em sua câmara de forrageamento e (b) as colônias que continham fungos suspensões pulverizadas em seu jardim de fungos.

Tabela 1. Frequência observada (Freq. obs.) e porcentagem de comportamentos (comp. (%)) realizados por operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) após fornecimento de isca ou pulverização em suspensão contendo os fungos entomopatogênicos em estudo.

Isclas	1º dia				2º ao 6º dia			
	<i>B. bassiana</i>		<i>T. harzianum</i>		<i>B. bassiana</i>		<i>T. harzianum</i>	
Comportamento	Freq. obs.	comp. (%)	Freq. obs.	comp. (%)	Freq. obs.	comp. (%)	Freq. obs.	comp. (%)
Transportar os pellets	372,00	37,09	368,00	34,39	-	-	-	-
Segurar os pellets	97,00	9,67	116,00	10,84	-	-	-	-
Lamber os pellets	336,00	33,51	378,00	35,33	-	-	-	-
Auto limpeza	87,00	8,67	94,00	8,79	115,00	53,23	107,00	53,23
Limpeza mutua	54,00	5,38	47,00	4,39	58,00	32,04	78,00	38,81
Remover o fungo contaminante	57,00	5,68	67,00	6,26	8,00	4,2	16,00	7,96
Total	1003,00	100,00	1070,00	100,00	181,00	100,00	201,00	100,00
Pulverização	1º dia				2º ao 6º dia			
	Freq. obs.	comp. (%)	Freq. obs.	comp. (%)	Freq. obs.	comp. (%)	Freq. obs.	comp. (%)
Auto limpeza	207,00	28,43	249,00	34,39	133,00	27,82	151,00	26,12
Limpeza mutua	69,00	9,48	134,00	10,84	103,00	21,55	145,00	25,09
Remover o fungo contaminante	30,00	4,12	23,00	35,33	18,00	3,77	12,00	2,08
Remoção do fungo simbiônte	60,00	8,24	22,00	8,79	49,00	10,25	12,00	2,08
Sintoma de intoxicação	362,00	49,73	1418,00	4,39	175,00	36,61	258,00	44,63
Total	728,00	100,00	186,00	100,00	478,00	100,00	578,00	100,00

Tabela 2. Número de larvas, pupas e operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908, (Hymenoptera: Formicidae) mortas, peso total de indivíduos mortos e peso total de resíduos da câmara de resíduos nas colônias fornecidas iscas contendo os fungos de estudo na câmara de forrageamento, ou que teve o jardim de fungos pulverizado com suspensões

	Isca		Pulverização	
Entomopatógenos	<i>B. bassiana</i>	<i>T. harzianum</i>	<i>B. bassiana</i>	<i>T. harzianum</i>
Número de larvas mortas	1	1	34	62
Número de pupas mortas	0	0	123	219
Número de operárias mortas	9	71	500	383
Número total de indivíduos mortos	10	72	657	664
Peso de indivíduos mortos (g)	0,0406	0,2647	2,5771	3,6363
Peso dos resíduos da câmara de resíduos (g)	5,9317	4,2877	17,3731	28,1045

CAPÍTULO 4

Patogenicidade do Fungo Entomopatogênico *Metharhizium rileyi* (Farlow) para *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) ⁴

Luis Eduardo Pontes Stefanelli ¹, Ramon De Marchi Garcia ², Tarcísio Marcos Macedo Mota Filho ¹, Roberto da Silva Camargo ¹, Madoka Nakai ³ e Luiz Carlos Forti ¹

1 Departamento de Proteção de Plantas, Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

2 Departamento de Horticultura, Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

3 Departamento de Ciências Biológicas Aplicadas, Universidade de Agricultura e Tecnologia de Tóquio, Fuchu, Tóquio, Japão

Stefanelli, L. E. P., Garcia, R. M., Mota Filho, T. M. M., Camargo, R. S., Nakai, M., Forti, L. C. Patogenicity of Entomopathogenic Fungi *Metharhizium rileyi* (Farlow) to *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). **International Journal of Agriculture Innovations and Research**, v. 9, n. 5, p. 2319-1473, 2021.

Resumo - Isolados do fungo enteropatogênico *Metharhizium rileyi* (Farlow) Samson de *Spodoptera litura* (Fabricius) foram estudados quanto à eficácia contra os insetos hospedeiros. Bioensaios de laboratório em uma concentração de $5,2 \times 10^8$ conídios ml^{-1} indicaram que isolados de *M. rileyi* apresentaram mortalidade de 65,5–82,5% em 9 dias) em larvas de *S. litura*. Pode-se inferir deste estudo que o isolado de *M. rileyi* possui grande potencial para uso no controle de *S. litura* na dose recomendada de $5,2 \times 10^8$ conídios ml^{-1} causando mortalidade em torno de 60-80%. Fatores como virulência e viabilidade de esporos também devem ser considerados para a produção comercial do produto biológico.

Palavras-chave - Fungo Entomopatogênico, Controle Biológico, Esporulação, Virulência, Inseticida

⁴ Capítulo redigido nas normas da revista International Journal of Agriculture Innovations and Research, onde foi publicado.

4.1 INTRODUÇÃO

A lagarta do fumo, *Spodoptera litura* (Fabricius), é um inseto praga da região Sul da Ásia, com um hábito voraz de alimentação de folhas e uma grande variedade de hospedeiros (aproximadamente 112 espécies de plantas) [1]-[2]-[3]. É responsável por danos indiretos e diretos às lavouras [4] e pode causar consideráveis perdas econômicas [5].

Plantios de amendoim, fumo, algodão são os mais afetados por *S. litura* [6]. Recentemente, foi relatado que nessas culturas o nível de infestação de uma larva por planta durante a fase de muda ou estágio de floração resulta em 20% de perda de rendimento [4]. Além disso, em surtos mais severos, principalmente durante a floração as perdas de rendimento podem chegar até 30-40% [7].

No Japão as infestações por *S. litura* geralmente começam no verão. Com isso o uso de inseticidas costuma ser realizados desde abril até o início de novembro [8]. No entanto, após as estações mais quentes, as baixas temperaturas dificultam o desenvolvimento dos insetos afetando seu ritmo circadiano.

A presença dessa praga em diferentes safras ao longo do ano e o uso indiscriminado de inseticidas visando seu controle, resultou no rápido desenvolvimento de resistência a vários inseticidas [9], causando grandes problemas aos agricultores, principalmente relacionados aos programas de manejo integrado de pragas.

Além disso, embora muitas moléculas inseticidas sejam sugeridas para combater *Spodoptera* spp., elas não são ecologicamente corretas e aumentam o custo do cultivo, especialmente nos trópicos semi-áridos, onde os agricultores cultivam amendoim como cultura de subsistência. A este respeito, o cultivo para resistência embutida ocupa importância e é uma abordagem receptiva [10].

Diante disso, uma das alternativas para o controle desses insetos-praga é o uso do controle biológico. Entre as ferramentas disponíveis nos programas de controle biológico está o uso de fungos entomopatogênicos. Entre eles, podemos citar *Metarhizium anisopliae*, *Thichoderma harzianum* e *Beauveria bassiana*, no qual já possuem registro de produto comercial em diversos países. No entanto, existem outros fungos com a capacidade de controlar a população de insetos nas lavouras.

Muitos desses agentes biológicos ocorrem naturalmente em ecossistemas, como é o caso do fungo *Metharhizium rileyi*. Este fungo tem uma ocorrência

cosmopolita infectando principalmente larvas da família Noctuidae, que atacam as lavouras; e foi relatado como patogênico a várias pragas de insetos lepidópteros de importância econômica global [1].

Metarhizium rileyi (Farlow) Kepler (Hypocreales: Clavicipitaceae), anteriormente conhecido como *Nomuraea rileyi* [11], é um fungo entomopatogênico (deuteromiceto, Fungi Imperfecti pertencente à ordem Moniliales) que pode efetivamente controlar alguns lepidópteros. Este fungo é de ocorrência cosmopolita infectando principalmente larvas da família Noctuidae, que atacam plantações [1]. Muitos centros de pesquisa estão cientes do uso potencial do fungo *M. rileyi* no controle natural da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatilis*). Aproximadamente 90% dos hospedeiros *M. rileyi* pertencem à ordem Lepidoptera, mas este fungo entomopatogênico também pode ocorrer em mais de 30 espécies de insetos de diferentes ordens como Coleoptera e Orthoptera [12].

O fungo entomopatogênico *M. rileyi* é exigente e possui requisitos específicos de crescimento em termos de temperatura, umidade, boa aeração para uma esporulação ideal. É importante avaliar a adequação e a relação custo-benefício, e a virulência e viabilidade dos esporos produzidos. É considerado seguro para os seres humanos e outros organismos não-alvo, sendo uma excelente alternativa do ponto de vista ambiental, além disso, isolados de fungos entomopatogênicos variam em sua virulência aos insetos-alvo. Os parâmetros para avaliar a virulência de diferentes isolados de fungos incluem o tempo de germinação dos conídios, a mortalidade dos insetos (eficácia em bioensaios de laboratório e outros fatores).

Neste estudo, exploramos o isolado de coleção disponível no Laboratório de Controle Biológico da Universidade TUAT – Tokyo University of Agriculture and Technology, Tóquio - Japão. Bioensaios de laboratório com este isolado indicaram eficácia contra *S. litura*. Desta forma foi avaliado seu potencial biológico para ser utilizado como micoinseticida em escala comercial (Tabela 1).

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Insetos

Foram coletadas larvas de *Spodoptera litura* nos campos de cultivo no Centro de Ciência de Campo, de Tecnologia e Agricultura da Universidade de Tóquio, Tóquio, Japão e posteriormente mantidas em condições de laboratório. As larvas foram

mantidas em gaiolas plásticas (30 x 22 x 6 cm) a 25 ± 1 °C com fotoperíodo 16: 8 (L: D) h até a pupação em seguida criadas com dieta artificial (Insecta: Nosan Corporation, Yokohama, Japão). Os adultos foram mantidos individualmente em sacos de papel (8 x 15 x 20 cm) com uma solução de açúcar bruto a 10% para alimentação seguindo a metodologia de Takatsuka et al. [14]. Nos bioensaios foram utilizadas larvas de 3º e 5º instar.

4.2.2 Obtenção do fungo de *Metharhizium rileyi* e preparação da suspensão do esporo

As culturas de *M. rileyi* de diferentes localizações geográficas do Japão foram obtidas da coleção do Laboratório de Controle Biológico - Universidade de Agricultura e Tecnologia de Tóquio (TUAT). Todos os isolados foram mantidos em meio SMAY [15]. [Peptona: 10 g; Extrato de levedura: 2 g; Dextrose: 40 g; Ágar: 20 g; Água destilada: 1000 mL (pH = 6)] e a suspensão de esporos foi preparada a partir de culturas de *M. rileyi* com 15 dias de idade. A superfície do fungo foi raspada usando uma alça estéril com 10 ml de água destilada estéril contendo Tween 80® a 0,02% como agente umectante [16]. A suspensão foi então filtrada através de pano de musselina estéril para eliminar o meio [17]. A concentração de esporos do filtrado foi determinada usando um hemocítmetro Neubauer. Diferentes concentrações de esporos foram preparadas adicionando Tween 80® estéreis a 0,02% em água destilada. Suspensão de esporos de *M. rileyi* em quatro concentrações diferentes, conídios de *M. rileyi* foram suspensos em uma solução de Tween 80® a 0,1%, contados com um hemocítmetro e ajustados para 5×10^8 , 5×10^7 , 5×10^6 , 5×10^5 conídios/ml.

4.2.3 Bioensaio

As larvas que ingeriram completamente a suspensão foram transferidas individualmente para copos plásticos de 30 ml com um pedaço de dieta artificial fresca (8 mm de diâmetro, 1 mm de espessura) e mantidas a 25 °C sob fotoperíodo 16L: 8D até a morte ou pupação. A mortalidade das larvas foi verificada diariamente.

4.2.4 Efeito letal de conídios de *Metharhizium rileyi* contra larvas de *Spodoptera litura*

Conídios de *M. rileyi* foram suspensos em solução de Tween 80® a 0,02%, contados em hemocitômetro e ajustados para diluições 5×10^8 , 5×10^7 , 5×10^6 , 5×10^5 conídios/ml. Larvas de 3º instar foram selecionadas respectivamente. Após imersão em suspensões de esporos por 10 segundos, seus tegumentos foram secos em papel filtro estéril. O número de larvas mortas e o tempo de mortalidade foram registrados todos os dias. Apenas larvas mortas exibindo sinais de micose de *M. rileyi* foram registradas, para se ter a certeza que a morte foi induzida pela infecção de *M. rileyi*. O ensaio foi repetido três vezes. Os dados foram analisados com SPSS 22.0 para calcular os valores Tempo letal (TL₅₀) e concentração letal (CL₅₀).

4.2.5 Isolamento de cadáveres infectados

O meio Sabouraud's Maltose Agar suplementado com meio de extrato de levedura a 2% (SMAY) foi usado para isolar o fungo. Os conídios de *M. rileyi* formados nos cadáveres foram coletados com uma alça micológica e semeados em meio SMAY. Após incubação em temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ \text{C}$) por uma semana, as colônias obtidas foram subcultivadas em meio SMAY para preservação. Os isolados foram identificados por observação microscópica dos conídios formadores de micélios quanto à estrutura conidiogênica e morfologia dos conídios [18], [19] (Fig. 1); e os isolados de *M. rileyi* foram refrigerados a 4°C .

4.2.6 Bioensaio de infecção

A taxa de infecção dos isolados de *M. rileyi* em larvas de *S. litura* foi estudada por meio de bioensaios larvais na dose de $5,2 \times 10^8$ conídios/ml. Para a realização de bioensaios larvas de *S. litura* foram imersas na suspensão de esporos de *M. rileyi* em solução de Tween 80® a 0,02%. Os controles foram realizados mergulhando as larvas apenas em solução de Tween 80® a 0,02%. A imersão ocorreu por dez segundos.

Após a imersão as larvas foram colocadas em papel filtro para drenar o excesso de solução, após isso, foi mantida normalmente a alimentação das larvas com dieta artificial. O experimento foi realizado em três replicatas utilizando 35 larvas para cada dose.

4.2.7 Análise Estatística

Valores TL_{50} , CL_{50} e níveis de significância (ANOVA, $P < 0,05$) foram analisados com SPSS 22.0, e os gráficos realizados no Microsoft Excel.

4.3 RESULTADOS

Os bioensaios demonstraram uma resistência dos instares à infecção por *M. rileyi*. Os valores de CL_{50} aumentaram de $6,35 \times 10^6$ conídios/ml para até $3,95 \times 10^7$ conídios/ml para larvas de 3º e 5º instar, respectivamente (Tabela 2). Além disso, para comparar a patogenicidade dos conídios de *M. rileyi* contra larvas de diferentes instares de *S. litura*, o índice de virulência (IV) foi adotado, onde o IV foi de 1,00 para larvas de 3º instar e 0,160 para larvas de 5º instar. Os resultados mostraram que a virulência de *M. rileyi* diminuiu com o desenvolvimento das larvas, principalmente nas lavras de 5º instar que foi cerca de 10 vezes menor que o 3º instar (Tabelas 3 e 4, Figura 2).

4.4 DISCUSSÃO

Os insetos apresentam diversas estratégias e mecanismos de defesa que podem ser utilizados no combate a agentes biológicos, como fungos entomopatogênicos. Esses mecanismos de defesa podem ser de natureza química ou física (ou ambas).

Provavelmente, a cutícula é a barreira primária à infecção fúngica [20], portanto, a penetração rápida e direta na cutícula, que pode resultar em um menor tempo letal contra os insetos, é de vital importância para a patogenicidade dos fungos [21]. Muitas pesquisas têm sido realizadas para interpretar os mecanismos de infecção de fungos entomopatogênicos [22] e a interação com o corpo do inseto, principalmente as enzimas degradadoras da cutícula. Alguns mecanismos de defesa à penetração da cutícula incluem a produção de compostos antimicrobianos cuticulares, a queda da cutícula durante o desenvolvimento e as condições ambientais [23]. Inferiu-se que o desenvolvimento da cutícula está envolvido na adesão dos conídios e no crescimento do fungo, pois o TL_{50} do 5º instar é maior do que o 3º instar (Fig. 1).

Estudos revelaram que larvas de terceiro instar de *S. litura* exposta a suspensão de *M. rileyi*, na concentração de 10^8 conídios/ml apresentou tempo letal médio (TL_{50}) entre 5,5 a 6,6 dias [24]. Neste estudo o TL_{50} foi de 4,84 dias, onde o

valor está de acordo com Liu et al. [25] que obteve TL_{50} de 4,35 dias para larvas de terceiro ínstar. É muito interessante notar que o TL_{50} aumentou o número de dias no que diz respeito à idade (instar) das larvas, provavelmente porque o inseto possui melhores parâmetros de desenvolvimento corporal e nutricional. Além disso, as condições ambientais podem reduzir a patogenicidade da aplicação.

Após o óbito, foi observado a mumificação total do cadáver (fig. 2) em sete dias após a aplicação, sendo possível acompanhar o desenvolvimento da infecção durante um período de 30 dias.

4.5 CONCLUSÃO

Isolado de *Metharhizium rileyi* apresentou potencial no controle de *Spodoptera litura* na dose de $5,2 \times 10^8$ conídios ml^{-1} causando mortalidade em torno de 60-80%. Fatores como virulência e viabilidade de esporos também devem ser considerados para a produção comercial do produto biológico

AGRADECIMENTOS

Luis Eduardo Pontes Stefanelli, Ramon De Marchi Garcia e Tarcisio Marcos Macedo Mota Filho agradecem o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001. Luiz Carlos Forti agradece o apoio do Conselho Nacional de Ciência, Pesquisa e Tecnologia (CNPq-PQ) (doação nº 301938 / 2017-2). O autor Luis Eduardo Pontes Stefanelli agradece ao Programa La-CEP (Um Programa de Educação Co-Criativa de Humanidades e Ciências para resolver os problemas globais que confrontam o Japão e a América Latina) e ao governo japonês. Além disso, um agradecimento especial para Professora Dra. Madoka Nakai, [Departamento de Agricultura (Universidade de Agricultura de Tóquio e Tecnologia)], pelo incentivo, grande interesse no andamento da pesquisa e por disponibilizar a cultura do fungo e as instalações necessárias para a execução da pesquisa. Os autores agradecem o apoio fornecido pela Universidade de Agricultura e Tecnologia de Tóquio (TUAT) para a realização do estudo.

REFERÊNCIAS

- [1] T.S. Rajan, and N. Muthukrishnan. Pathogenicity of *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson isolates against *Spodoptera litura* (Fabricius). *Journal Biological Control*, v. 23, n. 1, p. 17-20, 2009.
- [2] N. Mallikarjuna, K.R. Kranthi, D.R. Jadhav, S. Kranthi, and S. Chandra. Influence of foliar chemical compounds on the development of *Spodoptera litura* (Fab.) in interspecific derivatives of groundnut. *Journal of Applied Entomology*, v. 128, n. 5, p. 321-328, 2004.
- [3] J. Yao, Y. Liu, Y. Tuo, J. Zhu, X. Qin, J. Dong, S. Qu, and Z. Yu. Studies on the growth metabolism of *Bacillus thuringiensis* and its vegetative insecticidal protein engineered strains by microcalorimetry. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 42, n. 3, p. 274-277, 2006.
- [4] B.C. Dhir, H.K. Mohapatra, and B. Senapati. Assessment of crop loss in groundnut due to tobacco caterpillar, *Spodoptera litura* (F.). *Indian Journal of Plant Protection*, v. 20, n. 2, p. 215-217, 1992.
- [5] G.S. Dhaliwal, V. Jindal, and A.K. Dhawan. Insect pest problems and crop losses: changing trends. *Indian Journal of Ecology*, v. 37, n. 1, p. 1-7, 2010.
- [6] S.P. Singh, and S.K. Jalali. Management of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) In India. Proc. National Scientists Forum *Spodoptera litura*, 2-4, April, 1996, ICRISAT Asia Centre, ICRISAT, Patancheru, Andhra Pradesh, India, 27-65, 1997.
- [7] K.N.H. Joshi. Characterization of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) germplasm in relation to major foliar pests and diseases. Ph.D. Thesis, Saurashtra University, Rajkot, India, 2005.
- [8] M. Ahmad, M.A. Saleem, and A.H. Sayyed. Efficacy of insecticide mixtures against pyrethroid-and organophosphate-resistant populations of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Management Science: Formerly Pesticide Science*, v. 65, n. 3, p. 266-274, 2009.
- [9] A.H. Sayyed, M. Ahmad, and M.A. Saleem. Cross-resistance and genetics of resistance to indoxacarb in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, v. 101, n. 2, p. 472-479, 2014.

- [10] M.A. Saleem, G.K. Naidu, P.S. Tippannavar, and H.L. Nadaf. Biophysical and biochemical mechanism of resistance to *Spodoptera litura* in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Journal of Entomology and Zoology Studies*, v. 7, n. 4, p. 86-96, 2019.
- [11] R.M. Kepler, R.A. Humber, J.F. Bischoff, and S.A. Rehner. Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. *Mycologia*, v. 106, n. 4, p. 811-829, 2014.
- [12] S.B. Alves. Controle microbiano de insetos. 1998.
- [13] C.M. Ignoffo. The fungus *Nomuraea rileyi* as a microbial insecticide. In: H.D. Burges (ed). *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970–1980*. New York: Academic Press, p. 513–538, 1981.
- [14] J. Takatsuka, S. Okuno, M. Nakai, and Y. Kunimi. Genetic and phenotypic comparisons of viral genotypes from two nucleopolyhedroviruses interacting with a common host species, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 139, p. 42-49, 2016.
- [15] M.S Goettel, and G.D. Inglis. Fungi: Hyphomycetes. In: L.A. Lacey (ed). *Manual of techniques in insect pathology*. London: Academic Press. pp 213-249, 1997.
- [16] M.C. ROMBACH, R.M. Aguda, B.M. Shepard, and D. Roberts. Infection of rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae), by field application of entomopathogenic Hyphomycetes (Deuteromycotina). *Environmental Entomology*, v. 15, n. 5, p. 1070-1073, 1986.
- [17] K.R. Sasidharan, and R.V. Varma. Laboratory evaluation of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin against *Indarbela quadrinotata* Walker (Lepidoptera: Metarbelidae)-a key pest of *Casuarina equisetifolia* L. in Tamil Nadu. *Journal of Biological Control*, v. 19, n. 2, p. 197-199, 2005.
- [18] R.A. Samson, H.C. Evans, J.P. and Latge. *Atlas of Entomopathogenic Fungi*. Springer Verlag, Berlin, 1988.
- [19] J. Aoki. *A key to Insect Pathogenic Fungi*. Zenkoku Noson Kyoiku Kyokai (Sonkyo Sonkyo), Tokyo, Japan. p. 280, 1989.

- [20] N.O. Keyhani. Lipid biology in fungal stress and virulence: entomopathogenic fungi. *Fungal biology*, v. 122, n. 6, p. 420-429, 2018.
- [21] S.A. Dar, B.A. Rather, and A.A. Kandoo. Insect pest management by entomopathogenic fungi. *J. Entomol. Zool. Stud*, v. 5, p. 1185-1190, 2017.
- [22] K.M.S. Aw, and S.M. Hue. Mode of infection of *Metarhizium* spp. fungus and their potential as biological control agents. *Journal of Fungi*, v. 3, n. 2, p. 30, 2017.
- [23] A. Ortiz-Urquiza, N.O. Keyhani. Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects*, v. 4, n. 3, p. 357-374, 2013.
- [24] M.S. Padanad, and P.U. Krishnaraj. Pathogenicity of native entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* against *Spodoptera litura*. *Plant Health Progress*, v. 10, n. 1, p. 11, 2009.
- [25] S. Liu, Z. Xu, X. Wang, L. Zhao, G. Wang, X. Li, and L. Zhang. Pathogenicity and in vivo Development of *Metarhizium rileyi* Against *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae. *Journal of Economic Entomology*, v. 112, n. 4, p. 1598-1603, 2019.

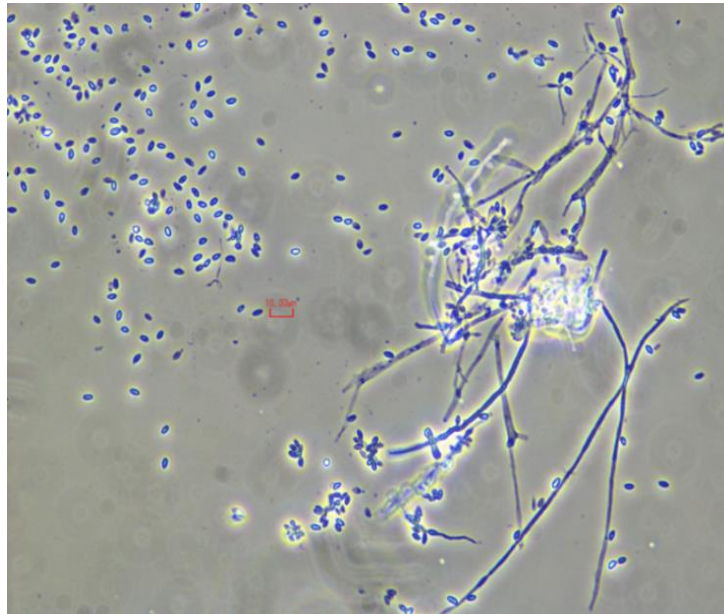


Fig 1. Imagem microscópica de isolados de *Metharhizium rileyi*: hifas vegetativas e conidióforos (aumento de 400 ×)

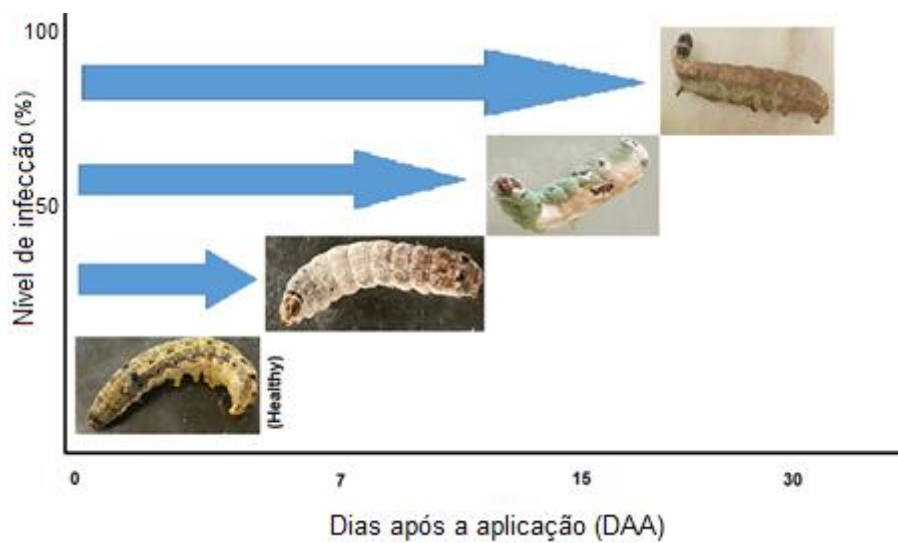


Fig 2. Nível de infecção de Larvas de *Spodoptera Litura* após a exposição ao fungo *Metharhizium rileyi*

Tabela 1. Algumas espécies de insetos de importância agrícola suscetíveis ao *Metarhizium rileyi*.

Espécies	Planta Hospedeira	Ocorrência	País
<i>Alabama argilácea</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	Campo	Brasil
<i>Agrotis ipsilon</i>	<i>Glycine max</i>	Natureza	USA
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Glycine max</i>	Natureza	Brasil
<i>Cirphis latiuscula</i>	<i>Saccharum officinarum</i>	Natureza	Brasil
<i>Diatrea saccharalis</i>	<i>Saccharum officinarum</i>	Natureza	Brasil
<i>Helicoverpa zea</i>	<i>Zea mays</i> <i>Glycine max</i> <i>Gossypium hirsutum</i>	Natureza	USA/Brasil
<i>Heliothis virescens</i>	<i>Glycine max</i> <i>Gossypium hirsutum</i>	Natureza	USA
<i>Plusia sp.</i>	<i>Glycine max</i>	Natureza	Brasil
<i>Spodoptera frugiperda</i>	<i>Zea mays</i>	Laboratório	Brasil
<i>Trichoplusia ni</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	Natureza	Brasil

Fonte: adaptado Alves [12]; Ignoffo [13]

Tabela 2. Concentração letal (CL₅₀) conidio/ml de *Metarhizium rileyi* contra larvas de *Spodoptera litura*

Instar	Regressão	CL ₅₀	Limite de confiança a 95%	Índice de Virulência
Terceiro	$Y = -4,547 + 0.639x$	$6,35 \times 10^6$	$1,64 \times 10^6 \sim 1,90 \times 10^7$	1,00
Quinto	$Y = -4,848 + 0.543x$	$3,95 \times 10^7$	$1.45 \times 10^6 \sim 8.45 \times 10^7$	0,160

Analísado com o modelo PROBIT: PROBIT (Y) = Intercept + Bx (Covariates x são transformados usando o logaritmo de base 10.000).

Tabela 3. Efeito de *Metarhizium. rileyi* no crescimento de larvas de *Spodoptera litura* (3º instar)

Tratamentos	Cápsula da cabeça (mm)	Largura (mm)	Comprimento (mm)	Peso (mg)
Controle	0,99± 0,12 (0,9 - 1,00) c	1,54 ± 0,04 (1,50 - 1,56) b	11,38 ± 2,3 (9,00 - 13,00) c	370,8 c
5 x 10 ⁵	0,95 ± 0,11 (0,9 - 1,00) b	1,55 ± 0,05 (1,50 - 1,60) b	11,30± 3,1 (9,00 - 13,00) c	360,8 b
5 x 10 ⁶	0,95 ± 0,12 (0,9 - 1,00) b	1,55 ± 0,02 (1,50 - 1,56) b	11,21 ± 2,4 (9,00 - 13,00) b	360,2 b
5 x 10 ⁷	0,90 ± 0,14 (0,9 - 1,00) a	1,40 ± 0,04 (1,50 - 1,58) a	10,01 ± 2,3 (9,00 - 13,00) a	351,7 a
5 x 10 ⁸	0,90 ± 0,11 (0,9 - 1,00) a	1,39 ± 0,07 (1,50 - 1,56) a	10,05 ± 2,2 (9,00 - 13,00) a	351,3 a
CD	0,52	4,15	10,12	43,6

Valores triplicados. Letras diferentes em na coluna diferem significativamente (5%) por LSD.

Tabela 4. Efeito de *Metarhizium. rileyi* no crescimento de larvas de *Spodoptera litura* (5º instar)

Tratamentos	Cápsula da cabeça (mm)	Largura (mm)	Comprimento (mm)	Peso (mg)
Controle	2,75 ± 0,50 (2,50 - 3,25) a	5,28 ± 0,70 (5,00 – 7,00) b	37,40 ± 2,30 (35,00 – 40,00) b	396,5 c
5 x 10 ⁵	2,74 ± 0,10 (2,70 – 3,00) a	5,31 ± 0,95 (5,00- 6,00) b	37,30 ± 3,1 (36,00 – 40,00) b	395,8 c
5 x 10 ⁶	2,75 ± 0,12 (2,50 – 3,0) a	5,29 ± 0,12 (5,00- 6,00) b	37,25 ± 2,3 (35,00 - 40,00) b	394,2 c
5 x 10 ⁷	2,76 ± 0,14 (2,60 – 3,00) a	4,35 ± 0,25 (4,00- 5,00) a	31,13 ± 4,2 (30,00-40,00) a	380,7 b
5 x 10 ⁸	2,75 ± 0,11 (2,50- 3,00) a	4,21 ± 0,45 (4,00 – 5,00) a	30,89 ± 2,4 (30,00 - 40,00) a	370,3 a
CD	0,50	5,27	8,22	23,3

Valores triplicados. Letras diferentes em na coluna diferem significativamente (5%) por LSD

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A prospecção de agentes para o biocontrole das formigas cortadeiras e lagarta do tabaco é uma linha de pesquisa importante dentro do contexto econômico, uma vez que estes causam perdas significativas na agricultura. Além disso, a busca por métodos que viabilizem o controle biológico é importante ao meio ambiente, já que os produtos químicos, atualmente utilizados, acumulam-se na natureza e não são biodegradados sob as condições ambientais.

No presente estudo exploramos os fungos entomopatogênicos, importantes patógenos a diversos insetos; e este nos permite evidenciar o potencial dos fungos *Beauveria bassiana* e *Trichoderma harzianum* no controle de formigas cortadeira, *Atta sexdens*; e do fungo *Metharhizium rileyi* no controle da lagarta do tabaco, *Spodoptera litura*. No entanto, torna-se necessário o aprimoramento das formulações para que os entomopatógenos, quando pulverizados, permaneçam efetivos por mais tempo e possam ser mais efetivos no controle dos insetos-praga.

REFERÊNCIAS

- ABROL, D. P.; SHANKAR, U. Pesticides, food safety and integrated pest management. In: **Integrated pest management**. Springer, Dordrecht, p. 167-199, 2014.
- AHMAD, M. et al. Evidence for field evolved resistance to newer insecticides in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) from Pakistan. **Crop Protection**, v. 27, n. 10, p. 1367-1372, 2008.
- AHMAD, M.; ARIF, M. I.; AHMAD, Munir. Occurrence of insecticide resistance in field populations of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) in Pakistan. **Crop Protection**, v. 26, n. 6, p. 809-817, 2007.
- AVENDAÑO, S. M.; LIU, J. Production of PFOS from aerobic soil biotransformation of two perfluoroalkyl sulfonamide derivatives. **Chemosphere**, v. 119, p. 1084-1090, 2015.
- AYYUB, M. B. et al. Individual and combined impact of nuclear polyhedrosis virus and spinosad to control the tropical armyworm, *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae), in cotton in Pakistan. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 29, n. 1, p. 1-6, 2019.
- BHARANI, R. S A.; NAMASIVAYAM, S. Karthick Raja. Biogenic silver nanoparticles mediated stress on developmental period and gut physiology of major lepidopteran pest *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae)—An eco-friendly approach of insect pest control. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, n. 1, p. 453-467, 2017.
- BRITTO, J. S. et al. Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. **International Journal of Research Environmental Studies**, v. 3, p. 11-92, 2016.
- CRISTIANO, M. P. et al. *Amoimyrmex* Cristiano, Cardoso & Sandoval, gen. nov. (Hymenoptera: Formicidae): a new genus of leaf-cutting ants revealed by multilocus molecular phylogenetic and morphological analyses. **Austral Entomology**, v. 59, n. 4, p. 643-676, 2020.
- CRUZ, I. Manejo Integrado de pragas de milho com ênfase para o controle biológico. In: Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: CICLO DE PALESTRAS SOBRE CONTROLE BIOLOGICO DE PRAGAS, 4., 1995. Anais. Campinas: **Sociedade Entomológica do Brasil**, 1995. p. 48-92., 1995.
- DELLA LUCIA, T. M. C. **Formigas-Cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: UFV, 2011. 419 p
- DHIR, B. C. et al. Assessment of crop loss in groundnut due to tobacco caterpillar, *Spodoptera litura* (F.). **Indian Journal of Plant Protection**, v. 20, n. 2, p. 215-217, 1992.

FOLGARAIT, P. et al. Preliminary in vitro insights into the use of natural fungal pathogens of leaf-cutting ants as biocontrol agents. **Current Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 250-258, 2011.

FRAGOSO, D. B. et al. Seletividade de inseticidas a vespas predadoras de *Leucoptera coffeella* (Guér. -Mènev.) (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 1, p. 139-143, 2001.

KEPLER, R. M. et al. Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene phylogenetics. **Mycologia**, v. 106, n. 4, p. 811-829, 2014.

LI, D. et al. Functional Analysis of SIGSTE12 in Pyrethroid and Organophosphate Resistance in *Spodoptera litura*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, p. 5840 – 5848, 2021.

MOTA FILHO, T. M. M. et al. Allogrooming, Self-grooming, and Touching Behavior as a Mechanism to Disperse Insecticides Inside Colonies of a Leaf-Cutting Ant. **Neotropical Entomology**, p. 1-8, 2021.

MOTA FILHO, T. M. M. et al. Contamination routes and mortality of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) by the insecticides fipronil and sulfluramid through social interactions. **Pest Management Science**, v. 77, p. 4411–4417, 2021.

MUELLER, U. G. et al. Phylogenetic patterns of ant–fungus associations indicate that farming strategies, not only a superior fungal cultivar, explain the ecological success of leafcutter ants. **Molecular Ecology**, v. 27, n. 10, 2414–2434, 2018.

NASCIMENTO, R. A. et al. Sulfluramid use in Brazilian agriculture: A source of per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) to the environment. **Environmental Pollution**, v. 242, p. 1436-1443, 2018.

ORTIZ, A.; ORDUZ, S. In vitro evaluation of *Trichoderma* and *Gliocladium* antagonism against the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. **Mycopathologia**, v. 150, n. 2, p. 53-60, 2001.

PIMENTEL, D. Pesticides and pest control. In: **Integrated pest management: innovation development process**. Springer, Dordrecht, p. 83-87, 2009

RAJAN, T. S.; MUTHUKRISHNAN, N. Pathogenicity of *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson isolates against *Spodoptera litura* (Fabricius). **Journal of Biological Control**, v. 23, n. 1, p. 17-20, 2009.

SALEEM, M. A. et al. Resistance to selected organochlorin, organophosphate, carbamate and pyrethroid, in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) from Pakistan. **Journal of Economic Entomology**, v. 101, n. 5, p. 1667-1675, 2008.

SHAD, S. A. et al. Field evolved resistance to carbamates, organophosphates, pyrethroids, and new chemistry insecticides in *Spodoptera litura* Fab. (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Pest Science**, v. 85, n. 1, p. 153-162, 2012.

SOLOMON, S. E. et al. Paleodistributions and comparative molecular phylogeography of leafcutter ants (*Atta spp.*) provide new insight into the origins of Amazonian diversity. **PLoS One**, v. 3, n. 7, 2008.

TONG, H. et al. Field resistance of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) to organophosphates, pyrethroids, carbamates and four newer chemistry insecticides in Hunan, China. **Journal of Pest Science**, v. 86, n. 3, p. 599-609, 2013.

VERMA, M. et al. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, n. 1, p. 1-20, 2007.

WARD, P. S. Ants. **Current Biology**, v. 16, n. 5, p. R152-R155, 2006.

WEBER, N. A. Gardening ants, the attines Memoirs of the American Philosophical Society. **Philadelphia, PA**, 1972.

WEBER, N.A. Northern extent of Attine ants (Hymenoptera: Formicidae). **Proc. Entomol. Soc. Wash.**, v. 72, p. 414-5. 1970.

XIA, X. et al. Characterization of *Spodoptera litura* gut bacteria and their role in feeding and growth of the host. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1492, 2020.

ZHANG, J. et al. Circadian regulation of night feeding and daytime detoxification in a formidable Asian pest *Spodoptera litura*. **Communications Biology**, v. 4, n. 1, p. 1-11, 2021.