

RAPHAEL VACCHI TRAVAGLINI

BASES PARA O CONTROLE MICROBIANO DE FORMIGAS CORTADEIRAS

Botucatu

Novembro 2017

RAPHAEL VACCHI TRAVAGLINI

BASES PARA O CONTROLE MICROBIANO DE FORMIGAS CORTADEIRAS

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

Orientador: Luiz Carlos Forti

Co-orientadora: Maria Izabel
Camargo-Mathias

Botucatu

Novembro 2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

T779b Travaglini, Raphael Vacchi, 1990-
Bases para o controle microbiano de formigas cortadeiras / Raphael Vacchi Travaglini. - Botucatu: [s.n.], 2017
91 p.: il., color., grafs., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2017
Orientador: Luiz Carlos Forti
Coorientador: Maria Izabel Camargo-Mathias
Inclui bibliografia

1. Formiga-cortadeira. 2. Pragas agrícolas - Controle biológico. 3. Fungos. I. Forti, Luiz Carlos. II. Camargo-Mathia, Maria Izabel. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.

Elaborada por Maria Lúcia Martins Frederico - CRB-8:5255

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: BASES PARA O CONTROLE MICROBIANO DE FORMIGAS CORTADEIRAS

AUTOR: RAPHAEL VACCHI TRAVAGLINI

ORIENTADOR: LUIZ CARLOS FORTI

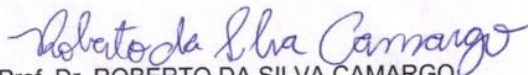
COORIENTADORA: MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO

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



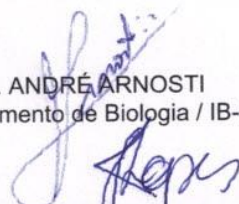
Prof. Dr. LUIZ CARLOS FORTI

Dep de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciencias Agronomicas de Botucatu



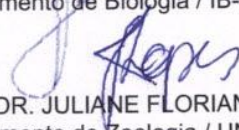
Prof. Dr. ROBERTO DA SILVA CAMARGO

Departamento de Proteção Vegetal (Pós-Doutorando) / Faculdade de Ciencias Agronomicas de Botucatu



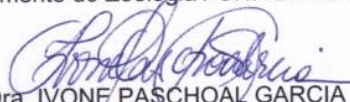
Prof. Dr. ANDRÉ ARNOSTI

Departamento de Biologia / IB-Rio Claro



PROF. DR. JULIANE FLORIANO LOPES SANTOS

Departamento de Zoologia / UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA



Profa. Dra. IVONE PASCHOAL GARCIA

. / Escola Técnica Estadual (Colégio Agrícola)- São Manuel

Botucatu, 10 de novembro de 2017

Dedicatória

A todos aqueles que não tiveram a oportunidade de estudar

Por que buscam realizar um sonho.

AGRADECIMENTOS

Por este aguardado dia, ao nosso Deus agradeço.

Aos meus familiares pelo apoio, principalmente em momentos de crise.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Forti, pela oportunidade e aos membros do LISP por manterem o laboratório.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por não falhar nos pagamentos.

Aos co-autores Dr. André Arnosti, Dr. Roberto da Silva Camargo e em especial a Dra. Maria Izabel de Souza Camargo (Bel), por auxiliar na escrita dos capítulos.

Aos colaboradores, pois sem eles a tese não seria a mesma, aos fornecedores de fungos Prof. Dr. Andre Rodrigues e a empresa Tecnicontrol.

Aos alunos Bruno Tamelini e Luis Eduardo Pontes Stefanelli, por auxiliarem com o preparo dos testes.

Epígrafe

“Por mais que a gente cresça há sempre coisas que a gente não pode entender”.

Engenheiros do Hawaii: Terra de gigantes.
Composição: Humberto Gessinger

RESUMO

O controle biológico tem recebido atenção dos pesquisadores, principalmente devido aos movimentos, de preservação do ambiente. Têm sido amplamente aplicado em espécies consideradas importantes pragas agrícolas, porém não indicado para as formigas cortadeiras. Tais formigas apresentam um conjunto de estratégias físicas, químicas e comportamentais que as operárias realizam a fim de evitar a própria contaminação e da colônia. Entretanto alguns microorganismos conseguem causar mortalidade de alguns membros da colônia, como os fungos entomopatogênicos. Pretende-se fornecer conhecimentos básicos para desenvolvimento de novas estratégias de controle microbiano das formigas cortadeiras em um futuro próximo. Para tanto estudamos quatro fungos com grande potencial patogênico, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Aspergillus flavus* e *Trichoderma asperellus*. Primeiramente foram estudados a patogenicidade dos fungos (entomopatogeno e oportunista) em operarias isoladas da colônia. Estudou-se a susceptibilidade de larvas e adultos de formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* a conídios de *B. bassiana*, por meio de técnicas histológicas e de microscopia. Finalmente encapsulados com conídios foram veiculados para o jardim de fungo simbiote visando o controle de mini colônias em laboratório. Propomos a elaboração de novas alternativas aos manejos existentes.

Palavras-chave: Fungos entomopatogênicos. Antagonista. Colônia. Imaturos.

ABSTRACT

Biological control has received attention of the researchers, mainly due to the movements, of preservation of the environment. They have been widely applied in species considered important agricultural pests, but not indicated for leaf cutting ants. These ants present a set of physical, chemical and behavioral strategies that the workers realize in order to avoid the own contamination and the colony. However, some microorganisms can cause mortality of some members of the colony, such as entomopathogenic fungi. It is intended to provide basic knowledge for the development of new strategies for microbial control of leaf-cutting ants in the near future. For this, we studied four fungi with great pathogenic potential, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Aspergillus flavus* and *Trichoderma asperellus*. First, the pathogenicity of fungi (entomopathogen and opportunist) was studied in workers isolated from the colony. The susceptibility of larvae and adults of leaf-cutting ants *Atta sexdens rubropilosa* to *B. bassiana* conidia was studied by means of histological and microscopy techniques. Finally encapsulated with conidia were conveyed to the symbiotic fungus garden aiming the control of mini colonies in the laboratory. We propose the elaboration of new alternatives to existing management.

Keywords: Entomopathogenic fungi. Antagonist. Colony. Immature.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cap. 1 - Análise de sobrevivência, <i>Log Rank test</i>	33
Tabela 2. Cap. 1– Regiões do corpo de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> onde foram observadas a presença de fungos das espécies <i>B. bassiana</i> e <i>M. anisopliae</i> e <i>A. flavus</i> , bem como a determinação das fases (adesão germinação e penetração) em relação aos tempos de exposição (24, 48, 72 horas) no inseto.....	37
Tabela 1. Cap. 2– Resumo da dinâmica de adesão (a), germinação (g) e de penetração (p) dos conídios e hifas do fungo <i>B. bassiana</i> em suspensão, no integumento de larvas e de operárias adultas de formigas <i>Atta sexdens rubropilosa</i> , nos tempos de 24, 48 e 72 horas pós-exposição.....	53
Tabela 1. Cap. 3– Comportamentos das operárias pequenas para as cápsulas contendo <i>M. anisopliae</i>	72
Tabela 2. Cap. 3– Comportamentos das operárias médias para as cápsulas contendo <i>M. anisopliae</i>	72
Tabela 3. Cap. 3– Comportamentos das operárias pequenas para as cápsulas contendo <i>T. asperellus</i>	73
Tabela 4. Cap. 3– Comportamentos das operárias médias para as cápsulas contendo <i>T. asperellus</i>	74

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Cap 1. Formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa*: **a**-bulbo antenal, **b**-clipeo, **c**-gaster.....31
- Figura 2.** Cap 1. Regiões do corpo de operárias de *A. sexdens rubropilosa*, contendo *B. bassiana* (**A-C**), *M. anisopliae* (**D-F**) e *A. flavus* (**G-I**) fungos, nas fases de: adesão, germinação e penetração em relação aos períodos de exposição de: 24, 48, 72 horas. **A**: conídio aderido no tegumento, **D** e **G**: aglomerado de conídios, **I**: conídios germinando na fossa antenal. **Barra de escala:** 20 µm.....34
- Figura 1.** Cap 2. Padrão de infecção do tegumento de larvas de *Atta sexdens rubropilosa* capturado por MEV e HE, **A**: visão geral, **B**: adesão de *B. bassiana* na região oral (24h), **C**: germinação de *B. bassiana* no tegumento (48h) e **D**: hifas de *B. bassiana* recobrando o tegumento da larva (72h), **E**: conídios aderidos iniciando a germinação (24h), **F**: hifas penetrando o tegumento (48h) e **G**: hifas desenvolvendo (72h). **c**: conídio, **h**: hifa e **int**: tegumento, Barra de escala larva 0,5mm, MEV (**B**, **C** e **D**) e HE (**E**, **F** e **G**) 20µm.....51
- Figura 2.** Cap 2. Padrão de infecção do tegumento de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* capturado por MEV e HE, **A**: visão geral da operária, **B**: conídio de *B. bassiana* aderido no tegumento (24h), **C**: conídio germinando no tegumento (48h), **D**: conídio desenvolvendo na região do nó (72h). **E** e **F**: conídios aderidos nas irregularidades do tegumento (24h e 48h) e **G**: conídios penetrando no tegumento (72h). **c**: conídio, **h**: hifa e **int**: tegumento. Barra de escala Operária 0,5mm e MEV (**B**, **C** e **D**) e HE (**F**, **G** e **H**) 20µm.....52
- Figura 3.** Cap 2. Padrão do tegumento de larvas (**A**) e das operárias adultas (**B**) comparando em 48 horas a germinação e penetração por *B. bassiana* na larva (**C**) em relação apenas a adesão neste tempo para os adultos (**D**).....53
- Figura 4.** Cap 2. Hifa desenvolvendo no sentido oposta da abertura natural.....57
- Figura 5.** Cap 2. Hifas ao redor de um espiráculo próximo a uma sensila.....57
- Figura 1:** Cap 3. Dispositivo para manutenção de colônias em laboratório.....65
- Figura 2:** Cap 3. **A**) Transporte coletivo da cápsula pelos tubos de conexão do dispositivo, **B**) transporte da cápsula por uma operária (**M**). **C**) Posicionamento da cápsula no jardim de fungo simbiote e **D**) Incorporação do fungo *M. anisopliae* após abertura da cápsula. Fonte: Autor. (Barra de escala 2 mm).....70
- Figura 3.** Cap 3. Prancha com: **A**) modelo de colônia usada para observação, **B**) transporte coletivo de cápsula contendo *T. asperellus*, **C**) Ato de lamber a cápsula, **D**) Ato de segurar a cápsula próxima a rainha, **E**) Ato de incorporar o conteúdo da cápsula (*M. anisopliae*) e **F**) Comportamento de incorporação próximo ao imaturo (pupa) da colônia.....71

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	21
OBJETIVOS.....	26
CAPÍTULO 1: MAPEAMENTO DAS REGIÕES DE ADESÃO DE DIFERENTES CONÍDIOS EM OPERÁRIAS DE <i>Atta sexdens</i> <i>rubropilosa</i> Forel 1908, (HYMENOPTERA: FORMICIDAE).....	27
1.1 INTRODUÇÃO.....	28
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
1.3 RESULTADOS.....	31
1.4 DISCUSSÃO.....	34
1.5 CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS.....	38
CAPÍTULO 2: O USO DE FUNGO ENTOMOPATOGENO NO CONTROLE BIOLÓGICO DE LARVAS E DE OPERÁRIAS DE FORMIGA CORTADEIRA.....	43
2.1INTRODUÇÃO.....	45
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	46
2.3 RESULTADOS.....	49
2.4 DISCUSSÃO.....	54
REFERÊNCIAS.....	58
CAPÍTULO 3: ISCA ATRATIVA ENCAPSULADA VISANDO CONTROLE MICROBIANO DE FORMIGAS CORTADEIRAS.....	62
3.1 INTRODUÇÃO.....	63
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	65
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
3.4 CONCLUSÃO.....	74
REFERÊNCIAS.....	75
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78
REFERENCIAS.....	82
ANEXO.....	89

INTRODUÇÃO

Como é estabelecida uma colônia de *Atta*?

Basicamente é estruturada pela rainha, esta traz um fragmento de fungo da colônia de origem e logo após o voo nupcial remove as asas para fundar uma nova colônia. Existem várias hipóteses para a simbiose com este fungo (Leucocopridae) (MARICONI, 1970), fato é que esta fica enclausurada no solo (WILSON, 1971, WHEELER, 1906, AUTUORI, 1940), até a emergência das primeiras operárias que auxiliam na construção e expansão das câmaras que compõe o formigueiro, entre elas a de lixo e a do jardim de fungo simbiote (DELLA LUCIA, 2011).

Este inseto social é holometábolo e as operárias se dividem nas funções da colônia no que diz respeito à manutenção, incluindo o cuidado com a prole (ovos, larvas e pupas) e demais divisões de trabalho entre os indivíduos adultos, levando em consideração a morfologia (polimorfismo) e a idade destes (polietismo), o que gera um repertório comportamental variado, muito estudado em trabalhos de etologia, que podem observar o inseto isolado (focando uma casta) ou interagindo com a colônia (superorganismo) (HOLLOBLER; WILSON, 2009).

O ato comportamental do forrageamento é realizado na área externa, onde ocorre o corte e transporte do substrato vegetal, que no interior da colônia é processado e incorporado no jardim de fungo simbiote pelas operárias da colônia (WEBER, 1972, WILSON, 1971). Formigas attinis mantem relação mutualística com o fungo basidiomiceto numa associação obrigatória há estimados 50 milhões de anos (SCHULTZ; BRADY, 2008). As formigas cultivadoras de fungo são encontradas apenas no continente americano, classificadas taxonomicamente em 17 gêneros com mais de 250 espécies descritas compondo a tribo Attini (BRANDÃO et al., 2011; SOSA-CALVO et al., 2013), sendo as cortadeiras propriamente ditas encontradas nos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* que têm importância agrícola no que diz respeito à proteção de plantas, constantemente relatadas causando injúrias na parte aérea destas (DELLA LUCIA, 2011), sendo o modelo biológico estudado neste trabalho apenas a espécie *Atta sexdens rubropilosa* (Saúva-limão), devido à facilidade de adaptação desta as condições proporcionadas pelo Laboratório de Insetos Sociais-Praga (LISP).

Como características taxonômicas e morfológicas possuem o corpo segmentado em três partes (gaster, tórax e cabeça), no gaster tem-se a glândula de veneno como órgão de destaque na marcação de trilha, no torax três pares de pernas ambulatorias, sendo que a presença de asas ocorre apenas na casta reprodutiva, na cabeça um par de antenas geniculadas e um par de mandíbulas especializadas para o corte no caso destas formigas (HOLLOBLER; WILSON, 1990). Este inseto possui um par de glândulas chamadas metapleurais, comum nesta família (Formicidae), que secretam substâncias para o reservatório (bula), ao qual está ligada, sendo que estas substâncias favorecem a sobrevivência destas formigas nos solos em que habitam (DO NASCIMENTO et al., 1996).

Potenciais candidatos para o controle microbiano

Os fungos entomopatogênicos (FEs), possuem uma fase anamórfica em seu ciclo, logo produzem conídios, são classificados no filo Ascomycota e classe Hypocreales, estando entre os patógenos mais usados em programas de controle microbiano, pois necessitam de um hospedeiro para cumprir o ciclo, neste caso usualmente atacam a cutícula por um processo químico-físico, produzindo enzimas quitinolíticas e o grampo de penetração. Nos casos em que o inseto apresenta-se debilitado (moribundo), alguns fungos oportunistas podem realizar esta função também, mesmo os chamados saprófitas podem acelerar o processo de morte de um inseto com baixa imunidade.

Metarhizium anisopliae

O primeiro fungo usado para controle foi *M. anisopliae*, em 1879 por Ilya Metchnikoff, para controle da larva de curculionídeo. No Brasil foi selecionado priorizando a produção de conídio em meio artificial, virulência e resistência à radiação UV, priorizando o controle da broca da cana e de cigarrinhas, inclusive as que ocorrem nas pastagens. É um deuteromiceto da família Moniliaceae que persiste no solo em sua estrutura de resistência, o conídeo, que é uninucleado e oblongo. Após completar o ciclo, apresenta uma muscardine verde formada por micélios na superfície do cadáver do hospedeiro (ALVES, 1998).

Beauveria bassiana

Primeiro fungo a ser estudado por Agostino Bassi pode ser encontrado em inúmeras espécies de artrópodes, sendo que em campo ocorre em forma enzoótica e epizoótica, os conídios são globosos, verrugosos, capazes de colonizar o hospedeiro em média em 72 horas, em condições favoráveis de temperatura e umidade, deixando o cadáver coberto por uma

muscardine branca, resultado do desenvolvimento das hastes e das fiálides do micélio. A Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz e Instituto Biológico de São Paulo mantém coleções deste fungo e desenvolvem projetos visando melhorias no controle a campo, que chega a 90% dependendo da praga alvo (ALVES, 1998).

Aspergillus flavus

Apresenta conídios e conidióforos característicos, esféricos, de superfície irregular. Pode crescer em diversos substratos, até mesmo sendo contaminante de outros fungos formulados, geralmente ataca insetos debilitados, de forma oportunista e no Brasil é relacionado para o controle de formigas do gênero *Atta*, sendo considerado um fungo entomopatogênico facultativo. Possui potencial de risco para saúde animal, por secretar aflatoxina (ALVES, 1998, RIBEIRO et al., 2012, VALENCIA, 2014)

Trichoderma asperellus

Fungos filamentosos do genero *Trichoderma* (Ascomycota: Hypocreaceae) são comumente encontrados no solo de diversas regiões do globo. Considerados micoparasitas facultativos e antagonistas do fungo simbiote das Attinis. Amplamente usado em hortas e em grandes áreas de monoculturas, contra fungos fitopatogênicos (AUGUSTIN et al., 2013, MONTOYA et al., 2016).

Abordando o tema controle microbiano

Atualmente o controle de formigas cortadeiras é realizado com produtos químicos, aplicados principalmente com iscas tóxicas. As iscas constituem o método mais econômico e prático no mercado (FORTI et al., 1993), sendo o mais difundido por proporcionar maior segurança para o operador, dispensa mão de obra e equipamento especializado, facilitando o tratamento de ninhos de difícil acesso. Entretanto nas ultimas décadas, o controle microbiano tem recebido a atenção dos pesquisadores, principalmente devido ao seu apelo sustentável (WILCKEN; BERTI FILHO, 1994).

Testes já foram realizados com microrganismos em geral: nematóides, ácaros e fungos (DELLA LUCIA, 1993), todavia as pesquisas concentram-se, sobretudo, em relações aos fungos entomopatogênicos, pois foram os primeiros patógenos utilizados no controle microbiano de insetos (ALVES, 1998). Um grupo promissor como agente de controle

biológico para formigas cortadeiras incluem fungos patogênicos aos indivíduos da colônia e antagonistas ao fungo simbionte, usados no desenvolvimento de bioinseticidas (LOPEZ; ORDUZ, 2003).

Espécies de fungos deuteromicetos, como *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* são entomopatogênicos generalistas, sendo virulentos a diversos insetos, inclusive aos sociais, ambos reproduzindo obrigatoriamente sobre o hospedeiro. Estudos relacionados com a penetração da cutícula dos hospedeiros demonstram que estes fungos iniciam a colonização do corpo do inseto mediante a formação de estruturas de pressão e produção de enzimas extracelulares proteolíticas como subtilisina (PR1), metaloprotease e com atividades quitinolítica (LEAL et al., 1997).

Entre os sintomas que os fungos entomopatogênicos causam às colônias de formigas cortadeiras incluem-se o aumento na taxa de mortalidade, redução da atividade de forrageamento e na saúde do jardim de fungo, levando indiretamente a colônia ao declínio (JACCOUD et al., 1999).

Em formigas cortadeiras, a ação dos agentes entomopatogênicos varia em função da casta e da forma de aplicação utilizada no estudo, sendo que alguns indivíduos podem ser mais susceptíveis que outros, ou seja, determinado fungo pode acometer soldados e operárias variando a sua virulência (DIEHL-FLEIG et al., 1988).

Trabalhos demonstram que o controle biológico de formigas cortadeiras pode ser bem-sucedido como no controle de outros insetos, uma vez que *M. anisopliae* apresentou potencial patogênico para *Atta sexdens rubropilosa* (JACCOUD et al., 1999), *Atta cephalotes* (LOPEZ; ORDUZ, 2003), *Acromyrmex echinatio* (HUGUES; BOOMSMA, 2003; HUGUES, et al., 2004). Estudos em laboratórios demonstram 100% de mortalidade de grupos isolados de formigas cortadeiras (CASTILHO et al., 2010).

Silva e Diehl-Fleig (1988) verificaram que a atividade alimentar de adultos de ninhos de *Atta sexdens piriventris* tem redução após seis dias da aplicação de *M. anisopliae* em suspensão ou em formulação em pó. Muitos trabalhos também apresentaram os mesmos resultados quanto à atividade alimentar nas colônias tratadas com fungos. Diehl-Fleig et al. (1988) testando diferentes linhagens de fungo *B. bassiana* e uma de *M. anisopliae* em *Atta sexdens piriventris* observam que a patogenicidade depende da linhagem utilizada. Loureiro e Monteiro (2004) testando os isolados AM 9 e JAB 06 de *B. bassiana*, E 9 e AL de *M*

anisopliae e CG 189 e CG 195 de *Paecilomyces farinosus*, (hoje denominado: *Isaria fumosorosea*), inoculados em operarias de *Atta sexdens sexdens*, verificaram uma alta mortalidade destas.

Hughes et al. (2004) investigaram a prevalência de fungos entomopatogenicos associados em ninhos de colônias de formiga cortadeira em floresta tropical e encontraram maior abundancia de *M. anisopliae* próximo aos ninhos. *B. bassiana* e *Aspergillus flavus* também encontrados próximo ao lixo da colonia. Através de análise molecular verifica-se a ocorrência de mais de 20 tipos de isolados para *M. anisopliae*.

Apesar das pesquisas apresentarem resultados satisfatórios em relação ao controle de formigas por fungos, a infecção é controlada por eficientes mecanismos de defesa das colônias pelas formigas (MACHADO et al., 1988). Para contornar os efeitos dos mecanismos de defesa das formigas frente aos parasitas, Diehl-Fleig e Silva (1992) e Spech et al. (1994) formularam esporos de fungos entomopatogênicos em iscas tóxicas com diferentes atrativos, evitando assim que esporos fossem reconhecidos pelas operárias e assim desarticulando o mecanismo de defesa coletivo uma vez no interior da colônia (cavalo de Tróia). De acordo com Lopez e Orduz (2003) esse tipo de controle é efetivo, porém necessita de um período prolongado, cerca de 60 dias para que toda colônia seja invadida (contaminada).

Spech et al. (1994) testaram a atratividade de iscas granuladas contendo o fungo entomopatogenico *B. bassiana*. De acordo com os resultados as iscas são atrativas para as espécies *Acromyrmex crassispinus*, *Acromyrmex heyeri* e *Acromyrmex striatus* em colônias naturais. Demais teses consideram estudos envolvendo atratividade de iscas para o gênero *Atta* (CARDOSO, 2010, ARAUJO, 2011).

Em estudos recentes Santos et al. (2007) abordaram o efeito de fungos entomopatogenicos em colônias de formiga cortadeira após estresse causado por inseticida químico. Selecionaram fungos entomopatogenicos usando combinação com dose subletal de imidacloprid, na perspectiva de controle de *A. sexdens rubropilosa* em colônias de laboratório, esta combinação seria compatível segundo Tamai et al. (2002). Os insetos foram expostos ao Imidacloprid e após 24h aos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* (10^7 conídio ml⁻¹). Como resultado os autores encontraram que a taxa de mortalidade de formigas foi acima de 60% no tratamento combinado comparado com 40% usando apenas o fungo e 10% quando tratadas apenas com a subdose do produto. Como houve diferença significativa acredita-se que a exposição ao produto tornou o inseto mais susceptível ao fungo.

Outra estratégia de defesa das formigas cortadeiras aos entomopatógenos é a variabilidade genética atuando como fator de resistência dos indivíduos. Hugues e Boomsma (2004) verificaram que há variação genética em *Acromyrmex echinator* para a resistência ao parasita *M. anisopliae*. Variação esta semelhante à resistência de doenças tem sido encontrada em *Apis mellifera* (PALMER; OLDROYD, 2003) e em *Bombus terrestris* (BAER; SCHMID-HAMPEL, 2003).

Além disso a quantidade de formigas auxilia no controle da dispersão de entomopatogenos dentro da colônia (OI et al., 2005). Hughes et al. (2002) verificaram que a taxa de transmissão da doença é inversamente proporcional a densidade da população, ou seja, as operarias mantidas em grupo com o entomopatogeno *M. anisopliae*, apresentaram uma maior sobrevivência em relação aquelas mantidas isoladas. Em experimento posterior, Walker e Hugues (2009) verificaram a existência de imunidade social em formigas cortadeiras. Os autores definem imunidade social como expressão de um conjunto de defesa em nível de grupo e de comportamentos, tais como limpeza individual e mútua (CREMER et. al, 2007, CAMARGO et al., 2017). Além da imunidade por respostas umorais conhecida em insetos de forma geral, como por exemplo, excletorização e encapsulamento (COUCEIRO, 2015, DA SILVA, 2002).

Como exposto pelas pesquisas já realizadas com fungos entomopatogenicos, abre-se um leque de estudos visando o controle microbiano em formigas cortadeiras, contudo pretende-se fornecer conhecimento básico necessário para desenvolver novas estratégias de controle, superando alguns fatores que limitam tal técnica de ser aplicada.

OBJETIVOS

O objetivo geral é fomentar a base para o controle microbiano, sendo os objetivos específicos:

- Avaliar a patogenicidade dos fungos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Aspergillus flavus*, mediante teste de sobrevivência.
- Registrar o processo de infecção de *Beauveria bassiana* em larvas e adultos de *Atta sexdens rubropilosa*, por análises ultramorfologica e histológica.
- Utilização de encapsulados contendo fungos entomopatogênico ou antagonista para o controle de mini colônias em laboratório.

CAPÍTULO 1: MAPEAMENTO DAS REGIÕES DE ADESÃO DE DIFERENTES CONÍDIOS EM OPERÁRIAS DE *Atta sexdens rubropilosa* Forel 1908, (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

Travaglini, R.V.¹; Forti, L.C.¹; Silva, L.C.¹; Camargo, R.S.¹; Arnosti, A.²; Camargo-Mathias, M.I.²

¹Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, Programa de Proteção de Plantas, Departamento de Produção Vegetal.

²Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, Instituto de Biociências, Departamento de Biologia.

RESUMO

As formigas do gênero *Atta* são consideradas importantes pragas desfoliadoras, atacando diferentes culturas, pastagens e áreas reflorestadas. Os fungos entomopatogênicos e os fungos oportunistas são considerados inimigos naturais dessas pragas, com potencial para ser usado para controle biológico. A fim de identificar as regiões mais suscetíveis à adesão de conídios, operárias de *Atta sexdens rubropilosa* foram expostos a suspensões (10^6 conídios/mL) dos seguintes fungos: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Aspergillus flavus* e posteriormente submetidos à análise usando microscópio eletrônico de varredura (MEV). Os resultados obtidos para os períodos de 24, 48 e 72 horas mostraram que, após exposição das operárias aos fungos, os conídios de *B. Bassiana* tiveram sucesso em aderir e germinar no corpo da formiga na região da mandíbula; enquanto em *M. anisopliae* esta preferência era restrita ao gaster e, em *A. flavus*, à fossa antenal. Estes resultados sugerem fortemente que o processo de adesão e a germinação de cada fungo ocorrem em diferentes momentos e lugares distintos do corpo do inseto; no entanto, independentemente destes fatores, a infecção leva o inseto à morte. Os resultados do teste de mortalidade não mostraram diferença significativa entre os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*; ou seja, ambos eram virulentos e quando comparados com *A. flavus*, este último apresentou baixo potencial.

Palavras-chave - *Aspergillus flavus*, *Beauveria bassiana*, Controle Biológico, Integumento, *Metarhizium anisopliae*.

1.1 INTRODUÇÃO

As formigas cortadeiras do gênero *Atta* Fabricius (Hymenoptera: Formicidae) são vulgarmente conhecidas como saúvas e constituem um grupo de insetos capazes de causar grandes prejuízos econômicos ao desfolharem parcial ou totalmente culturas de importância para a agricultura e silvicultura (BOARETTO; FORTI, 1997). No Brasil, destaca-se a espécie *Atta sexdens rubropilosa* Forel, popularmente conhecida por saúva-limão, que forrageia uma vasta variedade de espécies vegetais e é uma das principais pragas dos reflorestamentos (CHERRET, 1972, DELLA, LUCIA, 1993). Estes insetos sociais apresentam divisão de castas e trabalham para manutenção do jardim de fungo usado pela colônia (HÖLLDOBLER; WILSON 1990). Organismos de solo convivem com demais microorganismos deste ambiente, entre eles os fungos (BENTO, 1991).

Determinados fungos entomopatogênicos apresentam potencial para serem utilizados no controle biológico de saúvas (JACCOUD, 2000). De acordo com Silva & Diehl-fleig et al. (1988), os fungos entomopatogênicos das espécies *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. têm demonstrado vantagens sobre os formicidas químicos no controle de saúvas.

Segundo Alves (1998) fungos são patógenos capazes de infectar diferentes estágios de desenvolvimento dos hospedeiros, os quais podem ser: ovos, larvas, pupas e adultos de insetos, sendo esta característica bastante desejável quando se pensa em controle. Quando comparados com outros grupos de patógenos, os fungos apresentam certa vantagem, pois a maioria deles é altamente especializada na penetração via tegumento do inseto. As etapas desta relação são de modo geral classificadas como fases de: adesão, germinação, formação de apressórios, formação de grampo de penetração, penetração, colonização e ainda, reprodução e disseminação do patógeno (ALVES, 1998).

Assim, os agentes de controle biológico tornam-se uma alternativa econômica e ecologicamente viável (VALADARES-INGLIS, 1998). Além da possibilidade da compatibilidade entre fungos entomopatogênicos e pesticidas que facilitariam os programas de manejo integrado de pragas (NEVES et al., 2001).

O isolamento de *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Aspergillus parasiticum* do corpo de rainhas de *Atta mexicana* no estado de Morelos no México depois do voo nupcial, constitui o primeiro registro de fungos entomopatogênicos nesta espécie (CARRIÓN et al., 1996). Em

condições naturais, linhagens de *Beauveria bassiana* já foram isoladas de rainhas e operárias do gênero *Atta* (ALVES; SOSA-GOMES, 1983; DIEHL-FLEIG et al., 1992).

Muitos fungos entomopatogênicos como *M. anisopliae* infectam a cutícula dos hospedeiros via liberação de conídios os quais aí aderem e germinam formando uma série de estruturas para a penetração (WANG; ST. LEGER, 2005). Esta espécie produz uma variedade de enzimas que degradam a cutícula do hospedeiro durante o processo de penetração, o processo de adesão conidial e formação de apressórios é de fundamental importância, uma vez que representa o primeiro evento da relação fungo-hospedeiro (ST. LEGER et al., 1991). Sendo de suma importância verificar qual o sitio de adesão mais freqüente para infecção (regiões específicas da cutícula), neste trabalho os três seguintes fungos foram testados.

Metarhizium anisopliae var. *anisopliae* é um fungo entomopatogênico obrigatório que é um generalista, infecta uma grande variedade de insetos, incluindo formigas cortadeiras (SCHMID-HEMPEL, 1998; JACCOUD et al., 1999) possui micélio branco, massa de conídios oblongos de cor verde acinzentada opaco, (CARRIÓN et al., 1996).

Beauveria bassiana apresentaram colônias de coloração branca com micélio hialino, centro levantado e de aspecto pulverulento ou cotonoso, conídios globosos com parede lisa. (CARRIÓN et al., 1996). O registro deste fungo entomopatogenico para *Atta* já foi relatado por diversos autores (KERMARREC et al., 1986; WILCKEN; BERTI-FILHO, 1994).

Aspergillus flavus têm sido também isoladas de operárias vivas (HUGHES; BOOMSMA, 2004). Rodrigues, (2004) cita presença deste fungo em operárias moribundas infectadas e no lixo de colônias mantidas em laboratório. Bass e Cherret (1994) estudando o papel das operárias na manutenção do jardim de fungo registram a presença de *A. flavus*. Caracterizado por micélio de cor branco esporulando verde amarelado e conídios esféricos, levemente rugosos, *A. parasiticus* pertence ao grupo *A. flavus* devido a similaridade (CARRIÓN et al., 1996).

Assim pretendemos com este trabalho fotodocumentar as fases iniciais de infecção dos três fungos (cedidos da coleção mantida pelo LESF – UNESP – Rio Claro, isolados de rainhas de *Atta*) em operárias forrageiras (retiradas de colônias mantidas no LISP – UNESP – Botucatu). Com objetivo de identificar as regiões de maior ocorrência na adesão e germinação no tegumento do inseto, cronologicamente dentre os tempos de 24, 48 e 72 horas, para diecionar futuras aplicações.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi o de mapear as diferentes regiões de adesão de conídios no corpo de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel 1908, (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) (Figura 1), localizando na topografia da cutícula, regiões de maior ocorrência de adesão e germinação, detectadas em diferentes tempos (24, 48 e 72 horas), ou seja, descrever onde e como ocorre o desenvolvimento dos conídios no tegumento pelos fungos *Beauveria bassiana* (LESF 477, CRM 1216), *Metarhizium anisoplae* (LESF 206, CRM 530) e *Aspergillus flavus* (LESF 218, CRM 407), fazendo uso da aplicação de técnicas de microscopia eletrônica de varredura. As operárias utilizadas nesse experimento foram obtidas de colônia estabelecida no Laboratório de Insetos Sociais Praga (LISP) localizado na Fazenda experimental Lageado da Faculdade de Ciências Agronômicas FCA-UNESP-Botucatu, SP, Brasil. A colônia foi mantida segundo metodologia proposta por Forti et al. (1994). Cada tratamento foi derivado da imersão de dez operárias em uma suspensão do fungo na concentração 10^6 conídios/mL, de forma individual com uso de pinça entomológica e um grupo controle imergido apenas em água, os quais geraram imagens padrão. Após inoculação em placas de Petri contendo agar + malte, mantidos em BOD por duas semanas, cada uma das placas eram abertas e adicionava-se 10 ml de água destilada + 0,001% tween, os conídios foram quantificados em câmara de Neubauer. Para obter as imagens foram testados os isolados de $1,2 \times 10^6$ conídios/ml (*M. anisopliae*), $3,7 \times 10^6$ (*A. flavus*) e $2,3 \times 10^6$ (*B. Bassiana*), onde cada formiga permaneceu imersa por três segundos em 10 mL de suspensão fúngica com tween. Para a observação do desenvolvimento do fungo sobre a cutícula, mantivemos as operárias em potes de acrílico com algodão umedecido, retiraram-se três formigas de cada tratamento nos diferentes tempos (24, 48 e 72 horas), oriundas de um teste de mortalidade o qual tem sua curva ilustrada (Gráfico 1), as formigas foram fixadas em paraformoldeído 4%, por 15 dias, em tampão de fosfato de potássio a 0,05M e pH 7,4 por 24 horas após exposição aos fungos nos três diferentes tempos, ou seja, três operárias para cada stub, montadas repetidamente contemplando três diferentes posições (dorso, lateral esquerda e lateral direita). Em seguida as amostras foram desidratadas em solução crescente (70%, 80%, 90% e 95%), de acetona e água por 30 minutos. As amostras foram secas em ponto crítico, com dióxido de carbono e a metalização em ouro foi realizada por quatro minutos em sputtering BAL-TEC modelo SCD 050. O material foi na sequência levado ao microscópio eletrônico de varredura Hitachi 3000 para observações e fotodocumentação. Os dados do teste de sobrevivência foram estatisticamente analisado (*Log-Ranktest*).

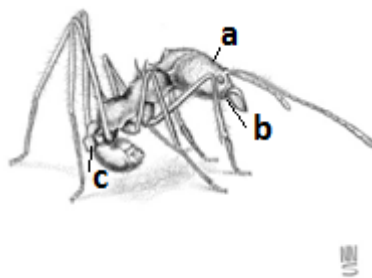


Figura 1. Formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa*: **a**-bulbo antenal, **b**-clípeo, **c**-gaster.

1.3 RESULTADOS

Os dados mostraram os primeiros dados ultramorfológicos mapeando quais são as regiões do corpo de formigas operárias forrageiras *Atta sexdens rubropilosa* onde cada um dos fungos aqui utilizados atuam nos processos de germinação e penetração no corpo do inseto em diferentes tempos, além do que os mesmos infectam preferencialmente distintas regiões do corpo. Nesse sentido o que ficou evidenciado é que os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* germinam no tempo próximo de 48h, o fungo *A. flavus* próximo de 72h. Além disso, estes fungos têm preferência para adesão nas regiões do clípeo e mandíbula para *B. bassiana*, gáster para *M. anisopliae* e fossa antenal para *A. flavus* (Figura 2).

Especificamente para o fungo *B. Bassiana*, após 24 horas da aplicação da suspensão fúngica, observou-se uma grande deposição de conídios localizada predominantemente na região dorsal do inseto, sendo a região da junção clípeo/mandíbula, aquela onde esteve presente a maior quantidade de conídeos aderidos (Figura 2A). Importante ressaltar que neste mesmo período de 24 horas, apesar de se ter observado muitos conídios aderidos, não foi possível detectar qualquer um deles em processo de germinação.

Este mesmo fungo, para o período de 48 horas após a aplicação, comportou-se de forma semelhante ao período anterior, confirmando-se a localização dos conídios predominando na região dorsal e com maior acúmulo na região de junção clípeo/mandíbula, por outro lado, foram observados conídios em processo de germinação (Figura 2B).

Para o período de 72 horas as observações são que alguns conídios aderem na base da sensila e já projetam o tubo germinativo na superfície do integumento (Figura 2C).

Para o fungo *M. anisople* pode-se afirmar que os conídios tiveram adesão em toda extensão dorsal dos três segmentos do corpo do inseto, cabeça, tórax e gáster, porém, cumpre o ciclo majoritariamente neste ultimo.

Ainda no período de 24 horas observou-se um aglomerado de conídios predominando na região do gáster, especificamente entre a sutura do tergito e do esternito e as sensilas daquela região, enfatizando a sua proximidade com as sensilas, porém não sendo ainda possível a observação de sinais de ocorrência de germinação. (Figura 2D).

No período de 48h houve predominância de localização de conídios em processo de germinação também na região dorsal do gaster, especificamente aquela mais próxima da inserção com o pós-pecíolo.

No período de 72h observou-se que o processo de infecção já havia atingido a fase mais avançada, inclusive com a presença de tubo germinativo envolvendo sensilas, houve um predomínio destes na região dorsal do gáster, próxima a sutura das placas terciais (Figura 2E e F).

Para o fungo *A. flavus*, no presente estudo os resultados mostraram a ocorrência de um acúmulo de conídios também predominando na região dorsal, sendo que a adesão destes concentrou-se na cavidade que abriga antena/bulbo antenal (Figura.2G,H e I).

Nos períodos de 24 e 48 horas após a exposição, não foram observados sinais de germinação neste sítio específico (Figura 2G e H) e sim apenas a presença de conídios esféricos com irregularidades, aderidos ao tegumento.

No período de 72 horas foram encontrados conídios aderidos na região da cavidade da antena/bulbo antenal, principalmente no torulus onde se visualiza um princípio de tubo germinativo (Figura 2I). Sendo que *A. flavus* apresentou curva de mortalidade menos acentuada (Gráfico 1).

A análise estatística (*Log-Ranktest*) mostra diferença não significativa apenas para curva de mortalidade de *M. anisopliae* quando comparado a de *B. bassiana* (Tabela 1).

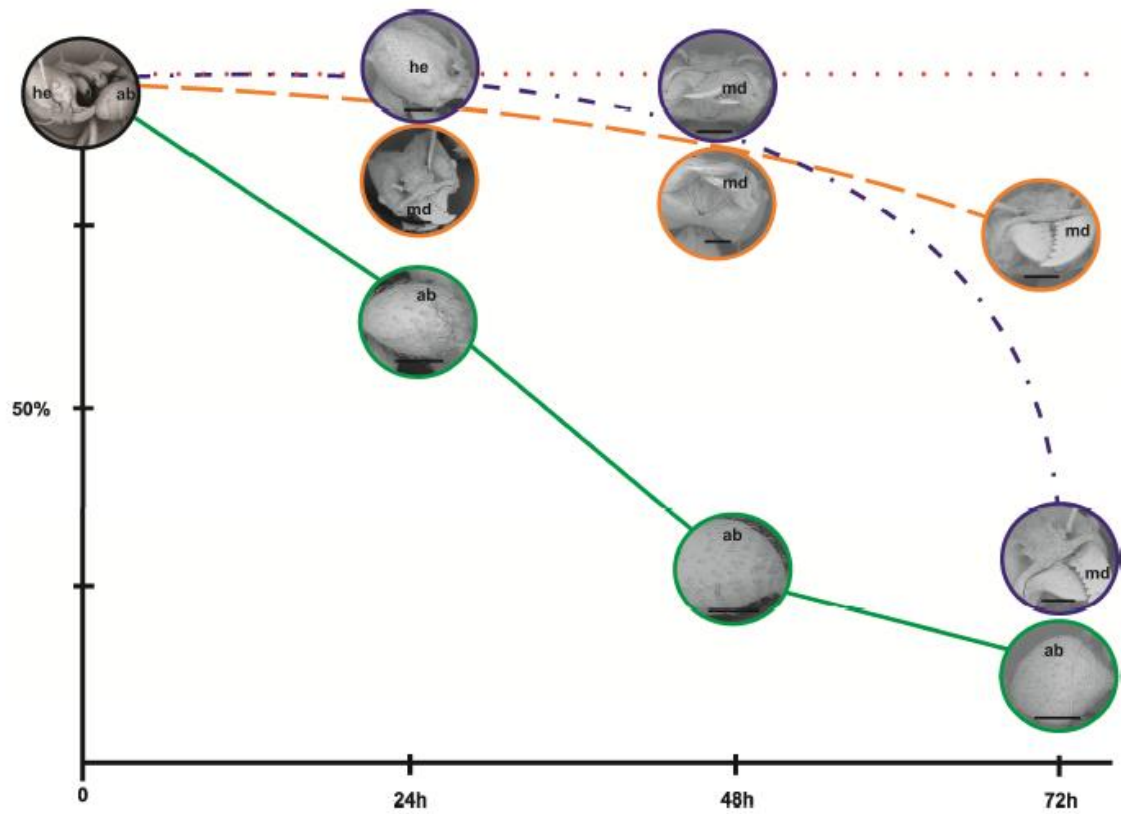


Gráfico 1. Curva de mortalidade em 72 horas: *B. bassiana* (Azul) *M. anisopliae* (Verde) *A. flavus* (Laranja) e controle (Vermelho) **ab**: abdômen, **md**: mandíbula e **he**: cabeça (TRAVAGLINI et al., 2016).

Tabela 1. Análise de sobrevivência, *Log-Ranktest*.

Tratamento	Esperado	Variância	Qui-Quadrado	(p) =
<i>B. bassiana</i> x controle	11,6036	7,9301	181,1007	< 0,0001
<i>M. anisopliae</i> x controle	15,4616	11,3374	108,2865	< 0,0001
<i>A. flavus</i> x controle	28,0139	17,4819	26,4075	< 0,0001
Controle x tween	66,1552	18,9173	12,9556	0,0003
<i>A. flavus</i> x <i>M. anisopliae</i>	76,4045	16,0668	41,7659	< 0,0001
<i>M. anisopliae</i> x <i>B. bassiana</i>	56,0997	17,5181	1,7899	(ns) 0,1809

H0: não há diferença no tempo de sobrevivência dos indivíduos submetidos aos tratamentos A e B: $p_1 = p_2$; H1: há diferença no tempo de sobrevivência dos indivíduos submetidos aos tratamentos A e B: $p_1 \neq p_2$; Nível de decisão: $\alpha = 0.05$. Resultados (tabela), observado 50, Graus de liberdade =1

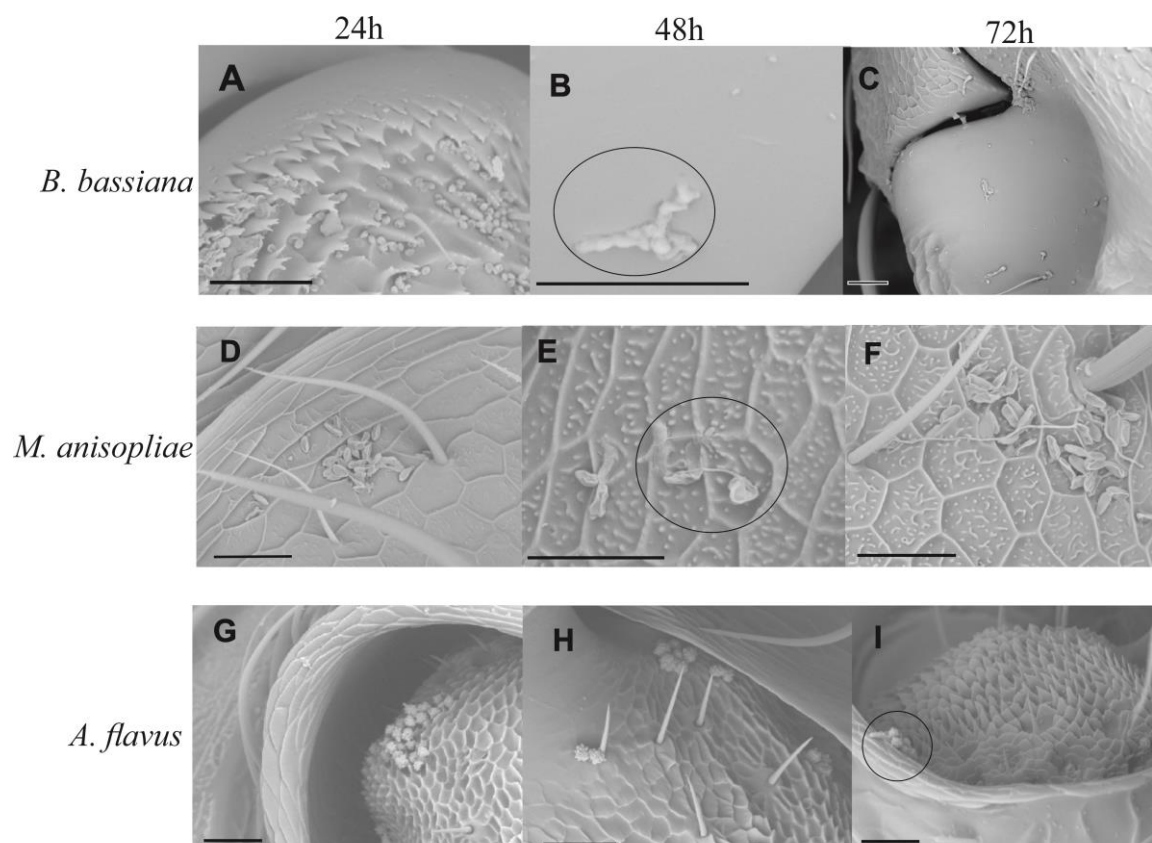


Figura 2. Regiões do corpo de operárias de *A. sexdens rubropilosa*, contendo *B. bassiana* (A-C), *M. anisopliae* (D-F) e *A. flavus* (G-I) fungos, nas fases de: adesão, germinação e penetração em relação aos períodos de exposição de: 24, 48, 72 horas. **A:** conídio aderido no tegumento, **D e G:** aglomerado de conídios, **I:** conídios germinando na fossa antenal. **Barra de escala:** 20 μ m.

1.4 DISCUSSÃO

A interação conídio-cutícula envolve um complexo específico através da ação de glicoproteínas, enzimas extracelulares e da ação de forças eletrostáticas e hidrofóbicas. (FARGUES, 1984, CASSIANO et al., 2008). A penetração no tegumento do inseto alvo, seguida da colonização, infecção generalizada e posterior morte do inseto, geralmente ocorre num período que varia entre três a 10 dias após o contato. (WANG; ST. LEGER, 2005, MELO et al, 2007). Este processo, no entanto, é dependente de fatores limitantes como componentes nutricionais da cutícula, reações químicas e ação de micotoxinas (CHANDLER et al., 2000), relacionando-se também com a virulência dos fungos e a susceptibilidade do inseto hospedeiro (PEKRUL;GRULA, 1979; FARGUES, 1984).

O sitio de adesão como as membranas intersegmentais na cutícula do inseto, podem influenciar o processo de penetração dos fungos (NAVON; ASCHER, 2000). As cavidades bucais e anais também podem ser locais preferenciais para o início da doença (WRAIGHT et

al., 1990). Bittencourt et al. (1999) verificaram através de três metodologias distintas que a possível forma de penetração deste fungo é pelo tegumento.

Neste trabalho comprovou-se que o local de adesão do conídio também é um fator determinante para que o processo de infecção ocorra, pois ao longo de 72h de exposição aos diferentes fungos foi detectado que o processo de germinação foi diferenciado de acordo com o sítio de adesão dos conídios, sendo que *Beauveria bassiana* germinou mais frequentemente no clipeo/mandíbula, *M. anisopliae* no gaster e *A. flavus* encontrado em três momentos no bulbo antenal.

Trabalhos citam atividade de infecção semelhantes entre *beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, que corrobora com (LOUREIRO; MONTEIRO, 2004) em *Atta sexdens sexdens*. Moino et al. (2002), registraram no hospedeiro conídios de *B. bassiana* e *M. anisopliae* aderidos e germinando em 24 horas por imagens de MEV, evidenciando semelhança no processo de colonização do hospedeiro por estes dois fungos. Em observações microscópicas evidencia-se o fungo *M. anisopliae* invadindo seu hospedeiro por penetração direta da cutícula, sendo que a adesão e germinação dos conídios na superfície das cutículas se iniciaram após 24 h ocorrendo à penetração em massa do fungo 72 h após a infecção (ARRUDA et al., 2005).

A. flavus já foi relatado como patogênico para as formigas *Acromyrmex* relacionando o aumento da mortalidade de formigas tratadas com doses crescentes de esporos de *A. flavus*, (SCHMID-HEMPEL, 1998). Porém, o gênero *Aspergillus* é comumente encontrado em solos tropicais atuando principalmente como decompositores, sendo assim, *Aspergillus flavus* é considerado um patógeno facultativo de muitas plantas e animais (BOUCIAS; PENDLAND, 1998), justificando a ação retardada deste fungo em relação aos outros, atuando provavelmente depois do indivíduo estar debilitado, do contrario o sistema imunológico do inseto agiria sobre a infecção.

Nas formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* encontra-se em seu tegumento uma topografia com muitas irregularidades e saliências, que tornam-se importantes sítios de adesão, das quais podemos citar neste trabalho mandíbulas, antenas e gaster.

O clipeo que margeia toda cavidade bucal da formiga, tendo a função de agregar as peças bucais, por exemplo, onde esta inserida a mandíbula. A região é bastante irregular, com sulcos e orifícios e cavidades, devido a sua complexa movimentação mecânica (CHAPMAN,

1998; TRIPLEHORN, JOHNSON, 2005). O fator adicional que favorece o acúmulo de conídios nesta região está atrelado ao comportamento de limpeza, este sugere que após usar as antenas para a higienização do corpo, os indivíduos, acumulam o excesso de conídios na cavidade infrabucal (WILSON, 1971; BARBIERI et al., 2007; GALVANHO et al., 2012), aumentando ainda mais a exposição desta região ao patógeno, no caso *Beauveria bassiana*.

Gáster, o segmento da extremidade do corpo, onde se aloja o aparelho excretor é dotado de glândulas e espiráculos, além da abertura anal. É constituído por um conjunto de placas segmentadas. A sua morfologia externa globosa, compreende-se de uma textura irregular e presença de sensilas neste gênero (*Atta*) (BOLTON, 2003), as quais se concentram na região terminal deste segmento, próximo as suturas, onde é registrada adesão de conídios de *Metarhizium*.

Antenas são órgãos sensoriais de extrema importância na comunicação e localização do substrato, citado como aparelho de higienização e remoção de organismos do corpo do inseto e da colônia (BELL, 1991, HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Na sua totalidade geniculada, possui na base um bulbo alojado em uma cavidade, a fossa antenal (CASSILL; TSCHINKEL 1999; EHMER; GRONENBERG 1997a, 1997b), de difícil acesso onde o acúmulo de conídios fica evidenciado nos registros para *Aspergillus*.

Considerando os diferentes tempos, cada um dos fungos aqui utilizados atua nos processos de germinação e penetração no corpo do inseto de maneira distinta, além do que os mesmos infectam preferencialmente diferentes regiões do corpo do inseto. Nesse sentido o que ficou evidenciado é que os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* fazem isso no tempo próximo de 48h e o fungo *A. flavus* próximo de 72h. Além disso, nas primeiras 24 horas só se encontra conídios sem germinar. Nas 48 horas encontram-se conídios germinando, ou seja, os não removidos que seguem aderidos (Figura 2B e E).

Como a maioria dos insetos sociais, as formigas possuem adaptações comportamentais que facilitam sua sobrevivência e dificultam seu controle por agentes microbianos (CURRIE, 2001; LACERDA, 2004, 2009). Nas formigas cortadeiras, pertencentes à tribo Attini, o grooming é um comportamento observado com frequência. Durante a autolimpeza (self-grooming) e a limpeza coletiva (allogrooming) elas se limpam e limpam umas as outras usando suas peças bucais e pernas anteriores. As partículas coletadas durante a limpeza, inclusive esporos de fungos e bactérias, são compactados em pellets na cavidade infrabucal sendo então carregados para a câmara de lixo da colônia. (EISNER; HAAP, 1962). Oi e

Pereira (1993), demonstraram que o comportamento de limpeza pode atuar na prevenção da contaminação dos indivíduos, entretanto, o contato durante este ato, também pode acarretar na contaminação de outros membros da colônia.

1.5 CONCLUSÃO

Os fungos entomopatogenicos propriamente ditos como *B. bassiana* e *M. anisopliae* apresentam uma maior taxa de mortalidade num menor intervalo de tempo quando comparado com *A. flavus*, tido como um fungo facultativo (oportunista).

Nos testes de mortalidade em condições laboratoriais, sem a possibilidade de interação com a colônia, tais fungos são capazes de controlar as populações de formigas expostas a suspensão de 10^6 conídios/ml.

Na tabela abaixo uma síntese do que foi verificado em relação aos fungos utilizados, relacionados com o desenvolvimento destes no integumento das operárias (Tabela 2).

Tabela 2. Regiões do corpo de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* onde foram observadas a presença de fungos das espécies *B.bassiana* e *M. anisopliae* e *A. flavus*, bem como a determinação das fases (adesão, germinação e penetração) em relação aos tempos de exposição (24, 48, 72 horas) no inseto.

Fungo/Tempo	24 horas	48 horas	72 horas
<i>Beauveria bassiana</i> (Mandíbula/Clípeo)	Conídios aderidos	Conídios germinando e hifas penetrando na mandíbula	Conídios germinando e hifas penetrando na mandíbula
<i>Metarhizium anisopliae</i> (Gáster)	Conídios aderidos	Conídios germinando	Conídios germinando/ penetrando
<i>Aspergillus flavus</i> (Fossa Antenal)	Conídios aderidos	Conídios aderidos	Conídios germinando

REFERENCIAS

- ALVES, S. B.; SOSA GÓMES, D. R. Virulência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill. para duas castas de *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908). **Poliagro** 5: 1-9. 1983.
- ALVES, S.B. (ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163p.
- ARRUDA W., LÜBECK I., SCHRANK A.; VAINSTEIN M.H. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. **Exp Appl Acarol**, 37, 231-244. DOI 10.1007/s10493-005-3818-6. 2005.
- BARBIERI, R. F.; FORTI, L. C.; FUJIHARA, R. T.; CARLOS, A. A. Fluxo de corante e inseticida entre operárias de formigas cortadeiras - **Biológico**, v.69, p.375, São Paulo, 2007.
- BASS M; J.M. CHERRETT The role of leaf-cutting ant workers (Hymenoptera: Formicidae) in fungus garden maintenance **Ecol. Entomol.**, 19, pp. 215–220. 1994.
- BELL W. J. **Searching Behaviour: The Behavioural Ecology of Finding Resources**. London: Chapman & Hall. 1991.
- BENTO, J. M. S.; DELLA LUCIA, T. M. C.; MUCHOVEJ, R. M. C.; VILELA. E. F. Influência da composição química e da população microbiana de diferentes horizontes do solo no estabelecimento de saúveiros iniciais de *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae) em laboratório. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina-PR, v. 20, p. 307-317, 1991.
- BITTENCOURT, V.R.E.P., MASCARENHAS, A.G.; FACCINI, J.L.H. Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. **Ciência Rural**, v. 29, n. 2, p. 351-354, 1999.
- BOARETTO, M.A.C.; FORTI, L.C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. **Série Técnica**, IPEF 11(30): 31-46. 1997.
- BOLTON, B. **Synopsis and Classification of Formicidae**. 370 pp. Memoirs of the American Entomological Institute, Vol. 71. Gainesville, FL. 2003
- BOUCIAS D.G.; PENDLAND, J.C. “Entomopathogenic fungi: fungi imperfecti” In **Principles of insect pathology** . Springer US. pp. 321-364. 1998.
- CARRION, G.; L. QUIROZ; J. VALENZUELA: Hongos entomopatógenos de la hormiga arriera *Atta mexicana* en México. **Revista Mexicana de Micología** 12: 41-48, 1996.
- CASSIANO JA, DESTEFANO RHR, BARACHO MS, NAAS IA, SALGADO DD. Análise de adesão do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* para o controle de *Alphitobius diaperinus* (cascudinho) em instalações avícolas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. 45:348-353. 2008.
- CASSILL D. L., TSCHINKEL W. R. Task selection by workers of the fire ant *Solenopsis invicta*. **Behav. Ecol. Sociobiol.** 45 301 - 310. 1999.

CHANDLER, D.; DAVIDSON, G.; PELL, J. K.; BALL, B. V.; SHAW, K.; SUNDERLAND, K. D. Fungal biocontrol of acari. **Biocontrol Science Technology**, v. 10, n. 3, p. 357384, 2000.

CHAPMAN R.F. 1998. **The Insects: Structure and Function**. Fourth Edition. Cambridge University Press.

CHERRETT, J. M. Some factors involved in the selection of vegetable substrate by *Atta cephalotes* (L.) (Hymenoptera: Formicidae), in tropical rain forest. **Journal of Animal Ecology**, 41: 647-660. 1972.

CURRIE CR, STUART AE. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. **Proc Biol Sci** 2001; 268:1033-9; PMID:11375087; <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2001.1605>.

DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **As formigas cortadeiras**. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 1993. p.01-03.

DIEHL-FLEIG, E.; M.E. DE P. LUCCHESI. Reações comportamentais de operárias de *Acromyrmex striatus* (Hymenoptera, Formicidae) na presença de fungos entomopatogênicos. **Rev. Bras. Entomol.** 35: 101-107. 1991.

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. **Ciência e Cultura**, v.40, n.11,p. 1103-1105, 1988.

DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M.E.; SPECHT, A.; VALIM-LABRES, M.E. Efficiency of *Beauveria bassiana* for *Acromyrmex* spp. control (Hymenoptera: Formicidae). **Anais Soc Entomol Brasil** 22:281-285. 1993.

DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M. E.; VALIM-LABRES, M. E.; SPECHT, A. Ocorrência natural de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. no Rio Grande do Sul. **Acta Biologica Leopoldensia** 14: 99-104. 1992.

EHMER B., GRONENBERG W. Proprioceptors and fast antennal reflexes in the ant *Odontomachus* (Formicidae, Ponerinae). *Cell Tissue Research* 290, 153-165. 1997a. (doi:10.1007/s004410050917).

EHMER B., GRONENBERG W. Antennal muscles and fast antennal movements in ants. **J. Comp. Physiol. B** 167 287 - 296. (doi: 10.1007/s003600050076). 1997b.

EISNER, T.; HAAP, G.M. The infrabuccal pocket of a formicine ant: a social filtration device. **Psyche**, v.69, n.3, p.107116, 1962.

FARGUES, J. Adhesion of the fungal spore to the insect cuticle in relation to pathogenicity. In: ROBERTS, D.W.; AIST, J.R. (Ed.) **Infection processes of fungi; conference report**. New York: The Rockefeller Foundation, 1984. p.90-110.

FORTI, L.C.; PRETTO, D.R.; GARCIA, I.P. Aprimoramento de metodologias experimentais para controle de formigas cortadeiras. **Anais do III Curso de Atualização no Controle de Formigas Cortadeiras**, PCMIP/IPEF: 14-23. 1994.

GALVANHO, J.P.; CARRERA, M.P.; MOREIRA, D.D.O.; ERTHAL, M. JR.; SILVA, C.P.; SAMUELS, R.I.; Imidacloprid Inhibits Behavioral Defenses of the Leaf-Cutting Ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera:Formicidae). **J Insect Behav.** In press; <http://dx.doi.org/10.1007/s10905-012-9328-6>. 25. 2012.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON E.O. **The Ants**. Cambridge, MA: Harvard University Press. 1990. 733p.

HUGHES, W.O.H.; BOOMSMA, J.J. Let your enemy do the work: within-host interactions between two fungal parasites of leaf-cutting ants. **Proc R Soc Lond B (Suppl.)** 271(S3): S104-S106. 2004.

JACCOUD, D. J.; HUGHES, W. O. H.; JACKSON, C. W. The epizootiology of a *Metarhizium* infection in mini-nests of the leafcutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Entomol. Exp. Appl.** 93, 51–61. 1999.

JACCOUD, D.B. **Formigas cortadeiras: princípios de manejo integrado de áreas infestadas**. Brasília: IBAMA, 2000. 60p. (Série Meio Ambiente em debate, 34).

KERMARREC, A.; FEBUAY, G.; DE CHARME, M. Protection of leaf-cutting ants from biohazards: is there future for microbiological control? In: LOFGREN, C.S.; VANDER MEER, R.K. **Fire ants and leaf-cutting ants - biology e management**. Westview Press, 1986, p. 339-56.

LACERDA, F. G. **Manuseio do lixo de colônias de *Atta sexdens rubropilosa* e suas implicações no comportamento e na mortalidade das operárias**. Dissertação (Mestrado em Ciências - Área de Biologia) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2004.

LACERDA, F. G. Mecanismos de defesa em insetos sociais contra patógenos. **Revista Educação Meio Ambiente e Saúde**, v. 4, p. 31-50, 2009.

LOUREIRO, E. de S.; MONTEIRO, A. C. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium Anisoplia* e *Paecilomyces Farinosus*, patogênicos para operárias de *Atta Sexdens Sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.71, n.1, p.35-40, 2004.

MELO, DENISE R. DE; CRUZ, GERALDO B. DA; REIS, ROSANA C.S. E BITTENCOURT, VÂNIA R.E.P. Desenvolvimento dos fungos *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 E *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 sobre *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835). **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** [online]. vol. 16, no. 3. 2007.

MOINO, A; ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; OLIVEIRA, P.M.; NEVES, J. External development of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in the subterranean termite *Heterotemes tenuis*. **Sci Agric** 59: 267–273. 2002.

NAVON, A.; ASCHER, K.R.S. **Bioassays of entomopathogenic microbe and nematodes** (Ed.) Cabi Publishing. Boston, 2000, 324 p.

NEVES P.M.O.J.; HIROSE E.; TCHUJO P.T.; MOINO A. JR. Compatibility of entomopathogenic fungi with neonicotinoid insecticides. *Neotrop. Entomol.* 30: 263–268. 2001.

OI, D.H.; PEREIRA, R.M. Ant behavior and microbial pathogens (Hymenoptera: Formicidae). **The Florida Entomologist**, v.76, n.1, p.63-74, 1993.

PEKRUL, S.; GRULA, E.A. Mode of infection of the corn earworm (*Heliothis zea*) by *Beauveria bassiana* as revealed by scanning electron microscopy. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.34, p.238-247, 1979.

RODRIGUES, A. **Ocorrência de fungos filamentosos em ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) submetidos a tratamentos com iscas tóxicas.** Rio Claro Brazil: Universidade Estadual Paulista. 84 p. 2004.

SAMUELS, R. I.; MATTOSO, T. C.; MOREIRA, D. D. Chemical warfare: Leaf-cutting ants defend themselves and their gardens against parasite attack by deploying antibiotic secreting bacteria. **Communicative & integrative biology**, 6(2), e23095. 2013.

SCHMID-HEMPEL, P. **Parasites in social insects.** Princeton University Press. 1998.

SILVA, M.E.; DIEHL-FLEIG, E. Avaliação de diferentes linhagens de fungos entomopatogênicos para controle da formiga *Atta sexdens piriventris* (Santschi, 1919) (Hymenoptera: Formicidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.17, n.2, p.263-269, 1988.

ST. LEGER; R. J.; GOETTEL, M.; ROBERTS, D. W.; STAPLES, R. C. Penetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 58, n. 1, p. 168-170, 1991.

TRIPLEHORN, C.A.; JOHNSON N.F. Borror and DeLong's **Introduction to the Study of Insects.** Seventh Edition. Thomson Brooks/Cole. 2005.

VALADARES-INGLIS, M. C. C.; SHILER, W.; SOUZA, M. T. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico.** Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, v. 1, p. 201-230. 1998.

WANG, C; ST. LEGER, R. J. Developmental and transcriptional responses to host and nonhost cuticles by the specific locust pathogen *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 5, p. 937-947, 2005.

WILKEN, C.F.; BERTI FILHO, E. Controle biológico de formigas cortadeiras. **PCMIP/IPEF**: 1-5. 1994.

WILSON, E.O. **The insect societies.** Cambridge: Belknap Press, 1971.

WRAIGHT, S.P.; BUTT, T.M.; GALAINI-WRAIGHT, S.; ALLEE, L.L.; SOPER, R.S.; ROBERTS, D.W. "Germination and infection processes of the entomophthoralean fungus *Erynia radicans* on the potato leafhopper, *Empoasca fabae*" **J Invertebr Pathol**, v.56n.2.pp.157-174, 1990.

CAPÍTULO 2: O USO DE FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO NO CONTROLE BIOLÓGICO DE LARVAS E DE OPERÁRIAS DE FORMIGA CORTADEIRA: Descrição do controle biológico de larvas e adultos de *Atta sexdens rubropilosa*, Forel 1908 por *Beauveria bassiana* através de técnicas ultramorfológicas

Raphael Vacchi Travaglini^{1*}; Andre Arnosti²; Luiz Carlos Forti¹; Maria Izabel Camargo-Mathias²

1-FCA/UNESP-Botucatu, Dep. Proteção de Plantas

2-IB/UNESP-Rio Claro, Dep. Biologia

[*micm@rc.unesp.br](mailto:micm@rc.unesp.br)

RESUMO

Consideradas de hábito desfolhador, as formigas cortadeiras, herbívoro dominante nas Américas, atacam diversas culturas para a manutenção do fungo simbiote da colônia, visto este ser o seu principal recurso alimentar. Com o objetivo de se realizar o controle biológico desta formiga fazendo para tanto o uso do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*, larvas e operárias adultas de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 foram expostas, a uma suspensão do fungo na concentração de 10^6 /conídio. Os indivíduos adultos foram imersos nessa suspensão por 3 segundos e os imaturos (larvas) foram expostos topicamente com auxílio de micropipeta. Os indivíduos (em grupos de 10) foram acomodados em potes de acrílico contendo algodão umedecido para avaliação da mortalidade nos tempos de 24, 48 e 72 horas após exposição. A técnica de microscopia eletrônica de varredura foi aplicada para documentar como o fungo desenvolve, nos diferentes tempos, na superfície do tegumento dos insetos. Para o melhor entendimento da dinâmica de infecção do fungo no interior do inseto foi aplicada nos indivíduos amostrados a técnica histológica com coloração pela HE, para tanto o material foi fixado, desidratado, emblocado em resina Leica e na sequência foi seccionado com 3 μ m de espessura para observação e documentação em fotomicroscópio. Os resultados obtidos demonstraram que nos indivíduos imaturos a penetração do fungo *B. bassiana* no integumentos do inseto ocorre no tempo de 48h, sendo que nos adultos esse tempo passa a ser a partir de 72 horas, fato que pode ser explicado pela organização e esclerotização da cutícula, que no indivíduo adulto já se apresenta muito mais rígida do que

no imaturo, além do fato de no indivíduo adulto há a liberação para superfície do corpo, de secreções que são produzidas por diferentes glândulas exócrinas, inclusive pelas glândulas metapleurais, estas com função de sintetizar substâncias antimicrobianas, as quais provocariam a inibição da germinação do fungo. Já nos imaturos a cutícula é uma estrutura mais delgada, constituindo-se numa barreira física mais fácil de ser transposta pelo fungo, permitindo assim a sua penetração por meio de suas hifas logo após a exposição.

Palavras chave: Formiga cortadeira, imaturo, controle biológico, fungos entomopatogenicos

2.1 INTRODUÇÃO

As formigas cortadeiras do gênero *Atta*, popularmente conhecidas como saúvas, são consideradas pragas de importância agrícola devido aos prejuízos que podem causar na pecuária e na silvicultura devida a sua atividade de cortar partes da planta, principalmente as folhas (DELLA LUCIA; VILELA, 1993).

Apesar de estarem disponíveis na literatura várias estratégias e métodos de controle, aquele químico que faz uso de iscas granuladas é atualmente o mais amplamente utilizado (BRITTO et al., 2016). Este método embora prático e eficiente, traz consigo inconvenientes tais como a contaminação do meio ambiente e a liberação de agentes tóxicos que afetam diretamente os recursos humanos que fazem a aplicação do produto (LOUREIRO; MONTEIRO, 2005). Além disso, as certificadoras florestais têm limitado a exportação de produtos que tenham toxicidade comprovada, fatores que quando associados vem incentivar o desenvolvimento de pesquisas que tenham como objetivo encontrar métodos de controle de insetos pragas que sejam tanto eficientes quanto sustentáveis, como é o caso do controle biológico (ISENRING; NEUMEISTER, 2010; RIBEIRO et al., 2012).

A busca por alternativas eficientes, porém, sustentáveis para o controle de insetos praga tem sido uma constante, visto serem esses indivíduos causadores de enormes danos na agricultura em geral, trazendo como consequência prejuízos econômicos de significativa importância (MONTROYA-LERMA, et al., 2012; ZANETTI et al., 2014; DELLA LUCIA et al., 2014).

Dentro desta perspectiva alguns trabalhos já vem sendo desenvolvidos em laboratório e os resultados obtidos tem sido animadores mostrando, por exemplo, o potencial patogênico de fungos de algumas espécies (*Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*) que tem provocado morte quando aplicados em operárias e soldados de formigas das espécies *A. sexdens rubropilosa* e *A. bisphaerica* (ALVES; SOSA GOMES, 1983, CASTILHO et al., 2010, TRAVAGLINI et al., 2016)

Os testes que mostram a ação de microrganismos no combate as formigas cortadeiras tem resultado em respostas variadas dependendo tanto da casta do inseto como da forma de aplicação do produto (DIEHL-FLEIG et al., 1988). Segundo Alves (1998) a infecção dos insetos ocorre via integumento, incluindo as aberturas naturais, ressaltando ainda que os fungos entomopatogênicos infectam diferentes estágios de desenvolvimento dos insetos (ovos, larvas, pupas e adultos), característica desejável quando se pensa em controle. De

acordo com Arnosti et al. (2016) em estudos com *Diaphorina citri* e Travaglini et al. (2016) em estudos com formigas cortadeiras, o local da adesão do conídio do fungo no corpo do inseto influenciaria diretamente no sucesso da germinação do mesmo.

Outros estudos ainda utilizando fungos entomopatogênicos no controle biológico, mostraram que enzimas proteases, aminopeptidases, esterases e quitinases seriam produzidas em grande quantidade por *M. anisopliae* e *B. bassiana* (ST. LAGER et al., 1986). Essas enzimas causariam modificações na estrutura do integumento de gafanhotos, o que permitiria que as hifas conseguissem penetrar no corpo do inseto (BIDOCHKA; SMALL, 2005).

Um fator que seria dificultador da aplicação das estratégias de controle biológico em formigas fazendo-se uso de fungos entomopatogênicos, seria a liberação de secreções químicas sintetizadas por diversas glândulas exócrinas, as quais dentre outras funções teria aquela de produzir agentes antimicrobianos (POULSEN et al., 2002; VIEIRA et al. 2012). Além disso, no interior de colônias de formigas cortadeiras encontra-se o jardim de fungo que segundo informações de Pagnocca et al. (1996) para evitar a sua contaminação, as formigas adotariam o comportamento de lambem a superfície do substrato, o que consequentemente introduziria na cavidade infrabucal das mesmas, os microrganismos. Assim, diante destas informações e na tentativa de se buscar novas, eficientes e sustentáveis estratégias para controlar a proliferação de formigas cortadeiras, consideradas importantes pragas da agricultura, o presente estudo teve como objetivo demonstrar por meio do uso de técnicas histológicas quais seriam os locais do corpo de larvas (imaturos) e de operárias (adultos) de *A. sexdens rubropilosa* mais susceptíveis a penetração de hifas do fungo *B. bassiana*, bem como isso afetaria a organização estrutural e a morfofisiologia do integumento do inseto.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de larvas e de operárias de *A. sexdens rubropilosa*.

Larvas e operárias forrageiras de uma mesma colônia de *A. sexdens rubropilosa* foram utilizadas nesse trabalho, ambas as castas obtidas da criação estabelecida no Laboratório de Insetos Sociais Praga (LISP), localizado na Fazenda Experimental Lageado da Faculdade de Ciências Agrônomicas FCA- UNESP-Botucatu, SP, Brasil, latitude (22° 50' 48" S), longitude (48° 26' 06" W) e altitude (817,74 m), segundo metodologia proposta por Forti et al. (1994), mantidas em condições controladas (UR% 75 ±10, T°C 25±2).

Obtenção do isolado do fungo *Beauveria bassiana*:

O fungo *B. bassiana* foi isolado a partir de rainhas mortas e mantido no Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF), UNESP-Rio Claro, São Paulo, Brasil. Os mesmos foram multiplicados (após inoculação) em placas de Petri de 5cm de diâmetro contendo meio de cultura a base de agar e malte (2%) e as quais foram vedadas com papel filme PVC e mantidas em BOD (temperatura+₋25°C) durante 15 dias, tempo necessário para serem observados conídios sobre a superfície da mesmas. O repique do fungo foi realizado depois de 15 dias da inoculação.

Preparo da suspensão fúngica

Uma das placas de Petri contendo meio de cultura mais o fungo *B. bassiana* foi aberta em capela e a ela foram adicionados 10 mL de água destilada estéril mais o espalhante adesivo Tween 80® a 0,01%. Depois disso procedeu-se o ajuste da suspensão (contagem dos conídios), a qual ocorreu no interior de câmara de Neubauer sob microscópio de luz de campo claro, até obter-se a concentração de 10⁶ conídios/mL.

Bioensaio com as operárias (adultos)

Operárias forrageiras (classificadas segundo medição da cápsula cefálica) foram separadamente imersas na suspensão fúngica durante 03 segundos de acordo com protocolo descrito por Loureiro e Monteiro (2005), fazendo uso de pinça entomológica. Depois disso as mesmas foram acondicionadas em potes plásticos de 250ml contendo algodão umedecido em água. Para os bioensaios foram estabelecidos: um grupo controle onde os indivíduos não foram expostos ao fungo, ou seja, depois de coletados, foram imediatamente fixados para aplicação de técnicas histológicas e de MEV e um grupo tratamento onde as operárias foram expostas a suspensão fungica por 24, 48 e 72 horas, tempo suficiente para desenvolvimento destes fungos em condições controladas visando o início da infecção.

Bioensaios com Larvas

Larvas de *A. sexdens rubropilosa* foram expostas topicamente a suspensão fúngica. Para tanto, fez-se uso de uma micropipeta aplicando 1µL da suspensão de 10⁶conídios/mL conforme o protocolo descrito por Bromme et al. (1976). Após a exposição as mesmas foram coletadas e colocadas em placas de Petri estéreis e forradas com papel filtro umedecido, as quais foram mantidas a 25°C no ambiente do laboratório (LISP). A cada 24, 48 e 72 horas foram retirados 3 indivíduos os quais foram encaminhados para os procedimentos histológico e de MEV. Larvas controle também foram coletadas (sem contato prévio com o fungo). Estas como não foram expostas foram ao fungo foram imediatamente fixadas e encaminhadas para aplicação de técnicas histológicas e de MEV.

Histologia

No laboratório do “Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology” (BCSTM) IB-UNESP-Rio Claro, SP, Brazil, 09 larvas e 09 operárias foram coletadas vivas, anestesiadas por choque térmico em geladeira e fixadas inteiras em paraformoldeído (4%) por sete dias. Após a fixação realizou-se a desidratação (4 banhos de 15 minutos cada), em série crescente de etanol a 70%, 80%, 90% e 95%. Logo após, foram embebidas e incluídas em historesina Leica no interior de moldes plásticos. Os blocos contendo resina mais o material foram polimerizados e colocados em suportes de madeira para secção em micrótomo Leica (3µm de espessura). Posteriormente as secções foram recolhidas em lâminas de vidro e coradas pela hematoxilina e eosina (HE) (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983). As larvas e operárias expostas à suspensão também passaram pelo mesmo procedimento.

Microscopia Eletrônica de Varredura:

Para a aplicação desta técnica foram coletadas três operárias de cada um dos grupos tratamento e controle. Os espécimes inteiros foram fixados em paraformaldeído 4%, em tampão fosfato de potássio a 0,05M durante 15 dias pH 7,4 durante 24 horas. Na sequência as amostras foram desidratadas em solução crescente (70%, 80%, 90% e 95%) de acetona e água por 5 minutos cada banho e foram secas em ponto crítico. Após essa etapa, o material foi colado (com fita dupla face) em stubs de alumínio em três diferentes posições (dorsal, lateral esquerda e lateral direita) e metalizadas por quatro minutos com ouro em sputtering BAL-TEC modelo SCD 050. Depois disso o material foi levado ao microscópio eletrônico de

varredura Hitachi TM 3000 para observação e fotodocumentação no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da UNESP-Rio Claro, SP, Brasil.

2.3 RESULTADOS

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram a dinâmica de adesão, de germinação e de penetração do fungo *B. bassiana* no integumento de diferentes estágios de desenvolvimento (larvas e operárias adultas) de formigas *A. sexdens rubropilosa*, as quais foram expostas à suspensão fúngica 10^6 /conídios (água destilada e Tween 0,001%) para serem analisadas tanto sob microscopia eletrônica de varredura quanto sob microscopia de luz de campo claro fazendo, no caso desta última, o uso de técnicas de histologia. Para um melhor acompanhamento dessa dinâmica, as exposições dos insetos ao fungo ocorreram nos intervalos de 24, 48 e 72 horas. Assim, nestes três diferentes tempos de pós-exposição às suspensões, foram obtidos os seguintes resultados:

Após 24 horas:

A microscopia eletrônica de varredura mostrou que o integumentotanto das larvas (Figura 1B), quanto das operárias (Figura 2), teve os conídios aderidos a sua superfície, preferencialmente com localização na região próxima a boca (região oral), local este que apresenta uma cutícula esculturada e cujos sulcos e saliências, além da própria junção das peças bucais (mandíbula/ clipeo) articuladas, permitem que os conídios se agrupem e aí se fixem. Cabe ressaltar que também a presença de sensilas muito provavelmente favoreceu a adesão destas estruturas, principalmente na base das mesmas, uma vez que as imagens associadas a esta estrutura continham conídios germinando.

Neste tempo de pós-exposição, muito embora tenha havido essa preferência de local para adesão dos conídios (região oral) os mesmos também puderam ser observados por toda a extensão do corpo das larvas e das operárias, no entanto, foram observados apenas poucos (um ou dois) conídios que além de aderidos estavam entrando em processo de germinação nesta última.

Quando foram realizadas as análises histológicas, esses resultados foram confirmados, ou seja, observou-se que os conídios de fato estavam externamente aderidos na cutícula. Quanto às larvas especificamente foi observado em determinadas regiões do corpo destas a presença de agrupamentos de conídios aderidos e dentre estes, alguns já se encontravam em

estágio inicial de germinação (Figura 1E), diferentemente do que ocorreu na operária onde apenas adesão foi observada (Figura 2E).

Após 48 horas:

Após 48 horas da exposição as micrografias (MEV) revelaram que nas larvas os conídios mantiveram-se aderidos em grupos nas várias regiões do integumento e ao longo de toda extensão do corpo, porém, nesse tempo observou-se que muitos deles já estavam germinando, o que foi também confirmado pela observação do tubo germinativo, estrutura do fungo que dará início à formação das hifas (Figura 1C). Histologicamente foi possível observar que o integumento da larva foi transposto por meio da penetração das hifas (Figura 1F).

Nas operárias, assim como observado no tempo de 24 horas, os conídios continuaram localizados preferencialmente na região oral e próximos a base das sensilas tricóides, porém, diferentemente do observado nas larvas, apenas alguns conídios emitiram tubos germinativos (Figura 2F).

Além disso, foi possível observar nas secções histológicas que, principalmente na região do tórax ocorreu a deposição de conídios nas reentrâncias do integumento, ou seja, locais em que este se dobra para abrigar, por exemplo, aberturas de glândulas exócrinas, cujo resultado confirma-se neste período quanto à maior susceptibilidade da larva (Figura 3).

Após 72 horas:

No tempo de 72 horas após a exposição à suspensão, foi observado nas larvas que a superfície do integumento já se encontrava totalmente recoberta pelas hifas (MEV) (Figura 1D), indicando que este ambiente foi totalmente favorável ao desenvolvimento do fungo, ou seja, propício a infecção. Histologicamente ficou comprovado que as hifas do fungo entomopatogênico, além de colonizar a superfície do integumento, conseguiram ultrapassar a barreira da cutícula da larva, chegando até o interior do corpo (Figura 1F).

Nas operárias, foi observado por meio das fotos de MEV que os conídios encontraram-se aderidos (alguns sem germinar e outros germinados) à superfície do integumento das mesmas (Figura 2D).

Para melhor entendimento e comparação dos resultados obtidos os mesmos foram resumidos na Tabela 1.

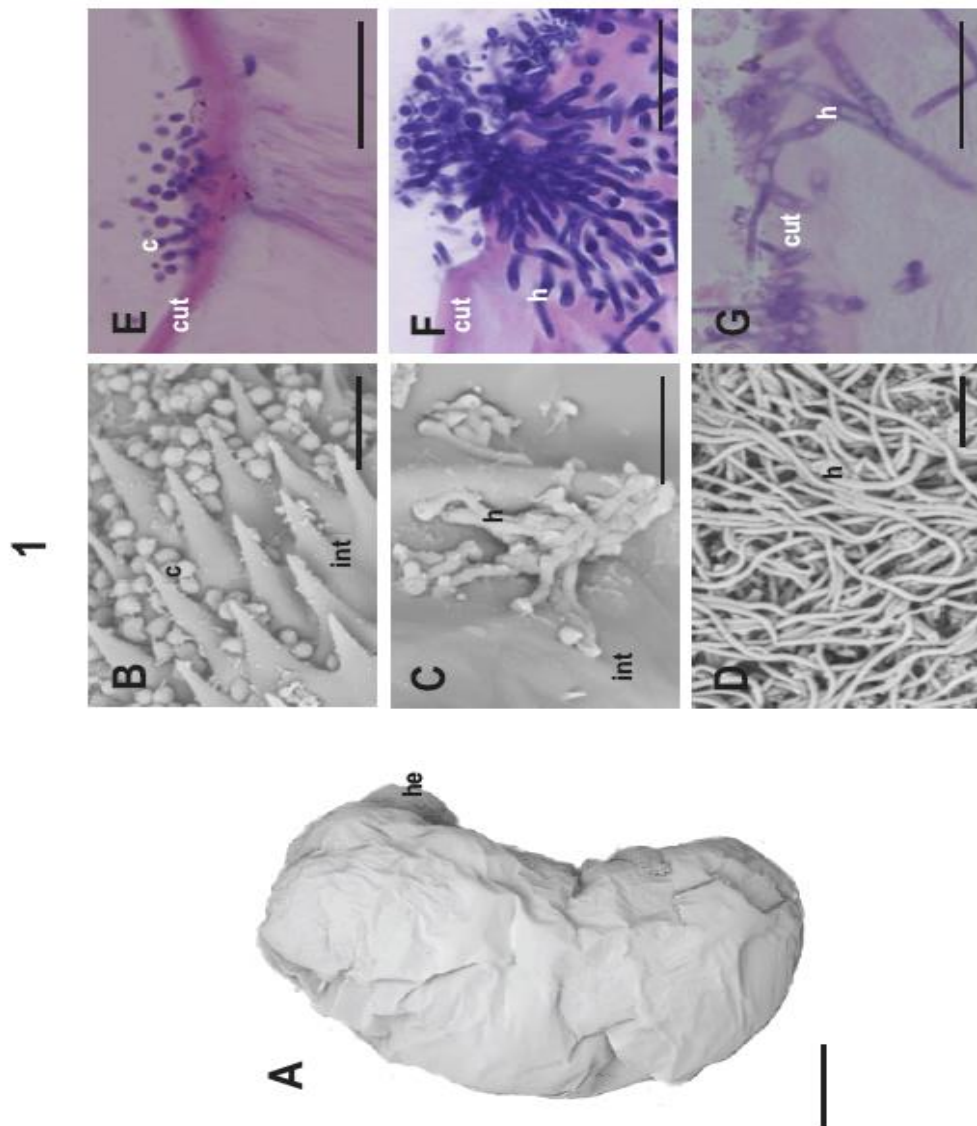


Figura 1. Padrão de infecção do tegumento de larvas de *Atta sexdens rubropilosa* capturado por MEV e HE, A: visão geral, B: adesão de *B. bassiana* na região oral (24h), C: germinação de *B. bassiana* no integumento (48h) e D: hifas de *B. bassiana* recobrando o tegumento da larva (72h), E: conídios aderidos iniciando a germinação (24h), F: hifas penetrando o integumento (48h) e G: hifas desenvolvendo (72h). **c**: conídio, **h**: hifa e **int**: tegumento, Barra de escala larva 0,5mm, MEV (B, C e D) e HE (E,F e G) 20µm.

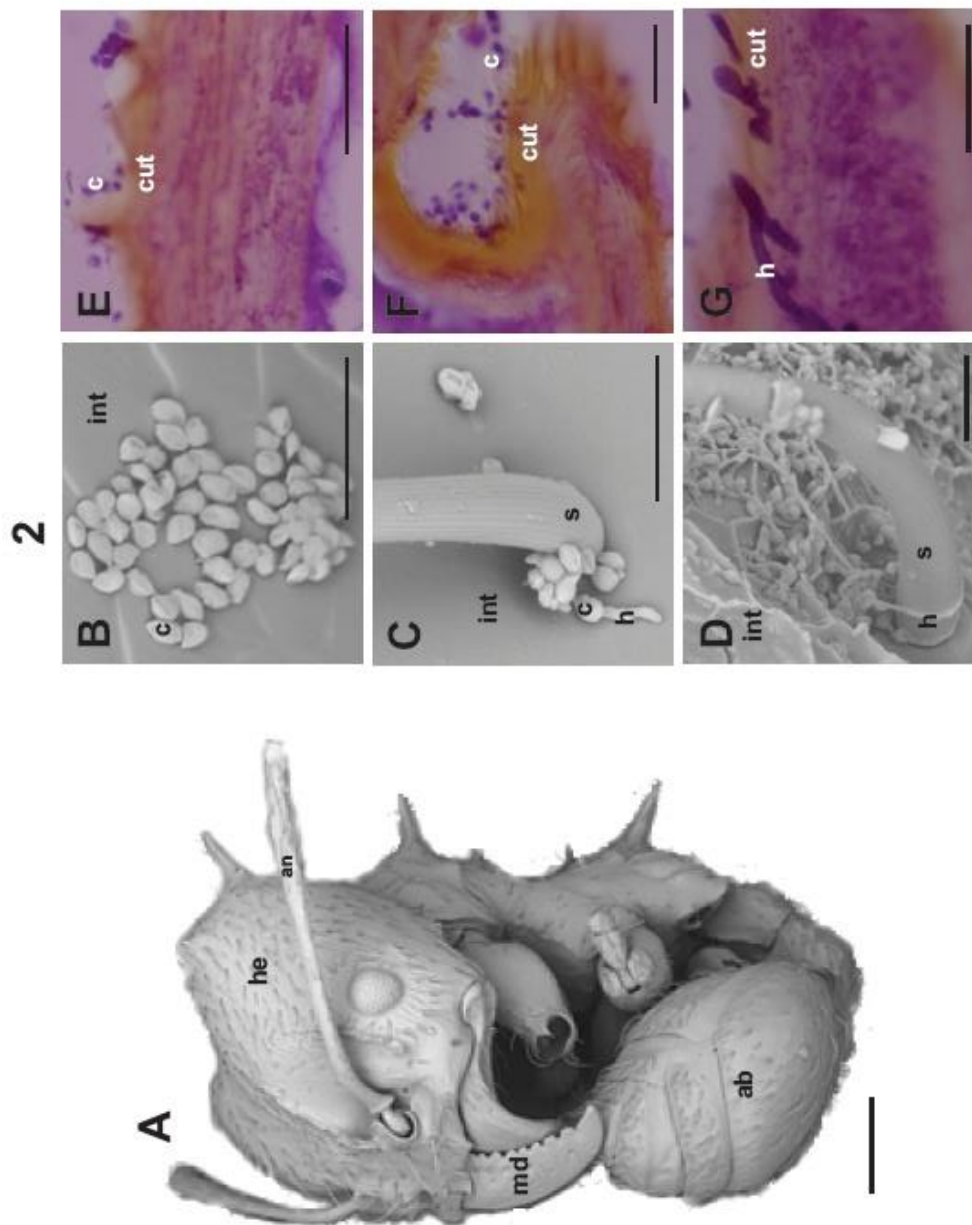


Figura 2. Padrão de infecção do integumento de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* capturado por MEV e HE, A: visão geral da operária, B: conídio de *B. bassiana* aderido no integumento (24h), C: conídio germinando no integumento (48h), D: conídio desenvolvendo na região do nó (72h). E e F: conídios aderidos nas irregularidades do integumento (24h e 48h) e G: conídios penetrando no integumento (72h). **c**: conídio, **h**: hifa e **int**: integumento. Barra de escala Operária 0,5mm e MEV (B, C e D) e HE (F, G e H) 20µm.

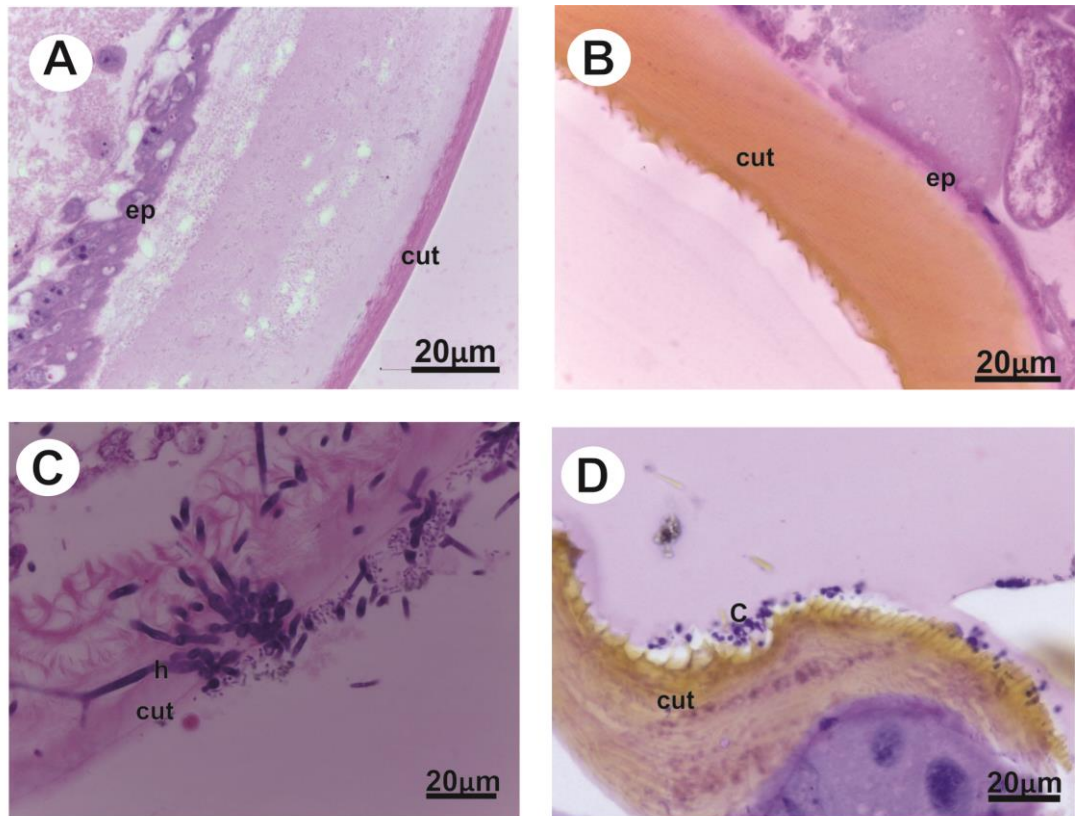


Figura 3. Padrão do tegumento de larvas (A) e das operárias adultas (B) comparando em 48 horas a germinação e penetração por *B. bassiana* na larva (C) em relação apenas a adesão neste tempo para os adultos (D). **c:** conídio, **cut:** cutícula, **ep:** epicutícula e **h:**hifa.

Tabela1. Resumo da dinâmica de adesão (a), germinação (g) e de penetração (p) dos conídios e hifas do fungo *B. bassiana* em suspensão, no integumento de larvas e de operárias adultas de formigas *A. sexdens rubropilosa*, nos tempos de 24, 48 e 72 horas pós-exposição.

Tempo	Larva		Operária	
	MEV	Histologia	MEV	Histologia
24h	<u>a</u>	<u>a</u>	<u>a</u>	<u>a</u>
48h	<u>g</u>	<u>p</u>	<u>g</u>	<u>a</u>
72h	<u>g</u>	<u>p</u>	<u>g</u>	<u>p</u>

2.4 DISCUSSÃO

Ao longo do desenvolvimento do presente trabalho a exposição de formigas *A. sexdens rubropilosa* ao fungo *B. bassiana*, permitiu que o processo de penetração das hifas no interior do corpo do inseto levasse um tempo menor do que 48 horas para as larvas fato esse que muito provavelmente foi facilitado pela frágil constituição do seu exoesqueleto, uma vez que os imaturos ainda não têm a cutícula totalmente esclerotizada, informação esta de extrema relevância neste tipo de controle. Para os adultos foi registrado tempo de penetração menor do que 72 horas, o que seria de certa forma esperado, uma vez que estes últimos já possuiriam o seu integumento totalmente esclerotizado conferindo, portanto, ao inseto maior rigidez (proteção contra dessecação, parasitismo e predação) e, conseqüentemente blindando o mesmo com uma barreira física de proteção, extremamente eficiente e difícil de ser transposta (CHAPMAN, 1972).

Nessa direção outros trabalhos foram também desenvolvidos para mostrar quais seriam os tempos mais adequados (considerados ideais) para a conclusão de cada etapa (adesão, germinação e penetração) que levaria ao sucesso dos fungos entomopatogênicos no controle de insetos pragas. Dentre eles estaria o de Moino et al. (2001), que estudando cupins subterrâneos (*Heterotermes tenuis*) fazendo uso de técnicas de MEV, verificaram que a exposição dos mesmos aos conídios de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, provocaria nos momentos de adesão e de germinação dos conídios, modificações importantes na superfície do inseto, e ainda, que esses conídios necessitariam de períodos de tempo aproximados de 24 horas para a germinação e de 48 horas para a penetração, dados esses que corroboraram aqueles aqui encontrados para as larvas estudadas. Outro trabalho importante tendo as larvas de *Solenopsis richteri* como modelo, foi aquele de Broome et al. (1976) que mostraram por meio de secções histológicas que após 48 horas da ocorrência da infecção já havia a presença de hifas de *B. bassiana* penetrando no inseto, via integumento.

No presente estudo fez-se uma avaliação do potencial de adesão e de germinação dos conídios, bem como da penetração das hifas do fungo *B. bassiana* no integumento de larvas e de operárias adultas de formigas *A. sexdens rubropilosa*, consideradas importante praga, levando-se ainda em conta o tempo em que esses processos ocorreram.

Diehl-Fleig et al. (1988) que estudaram soldados de *A. sexdens piriventris* já haviam registrado que o tempo de 72 horas após a exposição desta espécie de formigas a fungos entomopatogênicos provocaria 50% de mortalidade dos mesmos, quando estes estivessem em

ambiente controlado. Castilho et al. (2010) relatou a virulência de *M. anisopliae*, o que levou a 80% de mortalidade de soldados também nas primeiras 72 horas após a inoculação deste em *A. bisphaerica* e, ainda, assegurou que os isolados de *B. bassiana* também foram patogênicos para *A. sexdens rubropilosa* neste mesmo intervalo de tempo.

Outro fator importante a se considerado é que, nos imaturos as secreções antimicrobianas sintetizadas por determinadas glândulas exócrinas, as quais nos adultos já vêm sendo produzidas, (principalmente as da glândula metapleurale), secretam substâncias que auxiliam no comportamento de defesa dos insetos contra os patógenos (BOT et al., 2002, LACERDA et al., 2010, POULSEN et al., 2002, VIEIRA et al., 2012). Nos imaturos as mesmas ainda não começaram a ser produzidas (ou podem estar num estágio inicial de síntese) e, isso facilitaria a permanência dos conídios sobre o integumentoe facilitaria a penetração das hifas do fungo no interior do corpo dos insetos (ORTIZ et al., 2012). Além disso, não poderia ser desprezado o comportamento de contato das operárias com as larvas, momento este em que as primeiras usariam seus apêndices (antenas e pernas) para recolher detritos e microorganismos das larvas, reservando-os na cavidade bucal, para posterior eliminação (pellet) na câmara de lixo da colônia (MUELLER et al., 2001, BARBIERI 2007) e, momento este que permitiria maior exposição do imaturo ao fungo entomopatogenico devido ao contato região oral da operária/larva, principalmente durante a alimentação (PETRALIA; VINSON. 1978).

No caso específico dos adultos, quando focados os processos de adesão e germinação dos conídios dos entomopatógenos na superfície do seu integumento, deve-se também levar em conta o comportamento de limpeza que é comum ocorrer entre as operárias dos insetos sociais, ou seja, o allogrooming (WILSON, 1971). Este poderia ser considerado um dificultador, visto que promoveria a remoção dos conídiosda superfície do inseto até mesmo quando fossem manipulados aqueles sítios do corpo de mais difícil acesso comono caso dalateral do clipeo e da junção nó/gáster, já anteriormente relatados em outros trabalhos como sítios de deposição (TRAVAGLINI et al., 2016). Em contraposição, na literatura especializada em controle biológico, já foram registradas informações confirmando que para se levar um hospedeiro à morte, bastaria apenas um conídio viável e, que encontrasse todas as condições favoráveis para o seu desenvolvimento (ARNOSTI et al., 2016).

Oi e Willians 2002, estudando transmissão de patógenos verificaram que houve contaminação da rainha após introdução de larvas e das pupas contaminadas por *Thelohania*

solenopsae (Microsporidia: Thelohaniidae) em colônias de formigas *Solenopsis invicta*. Sendo que Oi et al. (2005), registrou crescente dispersão de *Vairimorpha invictae* (Microsporidia: Burenellidae) entre pupas e, contrariamente Armitege et al. (2015), relatou que não ocorreria contaminação em pupas de *Acromyrmex echinator* quando estas fossem expostas a *M. anisopliae*.

Além do próprio integumento que recobre externamente o inseto, as aberturas naturais encontradas no seu corpo tais como: ânus, espiráculos e cavidade oral tem sido consideradas como importantes sítios para penetração das estruturas dos fungos entomopatogênicos no interior do inseto (KERMARREC et al., 1986), sendo que não há em nossos registros tal situação, apenas uma imagem com hifas crescendo no sentido oposto da aberturas natural outra com hifas crescendo próximas as bordas de um espiráculo (Figura 4 e 5). Estas aberturas, teriam como proteção estruturas que anatomicamente impediriam e evitariam a penetração de agentes estranhos no interior do inseto (DUNN, 1988; SILVA, 2002). No caso específicos dos espiráculos, estariam as traquéias e traquéolas atuando como barreira. No caso da cavidade oral haveria a produção da saliva a qual também teria potencial de inibir a germinação do conídio (FERNANDEZ-MARIN et al., 2006).

No presente estudo ficou confirmado que a adesão e a germinação dos conídios na superfície da cutícula das operárias adultas de *A. sexdens rubropila* começou a ocorrer após 24 horas da exposição ao fungo *B. bassiana*, tempo esse que foi também quando observou-se a diferenciação do apressório (estrutura de penetração do fungo). O processo de penetração em massa das hifas do fungo *B. bassiana* no interior do corpo destas operárias ocorreu 72 horas após a exposição à suspensão fungica, o que corroborou outros estudos desenvolvidos com carrapatos *Boophilus microplus* (ARRUDA et al., 2005). Ainda nessa perspectiva da relação parasita/hospedeiro, Bittencourt et al. (1999) relatou através de análises por meio de microscopia eletrônica de varredura, após infecção experimental que a principal forma de penetração do *M. anisopliae* em *B. microplus* seria mesmo via integumento, e ainda ressaltou que não foram encontradas evidências de infecção dos carrapatos ocorrendo via aberturas naturais (BITTENCOURT et al., 1995).

Assim, de maneira geral para se considerar uma estratégia de controle biológico em formigas, como bem sucedida, deve-se levar em consideração as características próprias de cada fungo entomopatogênico, incluindo o seu grau de virulência, bem como o tempo necessário para a adesão e germinação dos conídios. Assim os resultados que aqui foram

apresentados permitiram afirmar que para o combate às formigas cortadeiras da espécie *A. sexdens rubropilosa*, fazendo uso de controle microbiano com fungos entomopatogênicos (*B. bassiana*, *M. anisopliae* ou até mesmo *A. flavus*) o principal estágio do seu ciclo biológico que deve ser focado como alvo nas aplicações é o de larva, visto seu integumento ser ainda frágil (pouco esclerotizado) o que permitirá o sucesso do fungo na adesão e na germinação. Ressalte-se também que a eliminação via contaminação dos imaturos interferiria diretamente na densidade populacional, comprometendo o crescimento ergonômico da colônia.

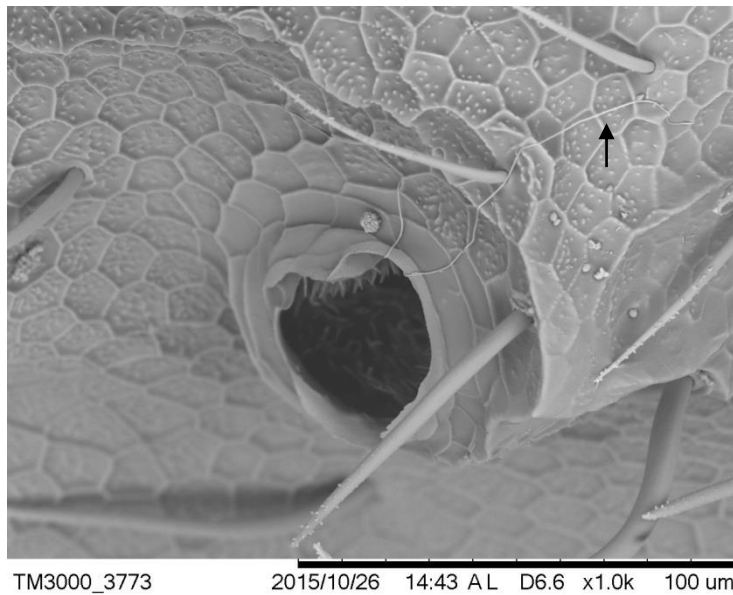


Figura 4. Hifa desenvolvendo no sentido oposta da abertura natural (seta).

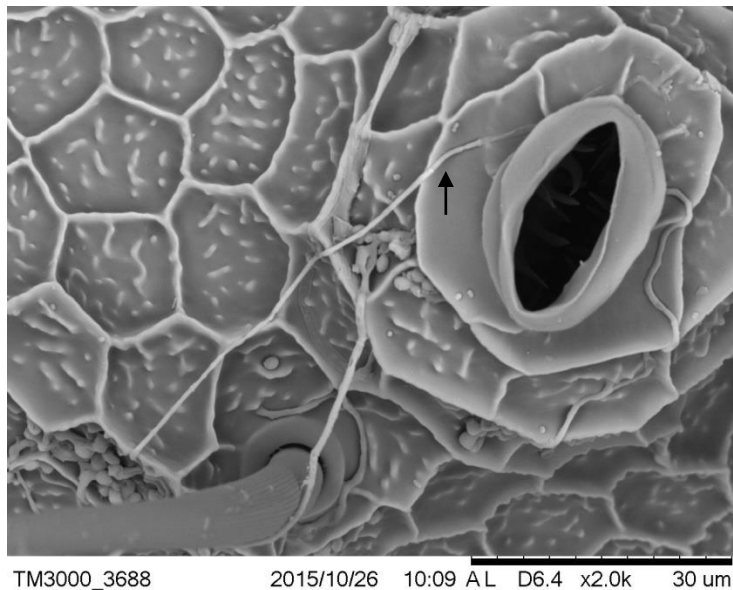


Figura 5. Hifas ao redor de um espiráculo próximo a uma sensila (seta).

REFERÊNCIAS

- ALVES S.B. **Controle microbiano de insetos**. 4th edition. FEALQ, Piracicaba, 1998.
- ALVES S.B.; SOSA-GÓMEZ D.R. Virulência do *Metharhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. para castas de *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908). **Poliagro**, Bandeirantes, v.5, n.1, p.1-9. 1983.
- ARMITAGE, S.A.O; FERNDEZ-MARIN, H.; BOOMSMA, J.J.; WCISLO, W.T. Slowing them down will make them lose: a role for attine ant crop fungus in defending pupae against infections? **J Anim Ecol**, 85, 1210–1221. doi: 10.1111/1365-2656.12543. 2016.
- ARNOSTI, A.; DELALIBERA, JR.I.; CONCESCHI, M.R.; TRAVAGLINI, R.V.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Morphological mapping of the integument of adult females of *Diaphorina citri* Kuwayama, targeting the development of control strategies. **Int J Adv Agric Res**, 4, 57-64. 2016.
- ARRUDA, W., LÜBECK, I., SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. **Exp Appl Acarol**, 37, 231-244. DOI 10.1007/s10493-005-3818-6. 2005.
- BARBIERI, R.F.; FORTI, L.C.; FUJIHARA, R.T.; CARLOS, A.A. Fluxo de corante e inseticida entre operárias de formigas cortadeiras. **Arq Inst Biol**, 69, 375-377. 2007.
- BIDOCHKA M.J.; SMALL C. Phylogeography of *Metarhizium*, an insect pathogenic fungus. In: **Insect-Fungal Associations**. Ed. by Oxford University Press Inc., New York. 28-49. 2005.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASCARENHAS, A.G.; FACCINI, J.L.H. Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. **Ciênc Rural**, 29, 351-354. 1999.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A.F. Dinâmica da infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Rev univ Rural Sér Ci Vida**. 17, 83-88. 1995.
- BOT, A.N.M.; ORTIUS-LECHNER, D.; FINSTER, K.; MAILE, R.; BOOMSMA, J.J. Variable sensitivity of fungi and bacteria to compounds produced by the metapleural glands of leaf-cutting ants. **Insectes Soc**, 49, 363-370. 2002.
- BRITTO, J.S.; FORTI, L.C.; OLIVEIRA, M.A.; ZANETTI, R.; WILCKEN, C.F.; ZANUNCIO, J.C.; LOECK, A.E.; CALDATO, N.; NAGAMOTO, N.S.; LEMES, P.G.; 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**. 3, 11-92. 2016.
- BROOME, J.R.; SIKOROWSKI, P.P.; NORMENT, B.R. A Mechanism of Pathogenicity of *Beauveria bassiana* on Larvae of the Imported Fire Ant, *Solenopsis richteri*¹. **J Invertebr Pathol**, 28, 87-91. 1976.

CASTILHO, A.M.C.; FRAGA, M.E.; AGUIAR-MENEZE, E.L.; ROSA, C.A.R. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* patogênicos a soldados de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa* em condições de laboratório. **Ciênc. Rural**, 40, 1243-1249. 2010.

CHAPMAN R.F. **The insects** - Structure and function. 4th edition. Cambridge University Press, Cambridge. 1998.

DELLA LUCIA, T.M.C.; VILELA, E.F. Métodos atuais de controle e perspectivas. In: **As formigas cortadeiras**. Ed. by Folha de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, p.163-190. 1993.

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. **Ciênc. Cult**, v.40, n.11, p.1103-1105. 1988.

DUNN P.E. Biochemical aspects of insect immunology. **Ann Rev Entomol**, 31, 321-39. 1986.

FERNANDEZ-MARIN, H.; ZIMMERMAN, J.K.; REHNER, S.A.; WCISLO W.T. Active use of the metapleural glands by ants in controlling fungal infection. **Proc R Soc B**, 273, 1689-1695. doi:10.1098/rspb.2006.3492. 2006.

FORTI, L.C., PRETTO, D.R.; GARCIA, I.P. Aprimoramento de Metodologias Experimentais para Controle de Formigas Cortadeiras. **An do III Curso Atualização no Control. Formigas Cortadeiras**, 14-23. 1994.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E.O. **The Ants**. Ed. by Harvard University Press. Cambridge, 732. 1990.

ISENRING, R.; NEUMEISTER, L. Recommendations regarding Derogations to use alpha-Cypermethrin, Deltamethrin, Fenitrothion, Fipronil and Sulfluramid in FSC Certified Forests in Brazil. **Recomm by Tech Advis Recomm**. 1-99. 2010.

JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. Ed. by Santos, São Paulo. 1983.

KERMARREC, A.; FEBUAY, G; DECHARME, M. Protection of leaf-cutting ants from biohazards: Is there a future for microbiological control? In: **Fire ants and leaf-cutting ants: biology and management**. Ed by Westview studies in insect biology. London, 339-356. 1986.

LACERDA, F. G.; DELLA LUCIA, T. M.C.; SERRÃO, J. E.; CECON, P. R.; DE SOUZA, L. M.; DE SOUZA, D. J. Morphometry of the metapleural gland of workers engaged in different behavioral tasks in the ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Anim Biol**, 60, 229–236. 2010.

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

MOINO, JR. A.; ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; NEVES, P.M.O.J.; PEREIRA, R.M.; VIEIRA, S.A. External development of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in the subterranean termite *Heterotermes tenuis*. **Sci Agri**, 59, 267-273. 2002.

MUELLER, U.G.; SCHULTZ, T.; CURRIE, C.R.; MALLOCH D. The Origin of the Attine Ant- Fungus Mutualism. **Q Rev Biol**, 76 (2):169-97. 2001.

OI, D.H.; BRIANO, J.A.; VALLESA, S.M.; WILLIAMS D.F. Transmission of *Vairimorpha invictae* (Microsporidia: Burenellidae) infections between red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae) colonies. **J Invertebr Pathol**, 88, 108–115. doi:10.1016/j.jip.2004.11.006. 2005.

OI D.H.; WILLIAMS D.F. Impact of *Thelohania solenopsae* (Microsporidia: Thelohaniidae) on Polygyne Colonies of Red Imported Fire Ants (Hymenoptera: Formicidae) **J. Econ. Entomol.** 95, 558-562. 2002.

ORTIZ, G.; MATHIAS, M.I.C.; BUENO, O.C. First evidence of an intimate symbiotic association between fungi and larvae in basal attine ants. **Micron**, 43, 263–268. 2012.

PAGNOCCA, F.C.; CARREIRO, S.C.; BUENO, O.C.; HEBLING, M.J.; DA SILVA O.A., Microbiological changes in the nests of leaf-cutting ants fed on sesame leaves **J. Appl. Ent.** 120, 317-320. 1996.

PETRALIA R.S.; VINSON S.B. Feeding in the Larvae of the Imported Fire Ant, *Solenopsis invicta*:¹ Behavior and Morphological Adaptations. **Ann Entomol Soc Am**, 71, 643-648. 1978.

POULSEN, M.; BOT, A.N.M.; NIELSEN, M.G.; BOOMSMA, J.J. Experimental evidence for the costs and hygienic significance of the antibiotic metapleural gland secretion in leaf-cutting ants. **Behav Ecol Sociobiol**, 52, 151–157. DOI 10.1007/s00265-002-0489-8. 2002.

RIBEIRO, M.M.R.; AMARAL, K.D.; SEIDE, V.E.; SOUZA, B.M.R.; DELLA LUCIA, T.M.C.; KASUYA, M.C.M.; DE SOUZA, D.J. Diversity of fungi associated with *Atta bisphaerica* (Hymenoptera: Formicidae): the activity of *Aspergillus ochraceus* and *Beauveria bassiana*. **Psyche**, 1-6. doi:10.1155/2012/389806. 2012.

SILVA, C.C.A. Aspectos do sistema imunológico dos insetos. **Biotecnologia cienc desenvolv.** 24, 68–72. 2002.

ST. LEGER, R.J.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M. Cuticle-Degrading Enzymes of Entomopathogenic fungi: Synthesis in Culture on Cuticle. **J Invertebr Pathol**, 48, 85-95. 1986.

TRAVAGLINI R.V.; FORTI, L.C.; ARNOSTI, A.; CAMARGO, R.S.; SILVA, L.C.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Mapping the Adhesion of Different Fungi to the External Integument of *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908). **Int J Agric Innov Res**, 5, 118-125. 2016.

VIEIRA, A.S.; MORGAN, E.D.; DRIJFHOUT, F.P.; CAMARGO-MATHIAS, M.I.
Chemical Composition of Metapleural Gland Secretions of Fungus-Growing and Non-
Fungus-Growing Ants. **J Chem Ecol**, 38, 1289–1297. DOI 10.1007/s10886-012-0185-8.
2012.

CAPÍTULO 3: ISCA ATRATIVA ENCAPSULADA VISANDO CONTROLE MICROBIANO DE FORMIGAS CORTADEIRAS

Raphael Vacchi Travaglini ^{1*}; Luis Eduardo Pontes Stefanelli¹; André Arnosti²; Roberto da Silva Camargo¹; Luiz Carlos Forti¹

¹Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP-Botucatu.

²Instituto de Ciências Biológicas, UNESP-Rio Claro.

^{*}raphaelvacchitravaglini@gmail.com

RESUMO

A busca por novos controles de pragas é uma constante na agricultura, sendo assim, as formulações tendem a atender os anseios dos produtores, no caso das formigas cortadeiras, o controle mais difundido é o que faz uso de isca granulada atrativa, porém não se tem opções eficientes para o controle no sistema orgânico. No intuito de encontrar uma alternativa ao controle químico, elaboramos uma cápsula capaz de carrear o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e *Trichoderma asperellus* para o interior das colônias de *Atta sexdens rubropilosa*. As iscas foram incorporadas no fungo simbiote em sua totalidade nas primeiras 24 horas do experimento. O ato comportamental mais observado foi o de lambear a cápsula. A colônia manteve-se ativa após aplicação dos agentes de controle, não demonstrando alterações.

Palavras-Chave: Formiga. Controle. Fungo. Entomopatogenico. Imaturos.

3.1 INTRODUÇÃO

Atualmente o ingrediente ativo mais comumente empregado pela indústria de isca granulada formicida é a sulfluramida, essa molécula inseticida de ação lenta, por ser usada em baixas concentrações, é considerada a forma mais segura de controle segundo registros (BRITTO et al., 2016).

No Brasil, o controle de formigas cortadeiras é amplamente realizado com a isca granulada atrativa, contendo polpa cítrica em sua formulação, pois é necessário que as operárias forrageadoras transportem as iscas até o interior de suas colônias, para serem incorporadas no jardim de fungo simbiote e assim ocorra à disseminação do princípio ativo entre as operárias que participam deste processo (manipulando a isca). O atrativo também atua camuflando o princípio ativo e evitando que as formigas detectem essa substância tóxica, para que não haja rejeição da isca (DELLA LUCIA; VILELA, 1993).

Enquanto demais técnicas de controle, como o uso de termonebulizador ou polvilhadeira, perderam espaço devido a particularidades da formulação de seus inseticidas, do custo operacional, devido à especificidade do funcionamento destes equipamentos além do maior risco de contaminação, tanto do meio ambiente, por resíduos, quanto do operador por exposição ao produto aplicado, a isca granulada neste sentido apresenta vantagens, por ser a forma mais prática e econômica para aplicação, podendo também ser encontrada em embalagens micro porta iscas que facilitam os cálculos do volume a ser aplicado (BOARETTO; FORTI, 1997, BRITTO et al., 2016). Estas ações de controle exigem o uso de equipamento de proteção individual (EPI).

Consideradas pragas agrícolas, as formigas cortadeiras do gênero *Atta*, vulgarmente chamadas de “saúvas”, têm como característica taxonômica três pares de espinhos dorsais e apresentam polimorfismo entre as operárias da colônia (soldado, carregadeira e generalistas), além da casta reprodutiva, enquanto o gênero *Acromyrmex*, popularmente conhecido por “quenquéns”, possui formigas menores, ostentando quatro ou mais pares de espinhos no dorso. Estes dois gêneros pertencentes à tribo Attini (Subfamília: Myrmicinae), são comumente encontrados causando desfolhas nas plantas cultivadas, principalmente espécies florestais, para a manutenção do fungo simbiote (*Leucoagaricus gongylophorus*), do qual se alimentam principalmente na fase larval, são consideradas pragas-chave da cultura do *Eucalyptus* e *Pinus*, podendo ocasionar 30% menos de rebrota em áreas infestadas (DELLA LUCIA; VILELA, 1993).

Quando em equilíbrio com o ambiente são tidas como engenheiras do solo, seus ninhos, subterrâneos, aumentam a fertilidade e permeabilidade deste, trazendo benefícios como o acumulando matéria orgânica, possibilitando o desenvolvimento de determinadas espécies da flora, através da dispersão de sementes, são capazes de remodelar os cenários florestais, atraindo atenção para estudos de características biológicas e comportamentais (MONTROYA-LERMA et al., 2012).

Alguns programas de controle biológico empregando *Metarhizium anisopliae* vêm tendo reconhecido sucesso, como no caso da cigarrinha-da-cana-de-açúcar e cigarrinha-da-pastagem (Hemiptera: Cercopidae), porém no caso de formiga cortadeira (Hymenoptera: Formicidae), esbarramos na “imunidade social” (CREMER et al., 2007), apresentada por este inseto que vive em colônias populosas e muito bem organizadas (FORTI et al., 1994). São várias as estratégias adotadas pelas colônias para defender a população dos inimigos naturais, pois estas pragas que evoluíram no ambiente de solo parecem ter desenvolvido uma glândula (metapleural), capaz de anular a ação patogênica de inúmeros microorganismos do meio em que habitam, através das secreções destas, que, por exemplo, impediriam a germinação de fungos aderidos ao tegumento das operárias (VIEIRA et al., 2012; TRAVAGLINI, et al. 2016).

EVANS (1974) e SAMSON et al. (1988) relataram que fungos entomopatogênicos podem ser comumente encontrados infestando formigas, sendo que *Beauveria bassiana* pode ser isolada de operárias de *Atta sexdens piriventris* (DIEHL-FLEIG et al., 1992) e em rainhas de *A. sexdens rubropilosa* (ALVES; SOSA GÓMEZ, 1983), posteriormente, *Metarhizium anisopliae* também foi encontrado infestando esta última espécie (ZARZUELA, 2007).

Estes fungos foram encontrados naturalmente acometendo formigas, elevando a importância destes para os ensaios de infecção (testes de mortalidade), sendo que em laboratório, em condições de confinamento dos indivíduos, alcançou-se 100% de mortalidade nos primeiros dias de experimento, dependendo da concentração da suspensão fúngica, forma de aplicação do isolado fúngico utilizado, espécie de formiga cortadeira e casta operária exposta aos patógenos (TRAVAGLINI et al., 2016; CASTILHO et al., 2010), tem-se ainda resultados de mortalidade com uso de *Metarhizium anisopliae* aliado a um imunossupressor, onde esta combinação apresentou diferença significativa aos demais tratamentos, atingindo a maior taxa de mortalidade (DORNELAS et al., 2017).

Neste contexto, propomos as cápsulas atrativas contendo fungo entomopatogênico *M. anisopliae* e *T. asperellus*, prospectados da natureza e concentrado por processo industrial por

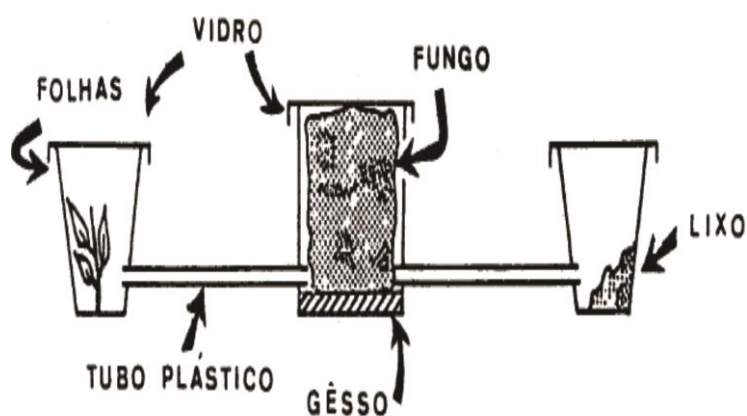
meio de cultivo em arroz, no intuito de promover o controle microbiano e aumentar o leque de alternativas de controle, pensou-se numa isca tendo os indivíduos imaturos como o principal alvo da aplicação, testando as cápsulas em colônias iniciais de formigas cortadeiras (até um ano).

3.2 MATERIAL E METODOS

Obtenção das colônias:

As colônias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae), foram coletadas a campo após três meses da fundação, ou seja, após a revoada, quando já estabelecidas, foram escavadas e transferidas para potes de acrílico contendo três repartições: a arena de forrageamento, o jardim de fungo simbionte (com gesso na base) e a câmara de lixo, conectadas por tubos plásticos transparentes (Figura 1), mantidas em condições de laboratório (25°C e 75%UR), para serem utilizadas quando atingem um ano de idade e volume de fungo de aproximadamente 1 litro. O compartimento destinado ao lixo era limpo periodicamente (FORTI et al., 1994).

FIGURA 1: Dispositivo para manutenção de colônias em laboratório



Fonte: Forti et al. (1994).

Obtenção do fungo:

Empregou-se o fungo entomopatogenico *M. anisopliae* (10^9 conídios/g), formulação comercial (5%), com inerte tipo talco (pó de arroz), preenchendo o compartimento de uma das repartições da cápsula, ou seja, no interior continha 0.1g do produto. Além de *Trichoderma*

asperellus diretamente peneirado da multiplicação em arroz cozido aos 21 dias após inoculação, fornecidos pela empresa Tecnicontrol.

Preparo da cápsula:

As cápsulas são encaixadas, sendo que a parte maior foi reduzida com um corte de tesoura (0.3 mm), retirando parte de seu corpo cilíndrico, assim reduzindo seu volume. Para confecção das iscas atrativas, foram usadas cápsulas duras de gelatina bipartida populares, estas permaneceram em recipiente fechado com polpa cítrica seca e triturada para impregnação do aroma cítrico que é deveras atrativo para estas formigas (RAMOS, 2006). Para melhor adesão da polpa cítrica na superfície das cápsulas, foi borrifado água destilada e melaço (1:1) nas cápsulas já preenchidas e fechadas com o fungo entomopatogenico *M. anisopliae* ou o antagonista do fungo simbiote *T. asperellus*. A fim de aumentar a atratividade e consequentemente o transporte da cápsula, estas secaram em uma bandeja por 12 horas, ficando com aspecto empanado.

Sala de observação:

Os testes foram realizados no Laboratório de Insetos Sociais-Praga (LISP), no Departamento de Proteção Vegetal, da Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA), da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Câmpus de Botucatu, em sala aclimatada, similar a sala de criação, sendo que para a manutenção destas colônias, foram ofertadas folhas de *Acalypha wilkesiana* ou grão de milho triturado como alimento nos demais dias, dependendo da umidade aparente do fungo simbiote.

Uma vez preparado o material, as colônias foram alocadas numa caixa de vidro que permitiu a observação e registro fotográfico dos atos comportamentais, listados numa planilha e anotados durante as seis primeiras horas do experimento, a cada dez minutos (cronometrados), iniciando após ofertarmos as cápsulas, a fim de gerar as frequências de cada ato comportamental, nas análises estatísticas no programa Excel e teste não paramétrico (Kruskal-Wallis).

Comportamentos observados:

A média dos tempos para realizar o transporte das cápsulas e movimentação de operárias no transporte do lixo foram mensurados separadamente dos atos comportamentais de incorporação: lambem a superfície das cápsulas (A), segurar as cápsulas no jardim de fungo simbiote (B), repicar as cápsulas (C), mastigar (D) incorporar o material da cápsula no jardim de fungo simbiote (E), para tanto foram ofertadas 20 cápsulas na arena de forrageamento, para cada uma das colônias observadas, cujas operárias foram divididas em dois grupos, (P) e (M), respectivamente, entre 1 mm e 2 mm de cápsula encefálica e maiores que 2 mm de cápsula encefálica, sendo que as operárias menores que estas medidas não foram contabilizadas neste experimento e por ser utilizada colônias iniciais mantidas em laboratório, não há presença de soldados. A classificação das formigas e os atos comportamentais avaliados foram adaptados de trabalhos que objetivaram a observação de incorporação de substrato em colônias desta espécie (SILVA, 2014; CAMARGO et al., 2017).

Continuamos observando diariamente, durante uma semana, em intervalos de 24 horas, para verificar possíveis alterações no volume do jardim de fungo simbiote, em relação a uma régua milimétrica usada para tal finalidade. A câmara de lixo foi limpa, permitindo assim verificar o que foi levado para tal compartimento neste período.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os atos comportamentais observados nas primeiras 6 horas do experimento, o mais executado foi o de lambem a cápsula, seguido de segurar a cápsula, após análise estatística, ficou evidente pelo teste de (Kruskal-Wallis), que as operárias estiveram envolvidas por mais tempo nestes atos comportamentais, corroborando trabalhos similares (SILVA, 2014; CAMARGO et al., 2017), pois esta espécie não apresenta altas taxas de trofalaxia, diferente de outras espécies de formiga, sendo que várias castas de operárias participam do processo de incorporação do substrato, manipulando o mesmo (Figura 2). O ato de segurar a cápsula é majoritariamente efetuado por operárias de porte médio (M), atingindo 85% das operárias envolvidas nesta função, em média quatro operárias, segurando a cápsulas no fungo simbiote ao longo do período observado. Nas primeiras horas as mesmas operárias que transportam, seguram a cápsula e também são as que lambem, porém com o passar do tempo as operárias (P, cápsula encefálica de 1 até 2mm) chegam a superar em número de operárias (M, cápsula encefálica maior que 2mm) no ato comportamental de lambem a cápsula.

Ocorreu à incorporação do substrato no jardim de fungo simbiote, não havendo rejeição de talco, fungo ou cápsula gelatinosa, apesar de iniciar em média na quinta hora de

observação, só terminou no dia seguinte, ou seja, 24 horas após o início do experimento. Para *T. asperillus* houve rejeição parcial do material a ser incorporado na segunda hora do experimento após abertura das cápsulas.

Quanto ao transporte, visto que as cápsulas foram carregadas em média nas primeiras 4 horas do experimento, variando entre as colônias experimentadas em 2 horas e 6 horas após início do transporte da primeira cápsula até o da última cápsula, variação explicada pelo ritmo de forrageamento, diferente entre as colônias, sendo que o máximo de formigas envolvidas nesta função foram 30 operárias forrageiras, entre elas 15 (P) e 15 (M), a superfície rugosa gerada pela adesão de fragmentos de polpa cítrica seca favoreceu o transporte pelas operárias recrutadas, visto que cápsulas pouco empanadas foram às últimas a serem transportadas, na conexão do lixo da colônia tem-se em médias duas operárias por hora na atividade de transporte de resíduos.

A cápsula empanada tinha um formato globoso, assemelhando-se a uma semente, estas por sua vez são comumente citadas sendo naturalmente transportadas por saúvas em ambiente de cerrado (LEAL; OLIVEIRA, 1998). Em média três formigas médias (M), são necessárias para o transporte da cápsula, variando entre 6 operárias e uma operária (Figura 2). A cápsula, contendo o fungo em seu interior e empanada com polpa cítrica externamente, pesava entre 0,15g e 0,2g. O tamanho das operárias nesta função influenciava no modo que a cápsula era transportada (Figura 3). Fica evidente que o peso do substrato interfere no transporte e na velocidade de forrageio, além de que o local de passagem da trilha, pode dificultar o transporte, levando a um ajuste no tamanho do substrato carregado (DUSSUTOIR et al., 2009), frisando aqui a importância de formular uma isca atrativa, de peso e tamanho compatível com a espécie alvo da aplicação.

Em *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, a velocidade de transporte da carga independe do tamanho da operária e do tamanho da área foliar, estando este diretamente relacionado com a temperatura, sendo o corte e transporte tarefa das operárias medianas e raramente das maiores (GOMIDES et al., 1997). Acredita-se que a presença de operárias menores na trilha de *Atta*, esteja relacionada com a manutenção dos feromônios de trilha (CALDATO, 2014).

Em 1959, temos a identificação da glândula responsável pela produção do feromônio de marcação das trilhas e posteriormente, a formação de trilha foi descrita como um processo baseado em retroalimentação positiva para o forrageamento em massa (WILSON, 1962), em que uma formiga (escoteira), ao encontrar uma fonte de alimento atrativa, retorna à colônia marcando a trilha com feromônio e recrutaria mais formigas ao chegar ao ninho, essas

formigas recrutadas seguiriam a trilha de feromônio deixada pela pioneira, até o alimento e ao retornarem, também marcariam a trilha (LOPES et al., 2004, TRAVAGLINI, 2014). O recrutamento em massa, através de trilhas químicas, é um exemplo de processo auto-organizável, quanto mais formigas são recrutadas, mais intensa a marcação de feromônio e consequentemente maior o estímulo para que outras formigas continuem o forrageamento, com a não marcação, ocorre à volatilização do feromônio diminuindo o estímulo e parando assim a atividade forrageira (TOLEDO, 2013).

O estímulo olfatório é importante no momento da seleção do substrato, porém apenas ele não garante o recrutamento de outras operárias para a fonte, ou seja, na trilha de forrageamento operárias exibem movimentos antenais para baixo e para cima, durante a locomoção, em atividade exploratória, quando estas operárias se deparam com a fonte de alimentação (aleatoriamente), exploram o substrato (iscas), visto a impossibilidade de carregar ou de se alimentar de tal fonte, as operárias abandonam o local e podem dar preferência para outro substrato (CARLOS, 2008, BARROS, 2013).

Após passar pelos tubos de conexões, quando no espaço reservado ao jardim de fungo simbiote, as cápsulas, distribuídas de maneira equidistantes na base do fungo simbiote, posteriormente elevada para a lateral deste, sentido o ápice. Estas cápsulas quando posicionadas no fungo simbiote, estavam prontas para serem incorporadas sendo cortadas (Figura 2D) e repicadas (Figura 3E).

Aparentemente as formigas operárias não distinguiram o fungo *M anisoplae* e parcialmente *T asperellus*, assim como a hipótese formulada com fungos endofíticos (ROCHA, 2017), uma vez que o transito de formigas no lixo foi constante do início ao final do experimento, tendo em média duas operárias (P ou M), executando esta função a cada hora amostrada. Para *T. asperellus* houve remoção do fungo direto da arena de forrageamento para o lixo da colônia, porém a maior parte foi incorporada no fungo simbiote. Imaturos contaminados, operárias mortas ou fragmento do jardim de fungo simbiote, fato que ocorre quando inseticidas químicos são reconhecidos pelas demais formigas operárias em testes laboratoriais não ocorreram (MARIN, 2014). O volume do fungo permaneceu constante durante a semana experimentada, uma vez que suas medidas de altura e base não sofreram alterações.

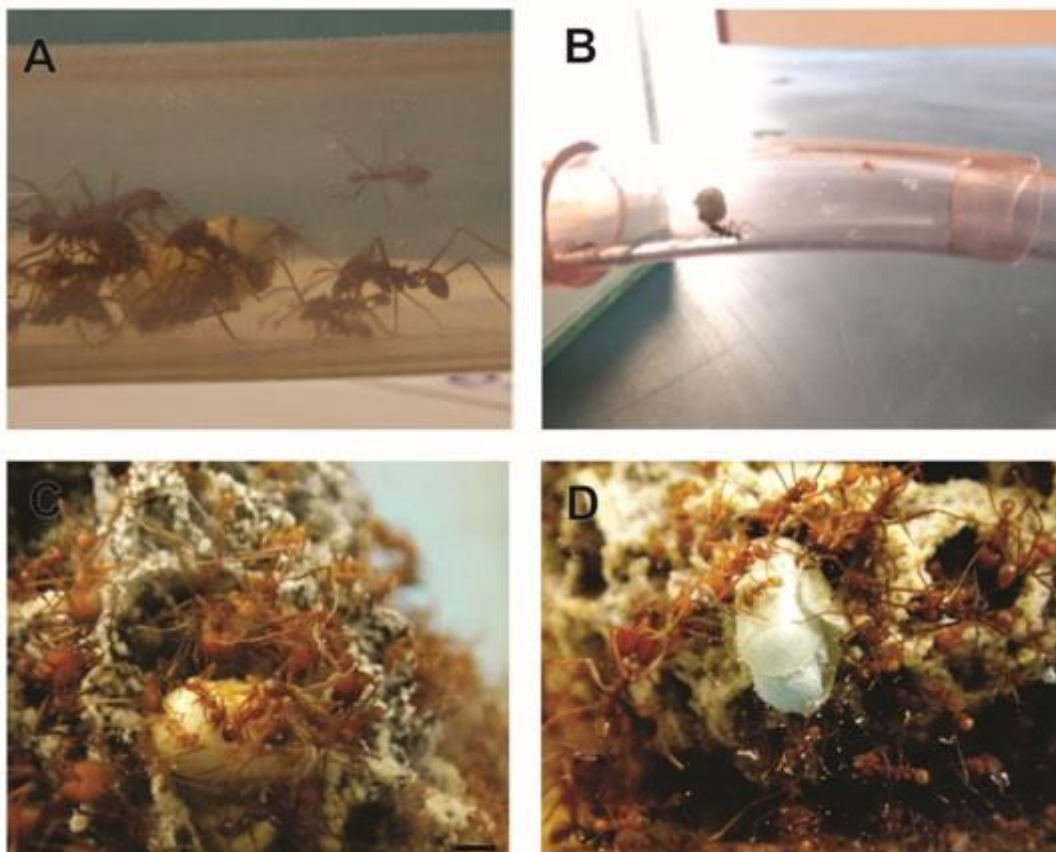


Figura 2: A) Transporte coletivo da cápsula pelos tubos de conexão do dispositivo, B) transporte da cápsula por uma operária (M). C) Posicionamento da cápsula no jardim de fungo simbiote e D) Incorporação do fungo *M. anisopliae* após abertura da cápsula. Fonte: Autor. (Barra de escala 2 mm).

Muitos autores estudaram a evolução das espécies de formigas cortadeiras e a interação com patógenos do ambiente, tais estudos mostram mudanças no comportamento das colônias e concluem que a imunidade social em sociedades de formigas é muito eficiente para evitar epizootia. Uma análise detalhada de mais de 114 anos de literatura, de 1900 até 2014, mostra que a maioria dos estudos utilizou os fungos entomopatogênicos *Beauveria* e *Metarhizium* (89% dos estudos sobre as interações) (LORETO; HUGHES, 2016). O controle microbiano parece não ter apresentado resultados satisfatórios em nível de campo, apenas em um estudo ocorreu o controle da colônia de *Atta cephalotes* por fungos entomopatogênicos, após utilizar mais de uma aplicação (LOPEZ; ORDUZ, 2003).

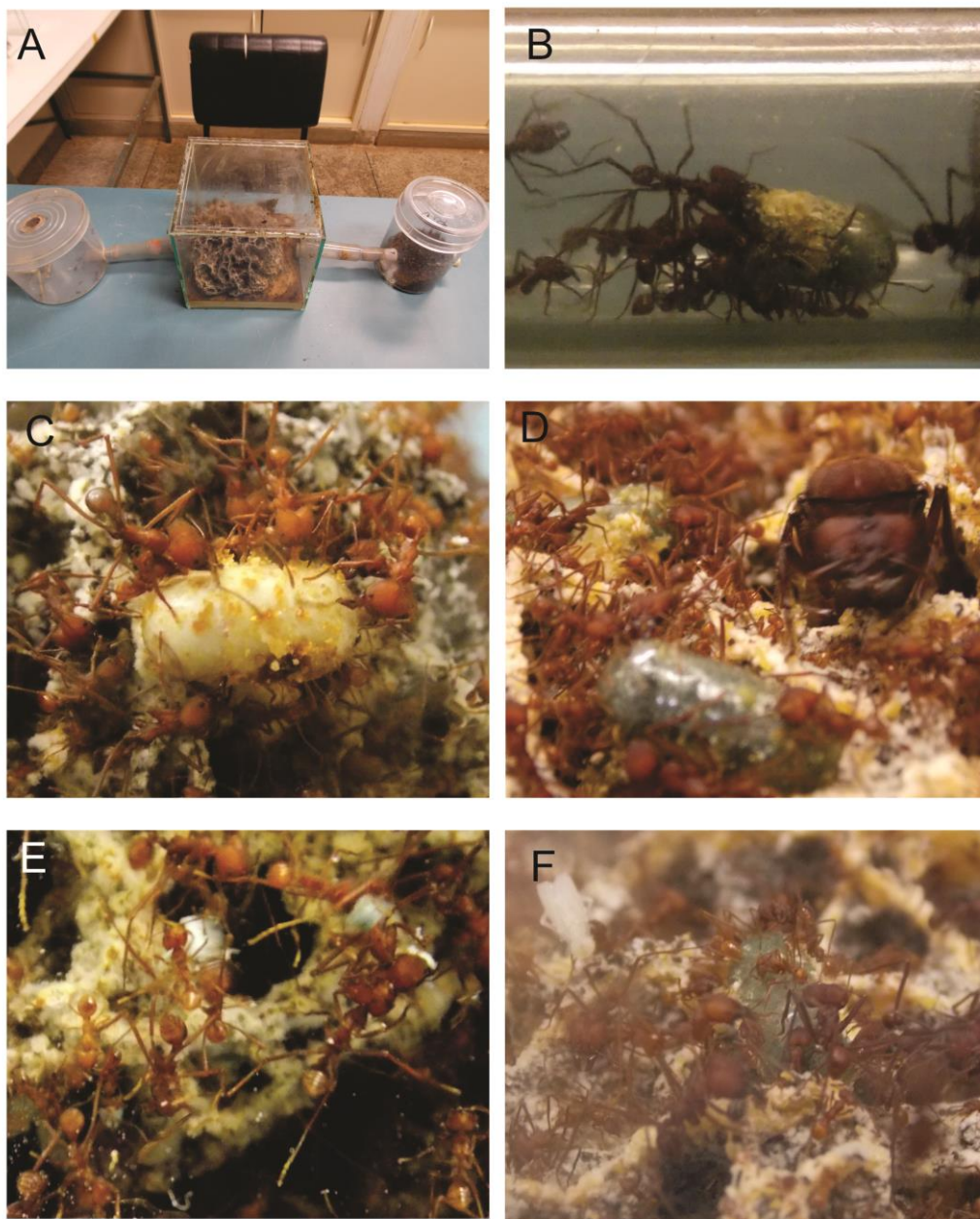


Figura 3. Prancha com: A) modelo de colônia usada para observação, B) transporte coletivo de cápsula contendo *T. asperellus*, C) Ato de lambar a cápsula, D) Ato de segurar à cápsula próxima a rainha, E) Ato de incorporar o conteúdo da cápsula (*M. anisopliae*) e F) Comportamento de incorporação próximo ao imaturo (pupa) da colônia.

Atos contrastados nas análises: lambar a superfície das cápsulas (A), segurar as cápsulas no jardim de fungo simbiote (B), repicar as cápsulas (C), mastigar (D) incorporar o material da cápsula no jardim de fungo simbiote (E).

Análise estatística para cápsulas contendo *Metarhizium anisopliae* quando comparado os comportamentos das operaria pequenas, para tanto foi utilizado um teste de Kruskal

Wallis, $H=231,81$, $GL = 7$, $p < 0,001$, sendo altamente significativo, sendo aplicado um pos teste Student-Newman-Keuls, sendo significativo quando se compara muitos comportamentos, segue tabela e gráfico:

Tabela 1. Comportamentos das operárias pequenas para as cápsulas contendo *M. anisopliae*.

A	B	C	D	E
x	*	*	**	**
	x	ns	*	ns
		x	*	ns
			x	ns
				x

*significativo, ** muito significativo e ns: não significativo

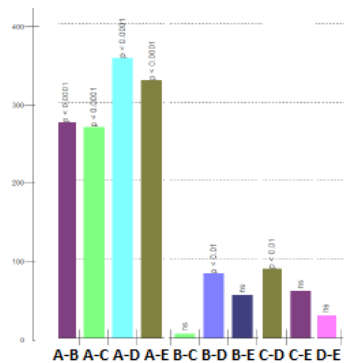


Gráfico 1. Comportamentos das operárias pequenas para as cápsulas contendo *Metarhizium anisopliae*.

Foi utilizado um teste de Kruskal Wallis, $H=368,7405$, $GL = 7$, $p < 0,001$, comparando os comportamentos das operaria médias ao processar a cápsula sendo altamente significativo, aplicado um pos teste Student-Newman-Keuls, vide tabela e o gráfico abaixo:

Tabela 2. Comportamentos das operárias médias para as cápsulas contendo *M. anisopliae*.

A	B	C	D	E
x	ns	**	**	**
	x	**	**	**
		x	*	ns
			x	ns
				x

*significativo, ** muito significativo e ns: não significativo

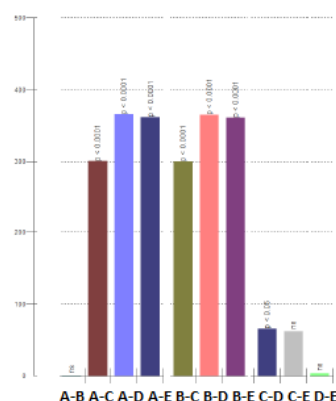


Gráfico 2. Comportamentos das operárias médias para as cápsulas contendo *Metarhizium anisopliae*.

Para a análise estatística das cápsulas contendo *Trichoderma asperellus*, também comparando os comportamentos das operárias pequenas ao manipular a cápsula. Foi utilizado um teste de Kruskal Wallis, $H=208,1633$, $GL=7$, $p<0,001$, sendo altamente significativo, sendo aplicado um pos teste Student-Newman-Keuls, sendo significativo quando se compara muitos comportamentos, segue a tabela e o gráfico abaixo:

Tabela 3. Comportamentos das operárias pequenas para as cápsulas contendo *T. asperellus*.

A	B	C	D	E
x	**	**	**	**
	X	Ns	ns	*
		X	ns	*
			x	ns
				x

*significativo, ** muito significativo e ns: não significativo

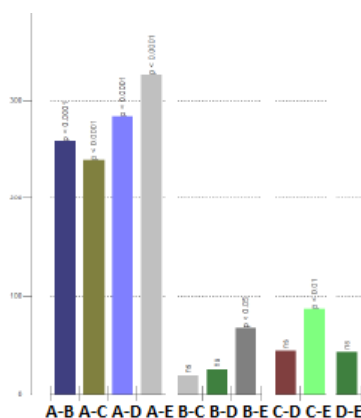


Gráfico 3. Comportamentos das operárias pequenas para as cápsulas contendo *Trichoderma asperellus*.

Comparando os comportamentos das operárias médias ao manipular a cápsula usamos um teste de Kruskal Wallis, $H=204,0005$, $GL=7$, $p<0,001$, sendo altamente significativo, sendo aplicado um pos teste Student-Newman-Keuls, sendo significativo quando se compara muitos comportamentos, como ilustra a tabela e o gráfico:

Tabela 4. Comportamentos das operárias médias para as cápsulas contendo *T. asperellus*.

A	B	C	D	E
x	**	ns	*	*
	x	**	**	**
		x	ns	*
			x	*
				X

*significativo, ** muito significativo e ns: não significativo

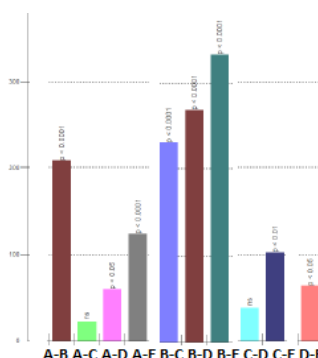


Gráfico 4. Comportamentos das operárias pequenas para as cápsulas contendo *Trichoderma asperellus*.

Há diferença comportamental oriunda do polimorfismo, sendo as operárias (M) especializadas em transportar e segurar a cápsula enquanto as operárias (P) estão envolvidas em lamber e incorporar o conteúdo na maior parte do tempo.

3.4 CONCLUSÃO

Tal contexto nos permite propor esta nova técnica de aplicação para um possível controle microbiano, uma vez que a isca de extrato vegetal (*Tephrosia candida*) é o primeiro e único produto certificado para o controle de formigas cortadeiras visando o produtor orgânico.

Este trabalho vem responder uma questão importante neste tipo de estudo, elucidando como carrear o fungo entomopatogênico ou demais microorganismos de interesse para o interior da colônia em altas concentrações.

REFERÊNCIAS

- ALVES, S.B.; SOSA GÓMEZ, D.R. Virulência do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. para duas castas de *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1968). **Poliagro**, v.5, n.1, p.1-9. 1983.
- BARROS, T.G.S. **Respostas comportamentais de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (hymenoptera, formicidae) a substâncias voláteis**. ix, 70 f. Dissertação - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu. 2013.
- BOARETTO, M.A.C; FORTI, L.C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras **Série Técnica IPEF**, 11, 31-46. 1997.
- BRITTO, J.S.; FORTI, L.C.; OLIVEIRA, M.A.; ZANETTI, R.; WILCKEN, C.F.; ZANUNCIO, J.C.; LOECK, A.E.; CALDATO, N.; NAGAMOTO, N.S.; LEMES, P.G.; CAMARGO, R.S. 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**. Stud. 3, 11-92. 2016.
- CALDATO, N. **Ontogenia das trilhas físicas em *Atta capiguara* Gonçalves 1944 (Hymenoptera: Formicidae)**. Tese (Doutorado em proteção de plantas) Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" UNESP - Botucatu - SP. 2014.
- CAMARGO, R.S.; PUCCINI, C.; FORTI, L.C; MATOS, C.A.O. Behaviors in Fungus Garden Cultivation: Routes of Contamination of Leaf Cutting Ant Workers with Fat-Soluble Tracer Dye. **International Journal of Agriculture Innovations and Research**. 5, 2319-1473. 2017.
- CARLOS, A. A. **Influência da polpa cítrica, do óleo e de fungos filamentosos na atratividade de iscas tóxicas à *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera, Formicidae)** 90 f. Tese (Doutorado em proteção de plantas) Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" UNESP - Botucatu - SP. 2008.
- CASTILHO, A.M.C.; FRAGA, M.E.; AGUIAR-MENEZES, E.L.; ROSA, C.A.R. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* patogênicos a soldados de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa* em condições de laboratório. **Ciência Rural** 40:1243–1249. 2010.
- CREMER, S.; ARMITAGE, S. A. O.; SCHMID-HEMPEL, P. Social immunity. **Current Biology**, 17, R693eR702. 2007.
- DELLA LUCIA T.M.C.; VILELA E.F. Métodos atuais de controle e perspectivas. In: As formigas cortadeiras. Ed. by **Folha de Viçosa**, Viçosa, Minas Gerais, p.163-190. 1993.
- DIEHL-FLEIG, E.; SILVA M.E.; VALIM-LABRES M.E.; SPECHT, A. Ocorrência natural de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. no Rio Grande do Sul. **Acta Biologica Leopoldensia**, v.14, p.99–104. 1992.

DORNELAS, A. S. P.; SARMENTO, R. A.; PEDRO-NETO, M.; SILVA, D.G.; SANTOS, G.R.; NASCIMENTO, M. O.; OLIVEIRA, C. A.; SOUZA, D. J. Susceptibility of *Atta sexdens* worker ants treated with the immunosuppressant Sandimmun Neoral to *Metarhizium anisopliae*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 52(2), 133-136. 2017.

Doi.org/10.1590/s0100204x2017000200008

DUSSUTOUR, A.; DENEUBOURG, J.-L.; BESHES, S.; FOURCASSIÉ, V. Individual and collective problem-solving in a foraging context in the leaf-cutting ant *Atta colombica*. **Animal Cognition**, 12, 21–30. 2009.

EVANS, H. C. Natural control of arthropods, with special reference to ants (Formicidae), by fungi in the tropical high forest of Ghana. **Journal of Applied Ecology**, v.11, p.37–49. 1974.

FORTI L.C.; PRETTO D.R.; GARCIA I.P. Aprimoramento de Metodologias Experimentais para Controle de Formigas Cortadeiras. **An do III Curso Atualização no Controle de Formigas Cortadeiras**, 14-23. 1994.

GOMIDES, C.H.F., DELLA LUCIA, T.M.C., ARAÚJO, F.S., MOREIRA, D.D.O. Velocidad de forrajeo y área foliar transportada por la hormiga *Acromyrmex subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae). **Revista de Biología Tropical**, 45: 1663-1667. 1997.

LEAL, I. R.; OLIVEIRA, P. S. Interactions between Fungus-Growing Ants (Attini), Fruits and Seeds in Cerrado Vegetation in Southeast Brazil. **Biotropica**, 30(2), 170-178. 1998.

LOPES, J.F.S; FORTI, L.C.; CAMARGO, R.S.; The influence of the scout upon the decision-making process of recruited workers in three *Acromyrmex* species. **Behav. Processes**, 67, 471-476. 2004.

LOPEZ, E.; ORDUZ, S. *Metarhizium anisopliae* and *Trichoderma viride* for control of nests of the fungus-growing ant, *Atta cephalotes*. **Biological Control**. 27, 194–200. 2003. doi:10.1016/S1049-9644(03)00005-7

LORETO, R.G.; HUGHES, D.P. Disease dynamics in ants: a critical review of the ecological relevance of using generalist fungi to study infections in insect societies. **Advances in Genetics**, v.94, p.287-306, DOI: 10.1016/bs.adgen.2015.12.005. 2016.

MARANGONI, A.; BOLZAN, A.; LIVIA, M. A. Extração de rotenona com fluido em estado supercrítico de *Derris elliptica* e *Tephrosia candida* em escala Industrial. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, 1(2), 15792-15799. Florianópolis-SC. 2015.

MARIN, N. O. **Alterações na dinâmica de colônias de *Atta sexdens rubropillosa* Forel, 1906 (Hymenoptera: Formicidae) submetidas ao tratamento com iscas tóxicas**. 60 f. Trabalho de conclusão de curso (licenciatura e bacharelado- Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências. Rio Claro-SP. 2014.

MONTOYA-LERMA, J.; GIRALDO-ECHEVERRIB, C.; ARMBRECHTA, I.; FARJI-BRENERC, A.; CALLEB, Z. Leaf-cutting ants revisited: Towards rational management and control. **International Journal of Pest Management**, London, v. 58, n. 3, p. 225–247, Jan. 2012.

RAMOS, V. M.; FORTI, L. C.; BOARETTO, M. A. C.; MOREIRA, A. A.; LOPES, J. F. S. Atratividade de iscas de polpa cítrica pulverizadas com extrato de capim jaraguá (*Hyparrhenia rufa nees*) para a formiga cortadeira de gramíneas *Atta capiguara*. **Pasturas Tropicales**, 28, 1-10. 2006.

RIBEIRO, M.M.R., AMARAL K.D., SEIDE V.E., SOUZA, B.M.R., DELLA LUCIA, T.M.C., KASUYA, M.C.M. & DE SOUZA, D.J. Diversity of fungi associated with *Atta bisphaerica* (Hymenoptera: Formicidae): the activity of *Aspergillus ochraceus* and *Beauveria bassiana*. **Psyche**, 1-6. 2012. doi:10.1155/2012/389806

ROCHA, S.L.; EVANS, H.C.; JORGE, V.L.; CARDOSO, L.A.O.; PEREIRA, F.S.T.; ROCHA, F.B.; BARRETO, R.W.; HART, A.G.; ELLIOT, S.L. Recognition of endophytic *Trichoderma* species by leaf-cutting ants and their potential in a Trojan-horse management strategy. **The Royal society publishing**. 1-14. 2017. doi.org/10.5061/dryad.0164h.

SAMSON, R.A.; E VANS, H.C.; LATGÉ, J.P. **Atlas of Entomopathogenic Fungi**. Berlin: Springer-Verlag. 1988.

SILVA, L. C. **Preparação e incorporação do substrato em *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: formicidae) e morfofuncionalidade mandibular em espécies de *Atta***. xii, 66 f. Dissertação. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu-SP. 2014.

TOLEDO, M. A. F. **Aspectos temporais da organização coletiva do forrageamento em formigas saúvas (*Atta sexdens rubropilosa*)**. 2013. 86 f. Dissertação. Curso de Ciências, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2013.

TRAVAGLINI, R.V.; FORTI, L.C.; ARNOSTI, A.; CAMARGO, R.S.; SILVA, L.C.; CAMARGO-MATHIAS, M.I. Mapping the Adhesion of Different Fungi to the External Integument of *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908). **International Journal of Agriculture Innovations and Research**. 5, 118-125. 2016.

TRAVAGLINI, R.V. **DETERMINAÇÃO DAS ESTRATÉGIAS COLETIVAS DE FORRAGEAMENTO EM *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera, Formicidae)**. ix, 83 f. Dissertação. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu-SP. 2014.

VIEIRA A.S.; MORGAN E.D.; DRIJFHOUT F.P.; CAMARGO-MATHIAS M.I. Chemical Composition of Metapleural Gland Secretions of Fungus-Growing and Non-Fungus-Growing Ants. **Journal of Chemical Ecology**, 38, 1289–1297. DOI 10.1007/s10886-012-0185-8. 2012.

WILSON, E.O. Chemical communication among workers of the fire ant *Solenopsis saevissima* (Fr. Smith). 1. The organization of mass-foraging. **Animal Behavior**, Bristol, v. 10, n. 1-2, p. 134-147. 1962.

ZARZUELA, M.F.M. UTILIZAÇÃO DE ENTOMOPATÓGENOS PARA O CONTROLE DE FORMIGAS. **Biológico**, São Paulo, v.69, suplemento 2, p.157-160. 2007.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Assume-se que os fungos entomopatogenicos são potenciais candidatos quando não há interação social, ou seja, apenas em casos isolados do contato deste com o hospedeiro, que mesmo apresentando o tegumento como barreira e comportamento de higiene não remove totalmente o patógeno quando aplicado em elevadas concentrações, bastando que um conídio viável colonize o corpo do hospedeiro para levá-lo a morte.

Quanto aos fungos antagonistas, parasitas do fungo simbiote, assume-se que quando as colônias estão saudas e as operárias ativas, estas são capazes de identificar o organismo indesejado e suprimir seu desenvolvimento de maneira química e física, removendo-o para a câmara de lixo.

A maneira de veicular o microorganismos ao interior das colônias, é um dos gargalos a serem estudado, sendo nossa metodologia um ponto de partida para o desenvolvimento de algo mais eficiente que as iscas apresentadas em trabalhos anteriores, permitindo neste caso que qualquer agente patogênico formulado em meio sólido, por exemplo: fungos nas formas de conídios ou blastosporos, bactérias em diferentes meios, entre outros, possam ser camuflados e transportados pelas próprias formigas cortadeiras ao interior do jardim de fungo simbiote, criando condições para que estes entrem em contato com os imaturos da colônia, carregados neste trabalho via cápsula atrativa. Salientando que nosso foco são as colônias iniciais de *Atta*, até um ano, cuja entrada de suprimento é única. Dando-nos a garantia de contaminação da principal câmara de fungo simbiote da colônia

Apesar de nossos esforços, não houve sucesso a suficiente para chegarmos aos testes a campo, mesmo sendo possível o estabelecimento de um controle microbiano, encontrando a dose que decline a colônia, através da eliminação do indivíduo (adulto ou imaturo), ou da contaminação de sua reserva alimentar, isso ainda não seria garantia para o estabelecimento de um produto comercial, visto que a análises de custo para obtenção destes microrganismos seria dispendiosa demais perante a existência dos químicos sintéticos, a alternativa talvez estivesse num inerte como o sal (NaCl) ou sílica com capacidade de desidratação do fungo simbiote e até mesmo das operárias que entrarem em contato, uma vez que este inseto possui pouca reserva hídrica.

No caso do controle microbiano com fungos entomopatogenicos este encontraria seu melhor momento de aplicação durante a revoada, pulverizado por atomizador durante o vôo

nupcial ou de forma inundativa no solo, visando o momento de escavação das rainhas recém copuladas, onde a aplicabilidade destas hipóteses de manejo hoje seria inviável, devido esta ocasião ser num único dia do ano, sendo sua previsão difícil e com pouca precisão, pois é regulada por fatores climáticos regionais. O advento de radares entomológicos pode vir a ser uma ferramenta útil neste sentido (DRAKE, 2012).

Durante dez anos aplicando parasitas em *A. octospinosus*, Kermarrec et al., (1986), concluíram que a vigilância/imunidade social e o altruísmo, seriam o principal gargalo para esse tipo de controle nesta praga. Uma série de fungos, dentre eles: *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *Trichoderma viridae* resultaram em fracasso quando testados em *Acromyrmex heyeri* com o objetivode controle (DELLA LUCIA, 1993).

Testes com nematóides também já foram condizidos sem sucesso (ZARZUELA, 2012), ou com mortalidade para apenas algumas espécies, porém atualmente existe a possibilidade de isolar as bactérias entomopatogenicas (DE PAULA et al., 2006), através do sobrenadante destas: *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, que contem metabólitos fungicidas (HAZIR et al., 2016), talvez o momento fosse o de retomar este caminho, visando bacterias para driblar as defesas morfológicas, mecânicas e bioquimicas das formigas cortadeiras, com alvo na contaminação do fungo simbiote (GONZAGA, 2012).

O cenário hoje nos permite vislumbrar perspectivas distintas das primeiras pesquisas realizadas na década passadas (DELLA LUCIA, 1993). O avanço de ferramentas de análises como os microscópios de forma geral (óptico, eletrônico de varredura e confocal), aliado ao maior conhecimento destes agentes patogênicos, podendo aqui ser indicados novos candidatos como *Escovopsis* (LACERDA et al., 2014, MASIULIONIS et al., 2015), algumas espécies de *trichodermas*, antagonista atualmente tido como promissor agente de controle (AUGUSTIN et al., 2013, DO NASCIMENTO et al., 2017), relatado em experimentos, inclusive os de analises sistemáticas de fungos do jardim de fungo simbiote (MONTROYA et al., 2016), que manifestam agrecivo desenvolvimento diante de estresses nas colônias, mesmo as mantidas por longo período em laboratório, mostrando que há possibilidade de se pensar numa ação conjunta entre microrganismos para o controle (LOPEZ; ORDUZ, 2003).

Uma vez que substancias são capazes de romper as barreiras das diferentes imunidades (individual e coletiva) (LOFGREN; VANDER MEER, 1986), a linha de pesquisa que busca desestruturar a organização de uma colônia através da imunossupressão, debilitando o sistema humoral desta praga geralmente aborda o uso de alguma droga, (GALVANHO et al., 2013,

BRITO et al., 2008), o que não descarta a sub dose de algum inseticida que auxiliaria na aplicabilidade controle biológico (MASCARIN; PAUL, 2010, SANTOS et al., 2007).

As associações com *Pseudonocardia*, *Streptomyces* e *Burkholderia* no tegumento, estariam como uma das barreiras a serem rompidas para o sucesso do controle microbiano, uma vez que estas secretam compostos, consequentemente defendendo o hospedeiro, pois ocupam o nicho que se instalaria o agente patogenico (CURRIE, 2001, CURRIE et al., 2006), associação passível de ser eliminada por um antibiótico (DORNELAS et al., 2017).

Estudos de sistemática demonstram alta diversidade de microorganismos presentes no jardim de fungo simbiote e no tegumento destas formigas (MIDDELHOVEN et al., 2003; MELO et al., 2014, VIEIRA et al., 2017), as quais ainda não se tem claro o papel nas complexas associações. O entendimento da interação cutícula do hospedeiro com o fungo é o que levará a um sucesso na aplicação a campo (ORTIZ-URQUIZA; KEYHANI, 2013, MUELLER et al., 2008, TRAVAGLINI et al., 2016), incluindo a elucidação no uso de adjuvantes (ALVES, 2002).

O leque de possibilidades é vasto, bem verdade que muitas dessas hipóteses não se confirmem, mas os testes seriam o primeiro passo para conclusões mais plausíveis, nosso trabalho recebe as mesmas críticas daqueles com extratos botânicos, pois se a formiga evoluiu neste ambiente, na presença destas plantas e microrganismos, talvez a dose não seja a única problemática para o sucesso destes controles, sendo necessário ampliar as bases do conhecimento antes de qualquer discussão, um assunto muito estudado foi a virulência (CASTILHO et al., 2010), porém pouco se produziu no que se diz respeito a forma de aplicação, que encontra inúmeras barreiras inclusive a capacidade das formigas de inibirem a ação destes agentes patogenicos por secreções salivares e o fluído fecal (RODRIGUES et al., 2008).

Fungos entomopatogenicos estariam como opções já bastante exploradas e de sucesso parcial, apenas em laboratório e sem maior eficiência que uma isca química, assume-se que é uma escolha do produtor a maneira de controle, após este avaliar as vantagens e desvantagens de cada tática, adequando a sua realidade. Atualmente a isca granulada atrativa de polpa cítrica a base de sulfluramida está como a opção mais racional, porém até mesmo esta pode apresentar rejeição por algumas colônias. As mudanças constantes nas legislações e no modo de consumo da população motivam os acadêmicos a anteciparem tais variações, gerando

resultados que levem esclarecimentos para a comunidade, mostrando o atual estado da arte, para que esta eleja como prefere conviver com as espécies pragas.

Existe sucesso do controle microbiano para alguns insetos pragas (Ex: *Cosmopolite sordidus*, *Mahanarva fimbriolata*, *Diaphorina citri* entre outros), mas não para os que apresentam comportamento social, caso das formigas cortadeiras, pragas de solo que além de um sistema de identificação de microrganismos apurado possuem a capacidade de secretar inúmeros compostos antimicrobianos por diferentes glândulas presentes ao longo do corpo (BILLEN, 2008; TRANTER; HUGUES, 2015, MENDONÇA et al., 2009), ficando o controle microbiano praticamente impossibilitado com os conhecimentos atuais, sendo assim, aguardamos o estabelecimento de novas formulações, novos agentes patogenicos e novos métodos de aplicação.

REFERENCIAS

- ALVES, S.B. **Controle microbiano de Insetos**. São Paulo, 1998, 1163p.
- ALVES, S.B.; R.M. PEREIRA. Produção de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) C ALVES, S.B. Fungos entomopatogenicos. In (Ed.) ALVES, S.B. **Controle microbiano de Insetos**. São Paulo, 1998, 1163p.
- ARAUJO, G. D.F.T. **INCREMENTO DA EFICIÊNCIA DE ISCAS DESTINADAS AO CONTROLE DA FORMIGA CORTADEIRA *Atta sexdens rubropilosa* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) MEDIANTE O USO DE EXTRATO DE GLÂNDULA DE VENENO E FARINHA FOLIAR DE GERGELIM**. Dissertação (Mestre em Produção Vegetal). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos Dos Goytacazes, 2011.
- ALVES, R. T.; BATEMAN, R. P.; GUNN, J.; PRIOR, C.; LEATHER, S. R. Effects of different formulations on viability and medium-term storage of *Metarhizium anisopliae* conidia. **Neotropical Entomology**, v. 31, n. 1, p. 91-99, 2002.
- AUGUSTIN JO, GROENEWALD JZ, NASCIMENTO RJ, MIZUBUTI ESG, BARRETO RW, ELLIOT SL, EVANS HC. Yet more “weeds” in the garden: fungal novelties from nests of leafcutting ants. **Plos One** 8:e82265. 2013. doi:10.1371/journal.pone. 0082265
- BAER, B.; P. SCHMID-HEMPEL. Bumblebee workers from different sire groups vary in susceptibility to parasite infection. **Ecol. Lett.** 6:106-110.2003.
- BILLEN, J. A importância das glândulas exócrinas na sociedade de insetos. **Insetos Sociais: Da biologia à aplicação**. Viçosa, Minas Gerais: Editora UFV, p. 442, 2008.
- BOZZOLA JJ, RUSSEL LD. **Electron microscopy: principles and techniques for biologists**. 2ª ed. Sudbury: MA Jones and Bartlett, 1999.
- BRANDÃO, C.R.F.; MAYHE´-NUNES, A.J.; SANHUDO, C.E.D. Taxonomia e filogenia das formigas cortadeiras. In: Della Lucia TMC (ed) **Formigas cortadeiras: da Bioecologia ao manejo**. 1st ed, UFV, Viçosa, pp 27–48. 2011.
- BRITO, E.S.; DE PAULA, A.R.; VIEIRA, L.P.; DOLINSKI, C.; SAMUELS, R.I. COMBINING. Vegetable oil and sub-lethal concentrations of Imidacloprid with *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against adult guava weevil *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae). **Biocontr. Sci. Tech.** 2008, 18, 665-673.
- BROOME, J.R.; SIKOROWSKI, P.P.; NORMENT, B.R. A mechanism of pathogenity of *Beauveria bassiana* on larvae of the imported fire ant, *Solenopsis richteri*. **Journal of invertebrate pathology**, 28, 87-91, 1976.
- CAMARGO RS; FORTI LC. What is the stimulus for the excavation of fungus chamber in leaf-cutting ants? **Acta Ethologica**. 2014.

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**, 8, 59; 2017. doi:10.3390/insects8020059

CARDOSO, S.R.S. **Morfogenese de ninhos iniciais de *Atta* spp. (Hymenoptera: Formicidae), mortalidade em condições naturais e avaliação da ação de fungo entomopatogênicos**. 2010. ix. 149f. Tese (doutorado)- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2010.

CASTILHO A.M.C., FRAGA M.E., AGUIAR-MENEZE E.L.; ROSA C.A.R. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* patogênicos a soldados de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa* em condições de laboratório. **Ciênc. Rural**, 40, 1243-1249. 2010.

CREMER, S.; ARMITAGE, S. A. O.; SCHMID-HEMPEL, P. Social immunity. **Current Biology**, 17, R693eR702. 2007.

CURRIE C.R. A community of ants, fungi, and bacteria: a multilateral approach to studying symbiosis. *Annu Rev Microbiol* 55:357–380. 2001.

CURRIE C.R.; POULSEN M.; MENDENHALL J.; BOOMSMA J.J.; BILLEN J. Coevolved crypts and exocrine glands support mutualistic bacteria in fungus-growing ants. **Science** 311:81–83. 2006. doi:10.1126/ science.1119744

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras – materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. Porto Alegre: **EDIPUCRS**, 2007. p. 60.

DELLA LUCIA T.M.C. **Formigas cortadeiras: da Bioecologia ao manejo**. 1st ed, UFV, Viçosa, pp 27–48. 2011.

DELLA LÚCIA, T.C. **As formigas cortadeiras**. Viçosa: Sociedade de investigações florestais. 1993, 262p.

DE PAULA, A.R.; VIEIRA, L.P.P.; DÁTTILO, W.F.C.; CARNEIRO, C.N.B.; ERTHAL, M., JR.; BRITO, E.S.; SILVA, C.P.P.; SAMUELS, R.I. Patogenicidade e efeito comportamental de *Photorhabdus temperata* K122 nas formigas cortadeiras *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae). **O Biológico**. 68, 311–413, 2006.

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. **Ciência e Cultura**, v.40, n.11,p. 1103-1105, 1988.

DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M.E. Development of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. in culture containing *Hovenia dulcis* extracts. **Acta Biologica Leopoldensia**, São Leopoldo, v. 14, n.2, p. 15-22, 1992.

- DO NASCIMENTO M.O.; DE ALMEIDA SARMENTO, R.; DOS SANTOS, G.R.; DE OLIVEIRA, C.A.; DE SOUZA D.J. Antagonism of *Trichoderma* isolates against *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller **J Basic Microbiol.** 57(8):699-704. 2017. doi: 10.1002/jobm.201600755.
- DO NASCIMENTO, R. R.; SCHOETERS, E.; MORGAN, E. D.; BILLEN, J.; STRADLING, D. J. Chemistry of metapleural gland secretions of three attine ants, *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta cephalotes*, and *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of chemical ecology**, 22(5), 987-1000.1996.
- DORIA FILHO, U. **Introdução à bioestatística**. São Paulo: Negócio, 1999.
- DORNELAS, A. S. P.; SARMENTO, R. A.; PEDRO-NETO, M.; SILVA, D.G.; SANTOS, G.R.; NASCIMENTO, M. O.; OLIVEIRA, C. A.; SOUZA, D. J. Susceptibility of *Atta sexdens* worker ants treated with the immunosuppressant Sandimmun Neoral to *Metarhizium anisopliae*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 52(2), 133-136. 2017. Doi.org/10.1590/s0100204x2017000200008
- DRAKE, V. A. - Radar Entomology – CABI, 489 pp. 2012.
- FORTI, L.C.; DELLA LÚCIA, T.M.C.; YASSU, W.K.; BENTO, J.M.; PINHÃO, M.A. Metodologia para experimentos com isca granulada para formigas cortadeiras. In: (Ed.) **As formigas cortadeiras**. 264 p. 1993.
- GALVANHO, J.P.; CARRERA, M.P.; MOREIRA, D.D.O.; ERTHAL, M.; SILVA, C.P.; SAMUELS, R.I. Imidacloprid inhibits behavioral defences of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus* subterraneus (Hymenoptera: Formicidae). **J. Insect. Behav.** 26, 1-13. 2013.
- GARTNER, P.; HIATT, L. **Tratado de histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
- GONZAGA, A. D. Antagonismo de bactérias endofíticas de plantas da Amazônia contra o jardim de fungos associados a formigas cortadeiras *Atta sexdens* Hymenoptera (Formicidae: Attini). Tese (Doutorado em Biotecnologia), Centro de Apoio a Pesquisa (CAM), Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 2012.
- HAZIR, S.; SHAPIRO-ILAN, D. I.; BOCK, C. H.; HAZIR, C.; LEITE, L. G.; HOTCHKISS, M. W. Relative potency of culture supernatants of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp. on growth of some fungal phytopathogens. **European journal of plant pathology**, 146 (2), 369-381. 2016.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants**. Cambridge, Mass.: Harvard University Press. 1990.
- HOLLDOBLER, B., WILSON, E.O., **The Super-organism: The Beauty, Elegance, and Strangeness of Insect Societies**, 1st ed. W. W. Norton & Co. 2009.
- 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 Lond B** 269: 1811-1819. 2002.

HUGHES, W.O.H.; THOMSEN, L.; EILENBERG, J.; BOOMSMA, J.J. Diversity of entomopathogenic fungi near leaf-cutting ant nest in a neotropical forest, with particular reference to *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae*. **J. Invert. Pathol.**, v. 85, p. 46-53, 2004.

HUGHES, W.O.H.; BOOMSMA, J.J. Let your enemy do the work: within-host interactions between two fungal parasites of leaf-cutting ants. **Proc. R. Soc. B.** v.271, p104-106, 2003.

HUGUES WOH.; PETERSEN, K.S.; UGELVIG, V.L., PETERSEN, D., THOMSEN, L., POULSEN, M., BOOMSMA, J. Density-dependence and within-hosp competition in a semelparous parasite of leaf-cutting ants. **BMC Evolutionary Biology**, 4:45,p 1-12, 2004.

HUGUES, W.O.H.; BOOMSMA, J.J. Genetic diversity and disease resistance in leaf-cutting ant societies. **Evolution** 58: 1251-1260. 2004.

JACCOUD, D.B.; HUGHES, W.O.H.; JACKSON, C.W. The epizootiology of a *Metarhizium* infection in mini-nest of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Ent. Exp. Appl.** V. 93, p. 51-61, 1999.

JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. Livraria Editora Santos, São Paulo, pp. 48-81. 1983.

KERMARREC, A.; FEBUAY, G.; DECHARME, M. Protection of leaf-cutting ants from biohazards: Is there a future for microbiological control? In: LOFGREN, C.S. & VANDER MEER, R.K. (Eds.) *Fire ants and leaf-cutting ants: biology and management*. Westview studies in insect biology. P.339-56. 1986.

LACERDA, F. G.; DELLA LUCIA, T. M. C.; DESOUSA, O.; PEREIRA, O. L.; KASUYA, M. C. M.; DE SOUZA, L. M.; DE SOUZA, D. J. Social interactions between fungus garden and external workers of *Atta sexdens* (Linnaeus) (Hymenoptera: Formicidae). **Italian journal of zoology**, 81(2), 298-303. 2014.

LEAL, S.C.M.; BERTIOLO, D.J; BUTT, T.M.; CARDER, T.H.; BURROWS, P.R.; PEBERDY, J.F. Application and restriction endonucleases digestion of the Pr1 Gene for the detection and characterization of *Metarhizium anisopliae* strains. **Mycol. Res.** 101, p. 257-265, 1997.

LOFGREN CS, VANDER MEER RK **Fire ants and leaf-cutting ants: biology and management**. Westview Press, Boulder, CO. 1986.

LOPES, J.F.; HUGHES, W.O.H.; CAMARGO, R.S.; FORTI, L.C. Larva isolation and brood care in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. **Insectes Sociaux**, v.52, p.333-338, 2005.

LOPES, J.F.S; FORTI, L.C.; CAMARGO, R.S.; The influence of the scout upon the decision-making process of recruited workers in three *Acromyrmex* species. **Behav. Processes**, 67, 471-476. 2004.

LOPEZ, E., ORDUZ, S. *Metarhizium anisopliae* and *Trichoderma viridae* for control of nest of the fungus-growing ant, *Atta cephalotes*. **Biological control**, v. 27, p. 194-200, 2003.

LOUREIRO, E.S.; MONTEIRO, A.C. Patogenicidade de três fungos entomopatogênicos a soldados de *Atta sexdens* (Linnaeus, 1758) (HYMENOPTERA: FORMICIDAE). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 29, n. 4, p. 553-561, 2004.

MACHADO, V.; DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M.E.; LUCCHESI, M.E.P. Reações observadas em colônias de algumas espécies de *Acromyrmex* (Hymenoptera-Formicidae) quando inoculada com fungos entomopatogênicos. **Ciência e Cultura**. v. 40, n. 11, p. 1106-1108, 1998.

MARICONI, F. A. M. (1970) **As saúvas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 167p.

MASCARIN, G. M.; PAULI, G. Bioprodutos à base de fungos entomopatogênicos. In: Madelaine Venzon; Trazilbo José de Paula Júnior; Angelo Pallini. (Org.). **Controle alternativo de pragas e doenças na agricultura orgânica**. Viçosa: U.R. EPAMIG ZM, v. 4, p. 169-195, 2010.

MASIULIONIS, V.E.; CABELLO, M.N.; SEIFERT, K.A; RODRIGUES, A.; PAGNOCCA FC. *Escovopsis trichodermoides* sp. nov., isolated from a nest of the lower attine ant *Mycocepurus goeldii*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 107, 731–740. 2015. doi:10.1007/s10482-014-0367-1.

MEIRELLES, L.A.; SOLOMON, S.E.; BACCI, M.; WRIGHT, A.M.; MUELLER, U.G.; RODRIGUES, A. Shared *Escovopsis* parasites between leaf-cutting and non-leaf-cutting ants in the higher attine fungus-growing ant symbiosis. **R Soc Open Sci** 2:150257. 2015. doi:10.1098/rsos.150257

MELO, W.G.; ARCURI, S.L.; RODRIGUES, A.; MORAIS, P.B.; MEIRELLES, L.A. *Starmerella acetii* f.a., sp. nov., an ascomycetous yeast species isolated from fungus garden of the leafcutter ant *Acromyrmex balzani*. **Int J Syst Evol Microbiol** 64:1428–1433. 2014. doi:10.1099/ijms.0.058818-0

MENDONÇA A.D.L; DA SILVA, C.E.; DE MESQUITA, F.L.T.; CAMPOS, R.D.S.; NASCIMENTO, R.R.; SANT'ANA, A.E.G. Antimicrobial activities of components of the glandular secretions of leaf cutting ants of the genus *Atta*. **Antonie Van Leeuwenhoek**. 95: 295–303. 2009.

MONTOYA, Q. V.; MEIRELLES, L. A.; CHAVERRI, P.; RODRIGUES, A. Unraveling *Trichoderma* species in the attine ant environment: description of three new taxa. **Antonie van Leeuwenhoek**, 109(5), 633-651. 2016.

MONTOYA-LERMA J.; GIRALDO-ECHEVERRI C.; ARMBRECHT I., FARJI-BRENER A.; CALLE Z. Leaf-cutting ants revisited: Towards rational management and control. **Int J Pest Manag**, 58, 225–247. 2012. DOI:10.1080/09670874.2012.663946

MUELLER, U. G.; DASH, D.; RABELING, C.; RODRIGUES, A. Coevolution between attine ants and actinomycete bacteria: a reevaluation. **Evolution**, 62 (11), 2894-2912. 2008.

OI, D.H.; BRIANO J.A.; VALLESA S.M.; WILLIAMS D.F. Transmission of *Vairimorpha invictae* (Microsporidia: Burenellidae) infections between red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae) colonies. **J Invertebr Pathol**, 88, 108–115. 2005. doi:10.1016/j.jip.2004.11.006

ORTIZ-URQUIZA, A.; KEYHANI, N. O. Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. **Insects**, 4(3), 357–374. 2013.

PALMER, K.A.; OLDROYD, B.P. Evidence for intra-colonial genetic variance in resistance to American foulbrood of honey bees (*Apis mellifera*): further support for the parasite/pathogen hypothesis for the evolution of polyandry. **Naturwissenschaften** 90: 265–268. 2003.

PEREIRA, J.C.R. **Bioestatística em outras palavras**. São Paulo: Editora da universidade de São Paulo, Fapesp, 2010. 424p.

RODRIGUES, A.; CABLE, R.N.; MUELLER, U.G.; BACCI, M.; PAGNOCCA, F.C. Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungi garden pathogens of leaf-cutting ants. **Antonie Van Leeuwenhoek** 96:331–342. 2009. doi:10.1007/s10482-009-9350-7

RODRIGUES, A.; CARLETTI, C.D.; BUENO, O.C.; PAGNOCCA, F.C. Leaf-cutting ant faecal fluid and mandibular gland secretion: Effects on microfungi spore germination. **Braz J Microbiol** 39: 64–67. 2008.

RODRIGUES, A.; MUELLER, U.G.; ISHAK, H.D.; BACCI, M.; PAGNOCCA, F.C. Ecology of microfungi communities in gardens of fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae): A yearlong survey of three species of attine ants in Central Texas. **FEMS Microbiol Ecol** 78:244–255. 2011. doi:10.1111/j.1574- 6941.2011.01152.x

RODRIGUES, A.; PASSARINI, M.R.Z.; FERRO, M.; NAGAMOTO, N.S.; FORTI, L.C.; BACCI, M.; SETTE, L.D.; PAGNOCCA, F.C. (2014) Fungal communities in the garden chamber soils of leaf-cutting ants. **J Basic Microbiol** 54:1186–1196. doi:10.1002/jobm.201200458

SANTOS, A. V.; DE OLIVEIRA, B.L.; SAMUELS, R.I. Selection of entomopathogenic fungi for use in combination with sub-lethal doses of imidacloprid: perspectives for the control of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). **Mycopathologia**, 163, p.233–240, 2007.

SCHNEIDER, M.O. **Comportamento de cuidado com a prole da saúva-limão *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae)**. 2003. 80 f. Dissertação. Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro-SP. 2003.

SILVA, C.C.A. Aspectos do sistema imunológico dos insetos. **Biotechnologia cienc desenvolv.** 24, 68–72. 2002.

SILVA, M.E.; DIEHL-FLEIG, E. Avaliação de diferentes linhagens de fungos entomopatogênicos para controle da formiga *Atta sexdens piriventris* (Santschi, 1919) (Hymenoptera: Formicidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.17, n.2, p.263–269, 1988.

SOSA-CALVO, J.; SCHULTZ, T.R.; BRANDÃO, C.R.F.; KLINGENBERG, C.; FEITOSA, R.M.; RABELING, C.; BACCI, M.; LOPES, C.T.; VASCONCELOS, H.L. *Cyatta abscondita*: Taxonomy, evolution, and natural history of a new fungus-farming ant genus from Brazil. 2013.

SPECTH, A.; DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M.E. Atratividade de isca de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill a formigas do gênero *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). **Anais da sociedade Entomologica do Brasil**, Londrina, v. 23, n 1, p.99-104, 1994.

TAMAI, M.A.; ALVES, S.B.; LOPES, R. B.; FAION, M; PADULLA, L.F.L. Toxicidade de produtos sanitários para *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.69, n.3,p.89-96, 2002.

TRANTER, C.; HUGHES, W. O. H. Acid, silk and grooming: alternative strategies in social immunity in ants?. **Behavioral ecology and sociobiology**, v. 69, n. 10, p. 1687-1699, 2015.

TRAVAGLINI R.V.; FORTI L.C.; ARNOSTI A.; CAMARGO R.S.; SILVA L.C.; CAMARGO-MATHIAS M.I. Mapping the Adhesion of Different Fungi to the External Integument of *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908). **Int J Agric Innov Res**, 5, 118-125. 2016.

VALENCIA-GIRALDO, S.M. EFECTO DE MICROORGANISMOS ENTOMOPATÓGENOS Y ANTAGÓNICOS COMO POTENCIALES AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO DE HORMIGA ARRIERA *Atta cephalotes* (HYMENOPTERA: MYRMICINAE). 116f. Trabajo de Investigación, Magister en Ciencias-UNIVERSIDAD DEL VALLE, Melendez, 2014.

VIEIRA, A. S.; RAMALHO, M. O.; MARTINS, C.; MARTINS, V. G.; BUENO, O. C. Microbial Communities in Different Tissues of *Atta sexdens rubropilosa* Leaf-cutting Ants. **Current Microbiology**, 1-10. 2017.

WALKER, T.; HUGHES, W.O.H. Adaptive social immunity in leaf-cutting ants. **Biol Lett**. 5:446-448. 2009.

WEBER, N. A. **The Attines: The fungus-culturing ants**. American Scientist, 60, 448-456. 1972.

WHEELER, W.M. The Queen Ant as a Psychological Study. **Popular Science Monthly**, 68, 291-299.1906.

WILCKEN, C.F.; BERTI FILHO, E. Controle biológico de formigas cortadeiras. **Anais do III Curso de Atualização no controle de Formigas cortadeiras**. PCMIP/IPEF: p.1-5, 1994.

WILSON, E.O. **The insect societies**. Cambridge: Belknap Press, 1971.

ZARZUELA, M. F. M. D.; LEITE, L. G.; MARCONDES, J. E.; CAMPOS, A. E. D. C. Entomopathogens isolated from invasive ants and tests of their pathogenicity. **Psyche: A Journal of Entomology**, 2012.

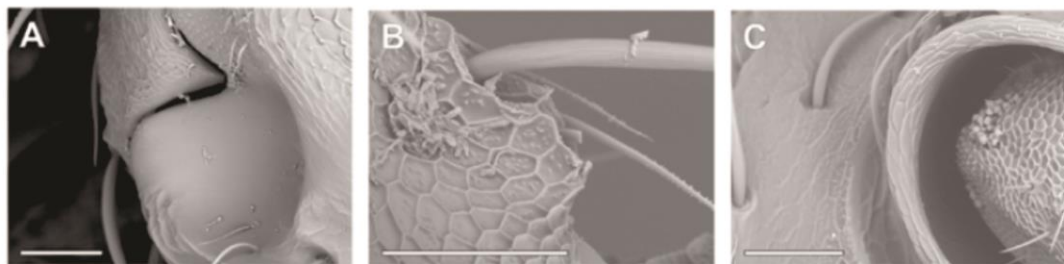
ANEXO: A – Jornal do engenheiro agrônomo (capa).



ANEXO: A – Jornal do engenheiro agrônomo (texto).

Controle Biológico

O uso de fungos entomopatogênicos para o controle de formigas cortadeiras



A- *B. bassiana* aderido nas peças bucais
Barra A-C: 50µm

B- *M. anisopliae* aderido no abdômen

C- *A. flavus* aderido no bulbo antenal

Formigas cortadeiras são consideradas pragas de lavouras, pastagens e de florestas plantadas, visto serem agentes desfolhadores, comprometendo sobremaneira o desenvolvimento das plantas atacadas.

Atualmente, o uso de iscas granuladas tem sido a maneira mais eficaz, além daquela recomendada para se realizar o controle desses insetos, visto haver a possibilidade de se dosar o produto que está sendo aplicado e este ser comercializado na forma de micro-porta-iscas, promovendo uma redução nas chances de intoxicação dos organismos não alvos. Como a sustentabilidade é uma busca constante nos dias de hoje, principalmente quando se refere ao controle de pragas da agricultura, as estratégias alternativas são sempre bem-vindas.

Apesar da ação comprovada dos agentes naturais, estes ainda necessitam de um tempo maior para agir, principalmente quando se compara com os produtos químicos sintéticos largamente disponíveis no mercado, uma vez que aquele natural, no caso do controle realizado por fungos entomopatogênicos, depende do desenvolvimento do micro-organismo no hospedeiro. Estes têm se mostrado muito eficientes nos experimentos desenvolvidos em laboratório, fato que é comprovado pela publicação de resultados oriundos de diversos estudos, os quais relatam a ocorrência de alta mortalidade de formigas expostas principalmente aos fungos: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumoso-rosea*, entre outros que muitas vezes são denominados de facultativos, como é o caso do *Aspergillus flavus*.

Como exemplo dos estudos que vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de se encontrar novas estratégias de controle de insetos praga que sejam ao mesmo tempo eficientes e sustentáveis, pode ser citado o trabalho de doutorado que se encontra em andamento no Laboratório de Insetos Sociais-Praga (LISP) da Fazenda Lageado (FCA/Unesp Botucatu), sob a orientação do Prof. Dr. Luiz Carlos Forti em parceria com o Brazilian Central of Studies on Ticks Morphology" (BCSTM)- Unesp Rio Claro, cuja co-

orientação está sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Izabel Camargo-Mathias. Busca-se trazer à luz conhecimentos básicos que possam auxiliar no entendimento da dinâmica da adesão e do processo de germinação dos conídios de três espécies de fungos, fazendo uso de ferramentas de microscopia de luz de campo claro, bem como da eletrônica de varredura (Figura acima), no sentido de mapear as regiões do corpo do inseto que sejam mais suscetíveis para receber os conídios, conhecimento esse que, posteriormente, será importante para auxiliar no desenvolvimento de uma nova geração de iscas ou armadilhas.

Nesse estudo ficou caracterizado que o fungo *B. bassiana* tem preferência por aderir principalmente na região oral da formiga (peças bucais), enquanto *M. anisopliae* prefere o tegumento da região do abdômen das operárias. No caso de *A. flavus*, tem-se observado que existe uma preferência para deposição dos conídios na região do bulbo antenal, muito embora ainda não tenham sido observados processos de germinação, provavelmente devido ao constante comportamento de higienização realizado pelas formigas, o que caracteriza a presença de uma barreira de eficiência nesse tipo de controle.

Assim, o desenvolvimento de estudos que tenham como foco principal a busca por estratégias de controle geram informações importantes que, certamente, serão utilizadas para a construção de produtos que possam futuramente ser utilizados no campo.

Autores:

1 - MS. Raphael Vacchi Travagliini – doutorando do Programa de Proteção de Plantas Unesp/Campus de Botucatu-SP, Bolsista Capes

2 - Dr. André Arnosti – pós-doutorando no BCSTM do IB/Unesp/Campus de Rio Claro, SP. Projeto Fapesp n. 2014/19240-4

3 - Prof. Dr. Luiz Carlos Forti – Prof. adjunto do Depto. de Proteção de Plantas da Unesp/Campus de Botucatu-SP

4 - Profa. Dra. Maria Izabel Camargo-Mathias – Profa. titular do Depto. de Biologia do Instituto de Biociências da Unesp/Campus Rio Claro-SP

