UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

MORFOGÊNESE DE NINHOS INICIAIS DE *Atta* spp. (HYMENOPTERA: FORMICIDAE), MORTALIDADE EM CONDIÇÕES NATURAIS E AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

SANDRA REGINA DE SOUSA CARDOSO

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU – SP
Dezembro – 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

MORFORGÊNESE DE NINHOS INICIAIS DE *Atta* spp. (HYMENOPTERA: FORMICIDAE), MORTALIDADE EM CONDIÇÕES NATURAIS E AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

SANDRA REGINA DE SOUSA CARDOSO
(Bióloga)

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Forti

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP– Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Proteção de Plantas).

BOTUCATU – SP
Dezembro – 2010

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

C268m

Cardoso, Sandra Regina de Sousa, 1973-
Morfogênese de ninhos iniciais de Atta spp. (Hymenoptera: Formicidae), mortalidade em condições naturais e avaliação da ação de fungos entomopatogênicos / Sandra Regina Sousa Cardoso. - Botucatu : [s.n.], 2010.
ix, 149 f. : gráfs. color., tabs., fots. color.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2010
Orientador: Luiz Carlos Forti
Inclui bibliografia.

1. Formiga cortadeira. 2. Ninho inicial. 3. Sobrevivência. 4. Patogenicidade. I. Forti, Luiz Carlos. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas. III. Título.

Janaína Celoto Guerrero - Bibliotecária CRB-8 6456

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO "MORFOGÊNESE DE NINHOS INICIAIS, MORTALIDADE DE Atta spp. (Hymenoptera, Formicidae) EM CONDIÇÕES NATURAIS E AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS"

ALUNA: SANDRA REGINA DE SOUSA CARDOSO

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ CARLOS FORTI

Aprovado pela Comissão Examinadora

PROF. DR. LUIZ CARLOS FORTI

PROF. DR. CARLOS FREDERICO WILCKEN

PROFª DRª ANA PAULA PROTTI DE ANDRADE CRUSCIOL

PROFª DRª ALDENISE ALVES MOREIRA

DRª SANDRA VERZA DA SILVA

“***Humilhai-vos, pois, debaixo da poderosa mão de Deus,***
para que, Ele vos exalte no tempo oportuno.
Confiai-lhe todas as vossas preocupações,
porque Ele tem cuidado de vós”
I Pedro 5, 6-7

OFEREÇO

À DEUS, Por TUDO!!!!!

Aos meus pais, Lucas Alves Cardoso
e Maria de Lourdes de Sousa Cardoso,
pelo Amor e dedicação em todos os momentos da minha vida

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo Dom da vida e por todas as Vitórias!!!

À minha família, pelo amor e apóio constante (Pais: Lucas e Lourdes, Irmãos: José Wilson, Geanete, Geane, Celeste, Célia, Selma e Josenilda, sobrinhos: Larisse, Kerlânio, Laise, Kerlman, João Victor, Kerline, Paulo Nixon, João Pedro, Maria Helena, Lucas e João Gabriel);

Ao professor Dr. Luiz Carlos Forti, pela oportunidade e orientação; por cada sim e cada não, que tanto me ensinaram; por seu exemplo de paixão e dedicação ao conhecimento das formigas cortadeiras;

A Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, juntamente com a coordenação do curso de Agronomia - Proteção de Plantas, pela oportunidade de realização do curso;

Ao grupo de Oração Divina Misericórdia, por ser fonte de sustento na caminhada;

À Hermeson dos Santos Vitorino, pela presença, amizade, companheirismo e *valiosa contribuição a este trabalho. O meu carinho e sincero agradecimento;*

Ao Governo do Estado do Maranhão, pelo incentivo e apóio aos meus estudos;

À FAPEMA (Fundação de Amparo ao Desenvolvimento e Pesquisa do Estado do Maranhão), pela concessão de bolsa de auxílio ao curso;

À FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio à pesquisa.

Ao professor Dr. Carlos Frederico Wilcken, pela oportunidade, atenção e disponibilidade, fundamentais ao desenvolvimento deste trabalho;

Meu agradecimento especial a Nilson Satoru Nagamoto pela co-autoria no capítulo 5, pelas inúmeros contribuições e pela amizade. A minha gratidão.

Aos demais pesquisadores que colaboraram na realização deste trabalho: Dr. André Rodrigues, pela identificação dos fungos e inúmeras contribuições, Dr. Roberto Camargo pelas sugestões e parte do material bibliográfico, Dra. Liciana Vaz de Arruda Silveria, pelas análises de Regressão Logística, Dr. Edson Luiz Furtado pelas sugestões; Dr. Antonio Carlos Maringoni, *Dra. Ana Paula Protti de Andrade, Dra. Maria Helena, Dra. Marly e Dra. Fernanda Ludwing pelas contribuições;*

Ao departamento de Ciências Ambientais pelos dados climatológicos da Estação Agrometeorológica da FCA;

À Donizette, pelo valioso e fundamental trabalho de escavação dos ninhos, início e base desta pesquisa;

À Efrain Santana e Natália Medeiros pelo auxílio nos trabalhos de campo e laboratório;

À Mário Pogetto pelas valiosas contribuições, especialmente pelo auxílio em parte das análises estatísticas;

À Neide Aoky, pelo acolhimento, disponibilidade, gratuidade, profissionalismo, incentivo e amizade, fundamentais à finalização deste trabalho. O meu muito obrigada!

Aos amigos e pesquisadores, Professora Dra. Raimunda Nonata Santos de Lemos, Paulo Henrique Soares e Lúcia da Silva Fontes, pelo incentivo;

À Antonio José de Almeida Filho (in memorium) pelo carinho, amizade e por despertar em mim a paixão pelo mundo dos insetos;

Aos colegas do LISP, Satoru, Roberto, Sandra Verza, Ricardo, Ana Paula, Rafael, Amanda, Sinara, Nádia, Mariana e Marcílio, pelas contribuições nas diferentes fases de execução deste trabalho;

Aos colegas do Laboratório de Patologia Florestal, Martha Passador, Cristiane de Pieree Juan Fernan pela colaboração;

Aos colegas do Laboratório de Fungos de Solo, Haroldo Antunes das Chagas e Ana Carolina Firmino, por todo auxílio e contribuições;

Aos docentes e funcionários do Departamento de Produção Vegetal/ Defesa Fitossanitária pela contribuição direta e indireta na realização deste trabalho, especialmente Maria do Carmo, Fátima e Domingos.

Ao Silvinho do Laboratório de fotografia da Unesp, pela produção de parte das fotos aqui apresentadas;

Aos funcionários da sessão de Pós-graduação e da Biblioteca da FCA, pelo excelente atendimento e profissionalismo;

À "Maria Elda", pelo companheirismo e alegre presença em minha vida;

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

		Pag.
	RESUMO	01
	SUMMARY	02
1	INTRODUÇÃO	03
2	REVISÃO DE LITERATURA	05
	2.1 Revoada e fundação de ninhos em formigas cortadeiras	05
	2.2 Arquitetura e escavação de ninhos de *Atta* Fabricius	07
	2.3 Importância e controle de formigas cortadeira	09
	2.4 Perspectiva de controle biológico de formigas cortadeiras	10
CAPÍTULOS		12
	I - MORFOGÊNESE DE NINHOS INICIAIS DE *Atta bisphaerica* E *Atta sexdens rubropilosa* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)	12
1	Introdução	14
2	Material e Métodos	16
	2.1 Caracterização da área experimental	16
	2.2 Seleção e escavação dos ninhos	17
	2.3 Arquitetura interna	18
	2.4 Análises estatísticas	18
3	Resultados	19
	3.1 Arquitetura interna	19
	3.1.1 Formato da câmara inicial de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa*	19
	3.1.2 Medidas da câmara recém-fundada de *A. bisphaerica* e *A. sexdens rubropilosa* em função do ano de estudo	21
	3.1.3 Medidas da câmara em função do tempo de fundação	25
	3.1.3.1. Análise de Correlação de Pearson entre as medidas da câmara de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa*, em função do tempo de fundação	29
	3.1.3.2. Comparação entre as medidas da câmara inicial de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa*, em função do tempo de fundação, ano 2007	31
	3.2 Período e percentual de escavação da segunda câmara	33
	3.2.1 *Atta bisphaerica*	33
	3.2.2 Atta sexdens rubropilosa	35
4	Discussão	37
5	Conclusões	40

II - MORTALIDADE DE RAINHAS DE *Atta bisphaerica* E *Atta sexdens rubropilosa* DURANTE OS PRIMEIROS MESES DE FUNDAÇÃO DO NINHO 41
1 Introdução 43
2 Material e Métodos 45
2.1 Caracterização da área experimental 45
2.2 Marcação e escavação dos ninhos 45
2.3 Avaliação da sobrevivência de colônias em campo, sem escavação 46
2.4 Fatores ambientais possivelmente relacionados à mortalidade da rainha ... 46
2.4.1 Fatores bióticos 46
2.4.2 Fatores abióticos 47
2.4.2.1 Precipitação, temperatura e umidade atmosférica 47
2.4.2.2 Temperatura e umidade do solo 47
2.5 Análises estatísticas 48
3 Resultados 48
3.1 Mortalidade de rainhas de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa* em ninhos recém-fundados 48
3.1.1 *Atta bisphaerica* 48
3.1.2 *Atta sexdens rubropilosa* 51
3.1.3 Comparação entre a mortalidade de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa* 54
3.2 Avaliação da sobrevivência de colônias em campo, sem escavação 58
3.3 Fatores bióticos possivelmente relacionados à mortalidade da rainha 59
3.4 Fatores abióticos possivelmente relacionados à mortalidade da rainha 61
3.4.1 Precipitação, temperatura, umidade atmosférica 61
3.4.2 Temperatura e umidade do solo 66
4 Discussão 70
5 Conclusões 75
III - CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS DE OCORRÊNCIA NATURAL EM FÊMEAS REPRODUTORAS DE *Atta* spp. 76
1 Introdução 78
2 Material e Métodos 80
2.1 Coleta de rainhas para isolamento de fungos 80
2.2 Isolamento e identificação dos fungos 80
2.3 Preservação e manutenção dos fungos 81
2.4 Caracterização dos isolados 81
2.4.1 Número e tamanho dos conídios 81
2.4.2 Viabilidade dos conídios 82
2.4.3 Crescimento micelial da colônia 82
2.5 Análises estatística 83
3 Resultados e discussão 83
3.1 Caracterização dos isolados 83
3.1.1 Aspecto geral da colônia e conídios 83

3.1.2 Número, tamanho e viabilidade dos conídios 85
3.1.3 Crescimento micelial 86
3.1.4 Comparação entre crescimento micelial dos isolados..... 89
4 Conclusões..... 93
IV - PATOGENICIDADE DE FUNGOS EM OPERÁRIAS DE *Atta sexdens rubropilosa* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) 94
1 Introdução 96
2 Material e Métodos 97
2.1 Procedência do isolado 98
2.2 Avaliação de Patogenicidade..... 98
2.3 Preparação das suspensões de fungos 98
2.4 Inoculação em operárias 99
2.5 Análises estatísticas 100
3 Resultados e discussão..... 100
3.1 Patogenicidade dos isolados de *Beauveria bassiana, Paecilomyces lilacinus, Isaria fumosoroseus e Aspergillus flavus*, em operárias de *Atta sexdens rubropilosa* 100
3.2 Valores de TL^{50} de operárias inoculadas com diferentes isolados de fungos 104
3.3 Potencial patogênico dos isolados entre os experimentos I e II 109
4 Conclusões 112
V - EFEITO DE ISCAS GRANULADAS FORMULADAS COM FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS EM COLÔNIAS DE *Atta sexdens rubropilosa* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) 113
1 Introdução 115
2 Material e Métodos 117
2.1 Formulação de iscas com fungos 117
2.2 Experimento I 118
2.3 Experimentos II 120
2.4 Carregamento de iscas 120
2.5 Incorporação, devolução e rejeição de iscas 120
2.6 Número de operárias mortas em função do tempo de aplicação 121
2.7 Analises estatísticas 121
3 Resultados 121
3.1 Carregamento de iscas 121
3.2 Incorporação, devolução e rejeição de iscas 124
3.3 Número de operárias mortas em função do tempo de aplicação 125
4 Discussão 131
5 Conclusões 134
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 135
APÊNDICE.....

RESUMO

As formigas cortadeiras são consideradas pragas importantes para diversas plantas cultivadas, o que exige constante controle. No entanto, a mortalidade natural de colônias iniciais de *Atta* spp é alta, alcançando até 100%, no primeiro ano de fundação. Dentre vários fatores os micro-organismos patógenos são apontados como um dos responsáveis por tal mortalidade. Assim, o presente estudo teve como objetivo: (1) estudar a morfogênese dos ninhos iniciais em função do tempo de fundação essas espécies; (2) avaliar a taxa de mortalidade de rainhas de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa*, durante os primeiros meses de fundação; (3) isolamento e caracterização dos fungos entomopatogênicos de ocorrência natural em rainhas; (4) realizar bioensaios para avaliar a patogenicidade desses isolados em operárias de *Atta sexdens rubropilosa* e (5) formulação e aplicação de iscas à base de isolados de fungos entomopatogênicos, em colônias de *Atta sexdens rubropilosa*, visando possibilidades de aplicação prática. Para tal, foram coletadas rainhas recém-fecundadas ou provenientes de escavações dos ninhos incipientes marcados no período da revoada. As escavações ocorreram aos 20, 45, 90, 135, 180 e 225 dias de idade do ninho em 2007, e aos 20, 45 e 90 dias em 2008, e aos 60 dias em 2009. Foram obtidos os seguintes resultados: (1) as dimensões da câmara-recém fundada aumentam com o tempo de fundação; (2) altas taxas de mortalidade para *A. bisphaerica* e *A. sexdens rubropilosa*; (3) rainhas de *Atta* spp. podem ser parasitadas por diversos fungos, dentre eles *Beauveria bassiana*, *Isaria lilacinus*, *Isaria fumosorosea* e *Aspergillus flavus*; (4) todos os isolados são patogênicos e os mais virulentos BBOT11, BBOT12 de *B. bassiana* e IBOT33 de *I. lilacinus*; e (5) iscas formuladas com fungos são atrativas, carregadas e incorporadas por operárias de *A. sexdens rubropilosa*, contudo não causam a mortalidade da colônia.

Palavras- chave: Formiga cortadeira, ninho inicial, sobrevivência, patogenicidade.

MORPHOGENESIS OF THE INITIAL NESTS OF *Atta* spp. (HYMENOPTERA: FORMICIDAE), MORTALITY IN NATURAL CONDITIONS AND EVALUATION OF THE ENTOMOPATHOGENIC FUNGI ACTION. Botucatu, 2010, 149 p. Tese (Doutorado em Agronomia Proteção de Plantas) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: SANDRA REGINA DE SOUSA CARDOSO
Advisor: LUIZ CARLOS FORTI

SUMMARY

The leaf-cutting ants are pests for several important crop plants, which requires constant control. However, the natural mortality of *Atta* spp colonies is high, reaching 100% in the first year of foundation. Among many factors the pathogenic microorganisms are noted as one of those responsible for such mortality. Thus, this study aimed to: (1) study the morphogenesis of early nests depending on the time of foundation of these species; (2) assess the death rate of the queens of *Atta bisphaerica* and *Atta sexdens rubropilosa* during the first months of the foundation, through excavations in newly founded nests; (3) isolation and characterization of entomopathogenic fungi found in queens; (4) perform bioassays to assess the pathogenicity of these isolates in *Atta sexdens rubropilosa* and (5) formulation and application of baits based on entomopathogenic fungi isolated in colonies of *Atta sexdens rubropilosa*, seeking opportunities for practical application. To this end, we collected newly fertilized queens or from excavations of incipient nests marked during the time of nuptial flight. The excavations were performed at 20, 45, 90, 135, 180 and 225 days of nest age in 2007, and at 20, 45 and 90 days in 2008. The results were: (1) the dimensions of the incipient chamber increases with time of the foundation; (2) high rates of mortality for *Atta bisphaerica* and *Atta sexdens rubropilosa*; (3) queens of *Atta* spp. can be parasitized by several fungi, including *Beauveria bassiana, Isaria lilacinus, Isaria fumosorosea* and *Aspergillus flavus*; (4) all strains are pathogenic and the most virulent BBOT11, BBOT12 of *B. bassiana* and IBOT33 of *I. lilacinus*; and (5) baits made with fungi are attractive, loaded and incorporated by workers of *A. sexdens rubropilosa*, yet not cause mortality of the colony.

Keywords: Leaf-cutting ant, initial nest, survival, pathogenicity.

1. INTRODUÇÃO

As formigas cortadeiras, gênero *Atta* e *Acromyrmex*, pertencem à tribo Attini e como os demais representantes desse grupo cultivam fungo do qual se alimentam. Esse grupo é localizado estritamente no Novo Mundo e sua distribuição se estende desde 40° de latitude norte até 44° de latitude sul, compreendendo as zonas subtropicais e tropicais (WEBER, 1966). Apresentam ampla distribuição em todo território brasileiro, com intensa atividade durante o ano, atuando sobre muitas espécies vegetais.

Embora a dinâmica de construção e manutenção de um ninho seja de responsabilidade do grupo, a fundação em *Atta* normalmente ocorre por uma única fêmea recém-fecundada. Da revoada até o estabelecimento definitivo da colônia, vários fatores podem provocar a mortalidade da rainha, da prole e do fungo simbionte.

Com isso, o período de fundação é considerado um dos momentos mais críticos para a sobrevivência e estabelecimento da colônia, devido apresentar alta vulnerabilidade à ação de predadores, competidores e micro-organismos patogênicos (AUTORI, 1950; FERNÁNDEZ et al., 2004). Além disso, os ninhos normalmente são construídos superficialmente, onde as condições ambientais nem sempre são favoráveis, entre elas, as oscilação bruscas de temperatura e umidade e especialmente a ocorrência de fortes e abundantes chuvas, responsáveis pela mortalidade de um número considerável de ninhos iniciais.

Apesar do baixo percentual de sobrevivência de colônias iniciais, uma vez ocorrido o estabelecimento do ninho, o hábito de cortar folhas e utilizá-las como substrato para o cultivo do fungo simbionte pode causar grandes prejuízos, sendo tais formigas consideradas pragas responsáveis por danos na área florestal e agrícola (BOARETTO; FORTI, 1997), o que exige constante uso de técnicas de controle.

Dentre as espécies de interesse econômico no país, *Atta sexdens rubropilosa* Forel (1908) e *Atta bisphaerica* Forel (1908) são consideradas importantes pragas. A primeira espécie forrageia uma variedade de culturas agrícolas, sendo considerada uma das principais pragas dos reflorestamentos, enquanto *A. bisphaerica* atua principalmente em área de pastagem e cana-de-açúcar.

O controle atual de formigas cortadeiras se dá por métodos químicos, especialmente isca tóxica, considerado um dos mais práticos e eficientes. Contudo, pode envolver alto custo operacional e tem demonstrado inconveniências devido à falta de especificidade, contaminação do meio ambiente e toxicidade para o aplicador (JACCOUD, 2000).

Questões econômicas e ambientais têm obrigado empresas de reflorestamento a melhorarem o rendimento das técnicas de controle químico e incentivado a experimentação de novas tecnologias. Como resposta, a pesquisa científica tem buscado desenvolvimento de alternativas para o controle de formigas cortadeiras, entre elas o uso de micro-organismos especialmente fungos entomopatogênicos.

Dentro desse contexto, utilizando-se como objeto de pesquisa as espécies *A. sexdens rubropilosa* e *A. bisphaerica*, o presente estudo buscou estudar a construção e ampliação de ninhos iniciais, levando em conta que a fundação do mesmo é de fundamental importância para o sucesso e sobrevivência da colônia incipiente; estudar o percentual e as chances de mortalidade de tais espécies, buscando relacionar com possíveis fatores ambientais e, posteriormente caracterizar fungos filamentos de ocorrência natural em rainhas de *Atta* e testá-los em laboratório, a fim de contribuir com a possibilidade de aplicação destes numa perspectiva de controle biológico de formigas cortadeiras.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Revoada e fundação do ninho em formigas cortadeiras.

A revoada ou vôo nupcial representa uma das principais estratégias reprodutivas utilizadas pelos Formicidae, e, freqüentemente ocorre quando precipitação pluviométrica, temperatura, umidade do ar e velocidade do vento permitem aos reprodutores melhores condições de acasalamento, escape de predadores e localização de sítio adequado para fundação de nova colônia (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

Dentre as condições climáticas observadas, a umidade do solo é de grande importância, permitindo posteriormente sucesso de escavação do ninho pela rainha (DELLA LUCIA; BENTO, 1993) e possivelmente favorecendo microambiente adequado para o cultivo inicial do fungo simbionte (DIEHL-FLEIG; ROCHA, 1998; ROCES; KLEIDMAN, 2000; BOLLAZI; ROCES, 2002).

Entre as Attini, a revoada é caracterizada pela liberação de machos e fêmeas de diferentes colônias simultaneamente, favorecendo variabilidade genética e dispersão (DELLA LUCIA; BENTO, 1993); Em *Atta* Fabricius, a saída dos reprodutores acontece pela primeira vez em ninhos com 38 meses de idade, aproximadamente (AUTUORI, 1941), sendo o vôo nupcial precedido por chuvas (MARICONI, 1970; CUNHA, 1988). Em *Atta sexdens rubropilosa*, o vôo nupcial já foi

observado, mesmo em condições climáticas não tão favoráveis quanto à luminosidade e temperatura, porém na presença de umidade do solo, sendo este parâmetro, portanto, um fator limitante nessas condições (CUNHA, 1988). No Brasil, a revoada de *Atta* já foi investigada por Autuori (1941), Amante (1972) e Cunha (1988).

Em formigas, o processo de fundação da colônia pode ser diferenciado em dois tipos: (1) haplometrose (participação de apenas uma única fêmea reprodutora) e (2) pleometrose (duas ou mais rainhas participando da fundação), gerando respectivamente, colônias monogínicas e poligínicas; estas últimas podem apresentar vantagens em relação ao desenvolvimento da colônia e menor ataque de predadores (MINTZER, 1987; HOLLDOBLER; WILSON, 1990; BROWN; BONHOEFFER, 2003). O tipo de estratégia de fundação, por sua vez, pode estar relacionado com a disponibilidade de recursos e tipo de solo (BENTO et al. 1991, DIEHL-FLEIG; ROCHA, 1998).

De acordo com revisão realizada por Fernandez-Marin et al. (2004), o tipo de fundação por haplometrose (única rainha) geralmente ocorre em muitas espécies de Attini, sendo observado, pleometrose para um pequeno percentual de espécies, nesses casos, porém, sem informação sobre continuidade de poligínia nesses ninhos.

Quanto ao comportamento da rainha após escavação da câmara existem relatos de duas estratégias de fundação: semi-claustral (primitiva), caracterizada por saída da rainha em busca de suprimento para a prole inicial e fundação claustral (derivada) no qual a rainha alimenta os imaturos com suas reservas corporais (BROWN; BONHOEFFER, 2003).

A estratégia primitiva pode ser encontrada principalmente nas formigas socialmente e morfologicamente mais primitivas como pertencente às sub-famílias Ponerinae, Myrmeciinae e Nothomyrmecinae) (HASKINS, 1941, apud BROWN; BONHOEFFER, 2003), enquanto que nas formigas derivadas social e morfologicamente, especialmente Formicinae e Myrmicinae a estratégia de fundação predominante é a claustral (HOLLDOBLER; WILSON, 1990).

Contudo, um estudo comparativo sobre o comportamento de fundação do ninho em várias espécies pertencentes à tribo Attini (Formicidae), inclusive *Atta* e *Acromyrmex*, revelou que a maioria das espécies estudadas apresentou estratégia de fundação semi-claustral, sendo que somente em *Atta* não foi verificado tal comportamento (FERNANDEZ-MARIN et al., 2004). Em *Atta* a fundação é realizada normalmente por

uma única rainha (DELLA LUCIA; ARAÚJO, 1993). O único caso de poliginia foi apresentado para *Atta texana* (MINTZER, 1987).

Mortalidade durante o forrageamento é sugerido como o principal fator de pressão de seleção responsável pela evolução para fundação claustral nas colônias (BROWN; BONHOEFFER, 2003). Em *Acromyrmex striatus*, foi registrada alta predação das rainhas por ocasião do forrageamento, ocasionando taxa de mortalidade de 99,96% e reduzindo a quase zero o sucesso de fundação semi claustral (DIEHL-FLEIG, 1995).

Em *Atta sexdens rubropilosa* e *Atta bisphaerica* a fundação é do tipo claustral, portanto a colônia não apresenta qualquer contato com o exterior até o aparecimento das primeiras operárias adultas no ninho, responsáveis pelo forrageamento. Contudo, ainda assim grande é a mortalidade da mesma, desde o momento da fundação até o estabelecimento definitivo do sauveiro.

2.2 Arquitetura e escavação de ninhos de *Atta* Fabricius.

A arquitetura do ninho é importante para o desenvolvimento das colônias de formigas, sendo que a forma de construção dos mesmos é considerada uma especificidade de cada espécie; alguns podem ser mais superficiais e simples enquanto outros são mais complexos (HOLLDOBLER; WILSON, 1990).

A principal função estrutural do ninho é proteger a população de inimigos naturais (SUDD, 1982) e no caso das Attini, favorecer as condições microclimáticas apropriadas para a manutenção da colônia e para o cultivo do fungo simbionte (KLEINEIDMAN, ROCES, 2000; BOLLAZI; ROCES, 2002, MOREIRA et al, 2004).

O gênero *Atta* constrói ninhos grandes e complexos, caracterizados externamente por um monte de terra solta e diversos “olheiros” e internamente constituído de inúmeras panelas e galerias subterrâneas (GONÇALVES, 1960).

Conforme Amante (1972), cada espécie apresenta um “padrão arquitetônico” do ninho, com base no diâmetro, ângulo, tamanho das partículas depositadas na superfície, o que pode facilitar a identificação dos mesmos.

Internamente, os ninhos são constituídos por inúmeras câmaras ou “panelas”. Estas são construídas para diferentes funções sendo classificadas em câmaras de fungo, de terra, de lixo, de lixo + terra e vazia (MOREIRA, 2001).

Os ninhos podem ser construídos nos mais diversos ambientes. No caso de *Atta bisphaerica* estes ocorrem em áreas abertas, com apenas um monte de terra, plano ou quase plano, e os olheiros ao nível do monte de terra solta, sendo as câmaras situadas abaixo da projeção deste (MOREIRA, 2001).

Ninhos adultos de *A. sexdens* também apresentaram câmaras sob a projeção do monte de terra solta em estudos realizados por Eidmann (1932), Autuori (1942), Jacoby, (1950) e Pretto (1996). Em ninhos de *Atta sexdens rubropilosa*, as câmaras de lixo são construídas próximas e de maneira intercalar às de fungo, na maioria das vezes sob o monte de terra solta, o que pode ser uma adaptação para facilitar a limpeza das câmaras de fungo, reduzindo a distância percorrida pelas operárias (PRETTO, 1996). Para esta espécie a localização das câmaras sob o monte de terra solta também foi verificado por Autuori (1942), Jacoby (1950) e Mariconi (1970).

Atta laevigata e *A. vollenweideri*, também apresentam câmaras localizadas sob o monte de terra solta (PEREIRA-DA-SILVA, 1975). *Atta capiguara*, porém apresenta suas câmaras fora da projeção do monte de terra solta, dificultando ainda mais o controle dos ninhos (MARICONI, 1970; FORTI, 1985).

A escavação de ninhos tem sido importante, não somente para revelar sua estruturação interna, mais porque revelam sua composição e organização social. Através de escavações foram feitas interessantes conclusões de que os mesmos crescem em função do crescimento populacional de operárias (HALLEY et al., 2005).

Pesquisadores podem utilizar diversas técnicas de modelagem interna dos ninhos, entre elas, gesso dental, zinco, alumínio (TSCHINKEL, 2004). Cada método apresenta vantagens e desvantagens quanto à resistência do material, preservação de formigas possibilitando estimação da densidade populacional e em relação à segurança do aplicador (TSCHINKEL, 2010). Em formigas cortadeiras, trabalhos sobre arquitetura de ninhos normalmente utilizam o método de moldagem com cimento. Autuori (1942), Jacoby (1943; 1950), Jonkman (1980), Forti (1985), Pretto (1996), Moreira et al., (2004), Moreira (2008) fizeram uso desta metodologia em estudo com *Atta*, enquanto Verza et al. (2007) e Caldato (2010), utilizaram para verificar arquitetura de ninhos de *Acromyrmex*.

O estudo da localização das câmaras de fungo em ninhos adultos é importante não apenas para o conhecimento da biologia dos ninhos, mais dentro do enfoque

de controle, pois pode facilitar a aplicação de certos produtos, podendo aumentar as chances de alcance das câmaras (MOREIRA, 2001).

2.3 Importância e controle de formigas cortadeiras

As formigas cortadeiras são consideradas pragas nos países da América do Sul, América Central e no sul da América do Norte (FOWLER et al. 1990; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; DELLA LUCIA; FOWLER, 1993). São responsáveis, por um impacto negativo na agricultura, causando sérios prejuízos à economia de certos países, dentre eles, o Brasil (WEBER, 1972a; WILSON, 1976), onde encontram-se distribuídas em todo o território nacional, com intensa atividade durante o ano, atacando várias culturas, pastagem e em particular áreas de reflorestamentos (MARICONI, 1970, HERNADEZ; JAFFÉ, 1995).

Dentre as espécies de interesse no país, *Atta sexdens rubropilosa* Forel (1908) e *Atta bisphaerica* Forel (1908) são consideradas importantes pragas, sendo conhecidas na linguagem popular, respectivamente, como "saúva limão" e "saúva mata-pasto". A primeira espécie forrageia uma variedade de culturas agrícolas, sendo considerada uma das principais pragas dos reflorestamentos (GONÇALVES, 1960; DELLA LUCIA et al., 1993a; JACCOUD, 2000).

Atta bisphaerica Forel, embora provoque danos às pastagens, têm se destacado principalmente como praga de cana-de-açúcar (BOARETO; FORTI, 1997; JACCOUD, 2000). De acordo com Gonçalves (1960) e Moreira (1996) esta espécie é encontrada somente em território brasileiro, ocorrendo nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul. Seu controle é dificultado devido a caracterização dos seus ninhos (MARICONI, 1970; MOREIRA et al.; 2004), além de características morfológicas ecológicas e comportamentais que as diferencia das cortadeiras de dicotiledôneas (FOWLER et al., 1986; BOARETO; FORTI, 1997; NAGAMOTO et al., 2009).

As empresas de reflorestamentos e agricultores em geral têm empregado o controle químico, de forma sistematicamente através de iscas, termonebulização e fumigantes. O uso de isca tóxica é considerado o método mais econômico e prático do mercado e razoavelmente eficiente para combater formigas cortadeiras (FORTI et al., 1993).

As iscas consistem numa mistura de substrato atrativo com princípio ativo tóxico, formuladas na forma de pelletes. Antes de ser incorporado ao substrato, o princípio ativo, que é um inseticida, sofre comumente um processo de dissolução em óleo de soja refinado. Atualmente, o substrato atrativo que serve como matriz para a fabricação de iscas é a polpa cítrica desidratada e peletizada, embora anteriormente outros materiais já tenham sido experimentados (RAMOS, 2005). A eficiência do princípio ativo contra rejeição inicial pelas formigas depende do modo de ação que deve ser suficientemente demorado para permitir boa dispersão do inseticida na colônia (NAGAMOTO et al, 2007).

A eficiência das iscas à base de sulfluramida no combate às várias espécies de saúvas e quenquéns está concentrada numa faixa de 90 a 100 % de mortalidade (RODRIGUES, 2003). São eficientes no controle de *Atta laevigata, Atta cephalotes, Atta bisphaerica* (ZANUNCIO et al., 1992, 1993, 1996), *Atta sexdens rubropilosa* (ZANUCIO et al.,2002; ZANETTI et al. 2004) e *Acromyrmex ambiguus* (LOECK; GUSMÃO, 1998), entre outras espécies.

2.4 Perspectiva de controle microbiano de formigas cortadeiras.

Dentre os agentes de controle biológico, pesquisas já foram realizadas com ácaros, nematóides e fungos (DELLA LUCIA et al, 1993b). Muitas espécies de fungos controlam populações de insetos naturalmente e por isso são utilizados com eficiência em diversos programas de controle biológico de insetos. Aproximadamente 80% das doenças têm como agente etiológico os fungos, pertencente a 90 gêneros nos quais a maioria é encontrada no Brasil (ALVES, 1998). Diante da relativa especificidade, os fungos são considerados bons candidatos para o controle de pragas agrícolas importantes; alguns são produzidos industrialmente, estando disponíveis no mercado (LOPEZ et al., 1999).

Espécies de fungos Ascomicetos, como *Metarhizium* e *Beauveria* são entomopatogênicos generalistas, sendo virulentos a diversos insetos, inclusive aos sociais. As espécies *M. anisopliae* e *B. bassiana* são bastante estudados como agente de controle biológico de muitos insetos pragas (HUGHES et al., 2004a). *Cordyceps* também tem sido bastante estudado no controle de formigas (EVANS; SAMSON, 1982).

A ação de entomopatogênicos sobre formigas cortadeiras tem sido comprovada por diversos autores (MACHADO et al. 1988; DIEHL-FLEIG; SILVA, 1992; JACCOUD et al., 1999; LOPEZ; ORDUZ, 2003; HUGHES; BOOMSMA, 2004; HUGHES, et al., 2004b; BUSARELLO, 2008; CASTILHO et al., 2010).

Contudo, estes insetos apresentam eficiente mecanismo de reconhecimento de micro-organismos entomopatogênicos, demonstrando reações comportamentais que são eficientes na defesa da colônia, removendo o material contaminante do ninho, inclusive as formigas doentes ou mortas (KERMARREC et al., 1986). Colônias de *Acromyrmex*, em contato com esporos de *M. anisopliae* e *B. bassiana*reagiram abandonando olheiros e abrindo outros, redução de atividade externa, remoção de material seco e de formigas mortas para fora da colônia (MACHADO et al., 1988).

Além disso, as formigas possuem glândulas metapleurais responsáveis pela produção de substâncias com efeito antibiótico, auxiliando na assepsia da colônia (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; POULSEN et al., 2002; POULSEN et al., 2003; FERNANDEZ-MARÍN et al., 2006). As cortadeiras também possuem secreções salivares que podem minimizar a ação de compostos tóxicos (por exemplo, taninos e terpenóides), e ainda líquido fecal contendo enzimas que são depositadas no material vegetal antes dele ser inoculado no fungo; A própria associação das cortadeiras com o fungo simbionte já representa outro fator que limita a ação de substâncias tóxicas nesse grupo de insetos, pois o fungo simbionte funciona como um “estômago externo” que digere a celulose, e, ainda, transforma aleloquímicos vegetais em substâncias palatáveis para as formigas (MARTIN; WEBER, 1969).

Estudos que visam o conhecimento do potencial patogênico dos fungos em formigas cortadeiras trazem informações sobre os inimigos naturais desses insetos e abrem perspectivas para técnicas alternativas de controle, com inegáveis benefícios para a economia dos agricultores, das empresas de reflorestamento e ambiente (RODRIGUES, 2004).

Capítulo 1

MORFOGÊNESE DE NINHOS INICIAIS DE *Atta bisphaerica* E *Atta sexdens rubropilosa* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

RESUMO

O sucesso da fundação e crescimento estrutural do ninho é fundamental para a sobrevivência da colônia. Assim, teve-se como objetivo para o presente estudo, verificar as medidas da câmara recém-construída e acompanhar a ampliação nas dimensões da mesma em ninhos iniciais de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa*. O estudo foi realizado no município de Botucatu (SP), em duas áreas: Fazenda Experimental Lageado (FCA-UNESP) e Fazenda Santana. A primeira área formada de pasto e a segunda com eucalipto. Os ninhos foram marcados por ocasião da revoada dos anos de 2007 a 2009, sendo escavados 40 ninhos em cada área, por período. Em 2007, os ninhos foram escavados aos 45, 90, 135, 180 e 225 dias a partir da fundação. Em 2008, os ninhos foram estudados aos 45 e em 2009, aos 60 dias de fundação. A profundidade média da câmara de *Atta bisphaerica* foi de 16,55 cm, 17,26 cm e 17,49 cm, respectivamente para os anos 2007, 2008 e 2009. *Atta sexdens rubropilosa* construiu câmaras numa profundidade média de 12,49 cm em 2007, 15,42 cm em 2008 e de 15,63 cm, em 2009. As dimensões da câmara aumentam com a idade do ninho, especialmente a altura e consequentemente a profundidade da câmara. Para *Atta bisphaerica* a média aos 45 dias de fundação do ninho, do comprimento, largura, altura e profundidade da câmara foram, respectivamente, 4,32cm, 3,34 cm, 3,50 cm e 16,20 cm enquanto que aos 225 dias também, respectivamente, foram 5,74 cm, 5,64 cm, 6,23 cm e 20,60 cm. Para *Atta sexdens rubropilosa* as médias das medidas foram de 3,66 cm, 2,89, 2,75 e 12,68 cm aos 45 dias de fundação e de 3,78 cm, 3,53 cm, 4,08 cm e de 16,52 cm aos 225 dias, para comprimento, largura, altura e profundidade da câmara. A construção da segunda câmara foi verificada aos 135 e 180 dias de escavação da primeira. *Atta bisphaerica* apresentou percentual de escavação de 70 e 77,78 % para os 180 e 225 dias de fundação. *Atta sexdens rubropilosa* apresentou apenas 20% (1 ninho) dos ninhos com câmara 2 aos 120 e 225 dias.

Palavras chave: Formiga cortadeira, escavação, câmara inicial, sauveiro

Chapter 1

MORPHOGENESIS OF INITIAL NESTS OF *Atta bisphaerica* AND *Atta sexdens rubropilosa* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

SUMMARY

The success of the foundation and structural growth of the nest is critical to the survival of the colony. So it was taken as objective for the present study, verify the measures of newly-built chamber and follow the increase the dimensions of the same in initial nests of *Atta bisphaerica* and *Atta sexdens rubropilosa*. The study was carried out in Botucatu (SP) in two areas: Lageado Experimental Farm (FCA-UNESP) and Santana Farm. The first area consists of pasture and the second with *Eucalyptus*. The nests were marked during the nuptial flight of years from 2007 to 2009, and 40 nests were excavated in each area, by period. In 2007, nests were excavated at 45, 90, 135, 180 and 225 days from the foundation. In 2008, the nests were studied at 45 and in 2009, after 60 days of the foundation. The average depth of the chamber of *Atta bisphaerica* was 16.55 cm, 17.26 cm and 17.49 cm, respectively for 2007, 2008 and 2009. *Atta sexdens rubropilosa* built chambers at an average depth of 12.49 cm in 2007, 15.42 cm in 2008 and 15.63 cm in 2009. The dimensions increase with age of the nest, especially the height and consequently the depth of the chamber. For *Atta bisphaerica* the average at 45 days of the founding of the nest, the length, width, height and depth of the chamber were respectively 4.32 cm, 3.34 cm, 3.50 cm and 16.20 cm, while for 225 days also, respectively, were 5.74 cm, 5.64 cm, 6.23 cm and 20.60 cm. For *Atta sexdens rubropilosa* the mean of the measures were of 3.66 cm, 2.89, 2.75 and 12.68 cm to 45 days of the foundation and 3.78 cm, 3.53 cm, 4.08 and 16.52 cm at 225 days, length, width, height and depth of the chamber. The construction of the second chamber was recorded at 180 and 225 days of the first excavation. *Atta bisphaerica* showed percent of excavation of 70 and 77.78% for the 180 and 225 days of foundation. *Atta sexdens rubropilosa* had only 20% (1 nest) of nests with chamber 2 at 120 and 225 days.

Keywords: Leaf-cutting ant, excavation, initial chamber, leaf-cutting ant nest.

1. INTRODUÇÃO

A maioria das espécies de formigas constrói ninhos subterrâneos, os quais promovem proteção para a colônia e ajudam na manutenção de condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento de imaturos e adultos (HOLLDOBLER; WILSON, 1990), o que requer um intenso trabalho de escavação do solo pelas formigas (HALLEY et al., 2005).

Os gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, conhecidos popularmente por formigas cortadeiras, apresentam grande especialização na construção de seus ninhos, que normalmente são formados por câmaras ("panelas") ligadas entre si por galerias ou canais que se abrem na superfície do solo (ARAÚJO; DELLA LUCIA, 1997).

Em *Atta* Fabricius, o trabalho de escavação para construção do ninho é desempenhado inicialmente por uma única rainha recém-fecundada, responsável pela construção da primeira câmara. O tipo de fundação por haplometrose, associado à fase claustral, certamente requer grande gasto energético por parte da rainha. Isso acontece, pois além da escavação, ela utiliza reserva corporal para manter suas atividades até as primeiras operárias emergirem e iniciarem o forrageamento (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990), o que ocorre por volta dos 75 dias a partir da fundação (AUTUORI, 1942).

Desse momento em diante as operárias assumem atividades internas e externas ao ninho, dentre elas: cuidado com a prole, com a própria reprodutora e

escavações de novos canais e câmaras (AUTUORI, 1942, AMANTE, 1972, HOLLDOBLER, 1980; BUHL et al., 2005), sendo portanto de responsabilidade da prole adulta ampliação do ninho.

A dinâmica de ampliação do ninho apresenta dependência da densidade de formigas (HALLEY et. al, 2005). A adaptação do tamanho dos ninhos à sua população é um processo comum na maioria dos insetos sociais, contudo a dinâmica de construção e ampliação de ninhos subterrâneos não é totalmente conhecida (RASSE; DENEUBOURG, 2001).

Frente à importância das saúvas como pragas a diversas culturas e, das limitações das tecnologias de controle em ninhos adultos, muitos trabalhos têm-se voltados para arquitetura externa e interna do ninho, visando o conhecimento estrutural e com vistas a melhorias nas técnicas de aplicação de produtos de controle (PRETTO, 1996; MOREIRA et al., 2002, 2004; MOREIRA, 2008).

Ninhos de *Acromyrmex* normalmente são pequenos e superficiais, geralmente com uma única ou poucas câmaras, com presença ou não de terra solta (GONÇALVES 1960), embora Verza et al. (2007) relataram um porte relativamente grande para *Acromyrmex rugosus rugosus*. Algumas espécies de *Acromyrmex* podem escavar ninhos mais profundos, quando fundados em locais com maior temperatura do solo; Levantamento sobre 21 pesquisas com o gênero, revelou que dependendo do regime de temperatura e da exposição ao sol dos ninhos, estes apresentam fundações superficiais ou subterrâneas, sendo que tais variações podem ocorrer inclusive dentro de uma mesma espécie (BOLAZZI et al., 2008).

Para a maioria das espécies de *Atta*, os ninhos adultos são formados por inúmeras câmaras, podendo atingir vários metros de profundidade, com depósito de terra na superfície, formando o monte de terra solta ou “murundu”(GONÇALVES, 1960). Tais câmaras podem apresentar variações de formato, localização e dimensões dependendo da espécie e da função (fungo, lixo e terra) (MOREIRA, 2001).

Câmaras de ninhos adultos de *Atta sexdens* foram caracterizadas por Jacoby (1950) como estrutura simples, fechada, apresentando formato esférico ou elipsóide. Formato esférico também foi encontrado por Gonçalves (1960), enquanto que Pretto (1996), em estudo sobre a arquitetura dos ninhos de *Atta sexdens rubropilosa*, encontrou formato semi-elipsóide para câmaras de lixo e de fungo, sendo as primeiras com dimensões muito maiores.

Ninhos adultos de *Atta bisphaerica*, em estudo de escavação realizado por Moreira (2001), mostraram que a maioria das câmaras apresenta formato esférico, com variação nas dimensões de altura, largura e comprimento entre diferentes ninhos.

Embora as saúvas apresentem habilidade para construir ninhos em grandes profundidades, a câmara inicial normalmente é fundada na camada superficial do solo, cerca de 8,5 a 15 cm (AUTUORI, 1941), estando sujeitos às variações de temperatura e umidade, além da influencia de fortes e abundantes chuvas típicas do período em que ocorre a revoada e fundação do ninho (AUTUORI, 1941; BENTO et al., 1991).

Um dos aspectos mais importantes no estudo de *Atta* Fabricius é sem dúvida, o conhecimento do seu desenvolvimento inicial, que pode ser acompanhado externamente através dos olheiros (MARICONI, 1970) e internamente por meio de escavações, conhecendo-se a profundidade e o tamanho das primeiras câmaras construídas.

Alguns trabalhos já foram realizados visando esse conhecimento, sendo ninhos iniciais de *A. sexdens rubropilosa* caracterizados por Autuori (1942), Jacoby (1943, 1950) e Mariconi (1970). *A. capiguara* teve o ninho inicial estudado por Pereira-da-Silva (1979), em Botucatu/SP. Embora já se tenha informação a cerca da câmara inicial, a literatura sobre fundação e evolução de ninhos de *Atta* ainda é restrita.

Estudos sobre a formação e desenvolvimento estrutural de ninhos são de grande importância para atuais e futuros métodos de controle de insetos de grande importância econômica como os pertencentes ao gênero *Atta*. Com isso, o trabalho teve como objetivo dimensionar a câmara inicial de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa*, em função do tempo de fundação e registrar o período e o percentual de construção da segunda câmara.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização da área experimental

O trabalho foi realizado no município de Botucatu/SP. Os ninhos de *Atta bisphaerica* foram estudados em pontos da Fazenda Santana, situada a 22°50’720” S e 48°26’155” W (Figura 5a), com solo do tipo Latossolo Vermelho Escuro. Ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* foram selecionados em área com plantio de eucalipto, pertencente à Fazenda Experimental Lageado- FCA/UNESP (22°50’833” S e 48°26’476” W) (Figura 5b), também em solo da classe Latossolo Vermelho Escuro.

2.2 Seleção e escavação dos ninhos

Foram selecionados 500 ninhos aleatoriamente em cada área no momento da fundação realizada pela rainha no ano de 2007 e 2008. Em 2009 foram marcados 40 ninhos em cada área. Os ninhos foram marcados com estacas de arame identificadas na extremidade (Figura 5d-e), após o fechamento do orifício inicial escavado pela rainha, como garantia que a mesma já se encontrava enclausurada, minimizando assim o risco de predação. Os arames foram colocados no solo à 5 cm do orifício escavado, sempre orientado para o Norte Magnético, de maneira a facilitar a localização do túnel durante as avaliações.

Em 2008, devido corte das árvores e retirada da madeira na área de eucalipto em estudo no ano de 2007, os ninhos de *A. sexdens rubropilosa* foram selecionados na mesma área, porém em locais com apenas plantio experimental de eucalipto, sem corte e retirada da madeira. Em 2009, na área de eucalipto, foram selecionados ninhos de *A. sexdens rubropilosa* nas duas subáreas amostrais.

Durante as escavações foram utilizadas ferramentas manuais, seguindo metodologia utilizada por Autuori (1942), Pereira-da-Silva et al. (1979) e Pretto (1996). Foi aberta uma trincheira ao lado do ninho, expondo o canal e a câmara, sem prejuízos aos mesmos (Figura 5c). As escavações aconteceram em cada área aos 45, 90, 135, 180 e 225 dias da fundação, no ano de 2007. No ano de 2008, as escavações ocorreram aos 45 dias e em 2009, aos 60 dias de fundação. Em cada período de avaliação foram abertos 40 ninhos de cada espécie em estudo, totalizando para cada espécie 200 ninhos em 2007, 120 em 2008 e 40 em 2009.

A partir dos 180 dias, sempre que percebido a existência de um novo canal (Figura 6f) a partir da primeira câmara, a escavação foi continuada até alcançar a segunda câmara construída, verificando-se a medida de profundidade, comprimento, largura e altura da nova câmara (quando existente), além do comprimento o canal.

Após o aparecimento de operárias maiores nos ninhos, alguns exemplares foram coletados, colocados em tubos plásticos com álcool 70% e levados para o laboratório para confirmação da espécie em estudo.

2.3 Arquitetura interna

Por meio das escavações realizadas foi possível calcular as medidas de comprimento, largura, altura, profundidade e volume das câmaras em cada período de fundação do ninho.

Através das medidas da câmara (comprimento, largura e altura) foi estimado o volume da mesma, sendo este calculado por fórmulas adaptadas de figuras geométricas, conforme utilizada por Pretto (1996) e Moreira (2001). Para isso, primeiramente foi estimado o formato da câmara inicial, através de observações em campo e comparando entre si das medidas da câmara inicial.

As fórmulas usadas foram:

$V = 1/6\pi\ [(l + h + p)/3]^3/2$ (hemiesfera)

$V = 1/6\pi\ [(l + h + p)/3]_3$ (esfera)

Onde:

l = Largura da câmara

h = Altura da câmara

p = comprimento da câmara

A fórmula da hemiesfera foi utilizada para calcular o volume da câmara aos 45 e 90 dias para *A. bisphaerica* e dos 45 até 135 dias de fundação para *A. sexdens rubropilosa*. A fórmula da esfera foi utilizada para cálculo do volume da câmara aos 135 e 225 dias para *A. bisphaerica* e dos 180 e 225 dias de fundação para *A. sexdens rubropilosa*.

2.4 Análises estatísticas

Os dados de profundidade, comprimento, largura, altura da câmara foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) (α=0,05), comparando-se as médias pelo teste Tukey, através do programa SAS 9.2 for Windows.

Foram feitas comparações entre as médias por período de escavação para cada espécie e posteriormente, entre as espécies estudadas, levando em conta os ninhos com rainha viva. Foi realizada análise de Correlação Linear de Pearson entre as variáveis: profundidade, comprimento, largura e altura, utilizando o programa SigmaStat.

Em relação à segunda câmara, também foi calculada a freqüência (%) de ocorrência e foi calculada a média e desvio padrão de suas medidas: profundidade, comprimento, largura e altura.

Para os resultados de umidade e resistência à penetração do solo foram realizadas análise de variância (ANOVA) e as médias foram submetidas ao teste Tukey. Os dados de resistência à penetração do solo também foram avaliados por regressão linear.

3. RESULTADOS

3.1 Arquitetura interna

3.1.1 Formato da câmara inicial de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa*.

Em 2007, aos 45 dias, em ninhos de *A. bisphaerica*, o comprimento diferiu significativamente da largura e altura, sendo as médias para cada medida, respectivamente, 4,29 cm, 3,33 cm e 3,05 cm ($p<0,0001$). Aos 90 dias o comprimento, com 4,57 cm diferiu apenas da altura com 3,66 cm ($p=0,0067$) e nos períodos 135, 180 e 225 dias, as medidas não diferiram entre si (Tabela 1).

Para *Atta sexdens rubropilosa* o comprimento diferiu das demais medidas, dos 45 aos 135 dias. Aos 45 dias a medidas de comprimento, largura e altura foram respectivamente: 3,55 cm, 2,84 cm e 2,77 cm. No período de 90 dias obteve-se 4,17 cm de comprimento, 3,33 cm de largura e 3,29 cm de altura. Aos 135 as medias foram: 3,83 cm, 3,11 cm e 2,98 cm, valores respectivos para comprimento, largura e altura (Tabela 1).

Assim, foram definidos dois formatos de câmara para ambas as espécies: hemisférico e esférico. Em *A. bisphaerica* o formato hemisférico foi encontrado para os períodos 45 e 90 dias (Figura 1C) e esférico a partir dos 135 dias de fundação (Figura 1D). Para *A. sexdens rubropilosa*, foi observado, formato hemisférico (Figura 1E) até os 135 dias e esférico nos 180 e 225 dias.

Tabela 1. Medidas das câmaras iniciais (cm) de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa* em função do tempo de fundação do ninho (dias), ano 2007. Botucatu (SP), 2010.

Medidas da câmara (Cm)	***Atta bisphaerica***					***Atta sexdens rubropilosa***				
	Tempo de fundação (dias)					**Tempo de fundação (dias)**				
	45	**90**	**135**	**180**	**225**	**45**	**90**	**135**	**180**	**225**
Comprimento	4,29 a	4,57 a	4,47 a	4,15 a	4,76 a	3,55 a	4,17 a	3,83 a	4,62 a	3,54 a
Largura	3,33 b	3,90 ab	4,60 a	3,80 a	4,45 a	2,84 b	3,33 b	3,11 b	3,59 a	2,89 a
Altura	3,05 b	3,66 b	4,10 a	4,21 a	4,87 a	2,77 b	3,29 b	2,98 b	3,98 a	3,33 a
p	<0,0001	0,0067	0,300	0,44	0,5919	<0,0001	0,0002	0,0017	0,1145	0,1156
CV(%)	16,23	29,55	31,70	33,08	33,69	21,64	25,87	27,87	45,03	32,79

Médias seguida de mesma letra na coluna não difere significativamente pelo teste Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

3.1.2 Medidas da câmara recém-fundada de *A. bisphaerica* e *A. sexdens rubropilosa* em função do ano de estudo.

Câmara recém-fundada de *A. bisphaerica* apresentou profundidade média semelhante nos três anos de estudo, com média geral de 16,94±3,31 cm de profundidade. O comprimento médio da câmara diferiu entre os anos, sendo o menor valor observado para o ano de 2008 com 3,45±0,72 cm, comparado com 4,28±0,65 cm em 2007 e 4,59±0,75 cm em 2009. A média entre os anos foi de 4,10±0,85 cm. O valor médio da largura não diferiu entre os anos e a média geral foi de 3,18±0,86 cm. Em relação à altura, foi de 3,05±0,38 cm em 2007, 2,90±0,60 cm em 2008 e 2,34±0,28 em 2009, diferindo estatisticamente nos dois primeiros anos. A média nos três anos foi de 2,84±0,53 cm. O volume médio também diferiu nos dois primeiros anos, sendo as médias de 12,02 cm^3, 8,83 cm^3 e 10,14 cm^3, respectivamente para 2007, 2008 e 2009 (Tabela 2).

As câmaras de *A. sexdens rubropilosa* apresentaram profundidade média de 12,49±2,52 cm, 15,42±3,26 cm e 15,63±3,11 cm, em 2007, 2008 e 2009, respectivamente (Tabela 3), sendo a profundidade no primeiro ano diferente das demais e a média nos três anos de 14,71±3,28 cm. O comprimento foi semelhante nos três anos de estudo, sendo a média entre eles de 3,76±0,76 cm. A largura com médias de 2,84±0,85 cm, 3,17±0,88 cm e 2,49± 0,82 cm, para 2007, 2008 e 2009, diferiu entre os dois últimos anos. A média nos três anos foi de 2,81±0,88 cm. A média da altura da câmara recém-fundada foi semelhante nos três anos com média de 2,88±0,63 cm. Semelhante ao comprimento e altura, o volume da câmara foi semelhante nos três anos de estudo, com média geral de 9,02±6,62 cm^3.

Comparando as medidas das câmaras recém-fundadas entre as duas espécies observou-se que em 2007, todas as medidas da câmara foram significativamente superiores para *A. bisphaerica* em relação às medidas da câmara fundada por *A. sexdens rubropilosa* (Figura 1A e 2). Em 2008 não ocorreu diferença na medida da câmara entre as espécies (Figura 1B e 2). Em 2009, comprimento e largura foram maior para *A. bisphaerica*, com p=0,0032 e p=0,0044, respectivamente e a altura da câmara foi significativamente maior para a segunda espécie (p=0,001) (Figura 1C). O volume foi semelhante entre as espécies (Figura 2).

Tabela 2. Medidas da câmara recém-fundada de *Atta bisphaerica* (Hymenoptera: Formicidae), por ano de fundação, 2007 – 2009 Botucatu (SP), 2010.

		Medidas da câmara (cm)				
Ano	**N**	**Profundidade**	**Comprimento**	**Largura**	**Altura**	**Volume (cm^3)**
2007	34	16,50± 2,42 a	4,28±0,65 a	3,33±0,69 a	3,05±0,38 a	12,02±3,17 a
2008	36	17,23±4,36 a	3,45±0,72 b	3,10±1,14 a	2,90±0,60 a	8,83±3,48 b
2009	29	16,08 ± 2,49 a	4,59±0,75 a	3,13±0,54 a	2,34±0,28 b	10,14±2,29 ab
Média		**16,94±3,31**	**4,10±0,85**	**3,31±0,86**	**2,84±0,53**	**10,21±3,45**
p		0,2027	<0,0001	0,4425	<0,0001	0,0006
CV%		19,08	17,48	27,25	16,43	15,07
d.m.s		1,78	0,45	0,55	0,30	2,04

*Médias seguida de mesma letra na coluna não apresenta diferença significativa pelo teste Tukey ao nível de 1 ou 5 % de probabilidade.
**Médias do volume transformadas em Raiz quadrada (Y).

Tabela 3. Medidas da câmara recém-fundada (45 dias) de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae), por ano de fundação, 2007 – 2009. Botucatu (SP), 2010.

		Medidas da câmara (cm)				
Ano	**N**	**Profundidade**	**Comprimento**	**Largura**	**Altura**	**Volume (cm^3)**
2007	40	12,49±2,52 b	3,55±0,57 a	2,84±0,85 ab	2,77±0,49 a	7,89 ±3,37 a
2008	36	15,42±3,26 a	3,69±0,78 a	3,17±0,88 a	2,76±0,56 a	9,69±6,88 a
2009	53	15,63±3,11 a	3,86± 0,83 a	2,49± 0,82 b	2,99± 0,72a	9,65±4,86 a
Média		**14,71±3,28**	**3,76±0,76**	**2,81±0,88**	**2,88±0,63**	**9,07±6,31**
p		<0,0001	0,2146	0,0022	0,1893	0,4328
CV%		20,45	22,25	31,34	23,66	29,14
d.m.s		1,60	0,44	0,46	0,36	0,5382

*Médias seguida de mesma letra na coluna não apresenta diferença significativa pelo teste Tukey ao nível de 1 ou 5 % de probabilidade.
**Médias do volume transformadas em Raiz quadrada (Y).

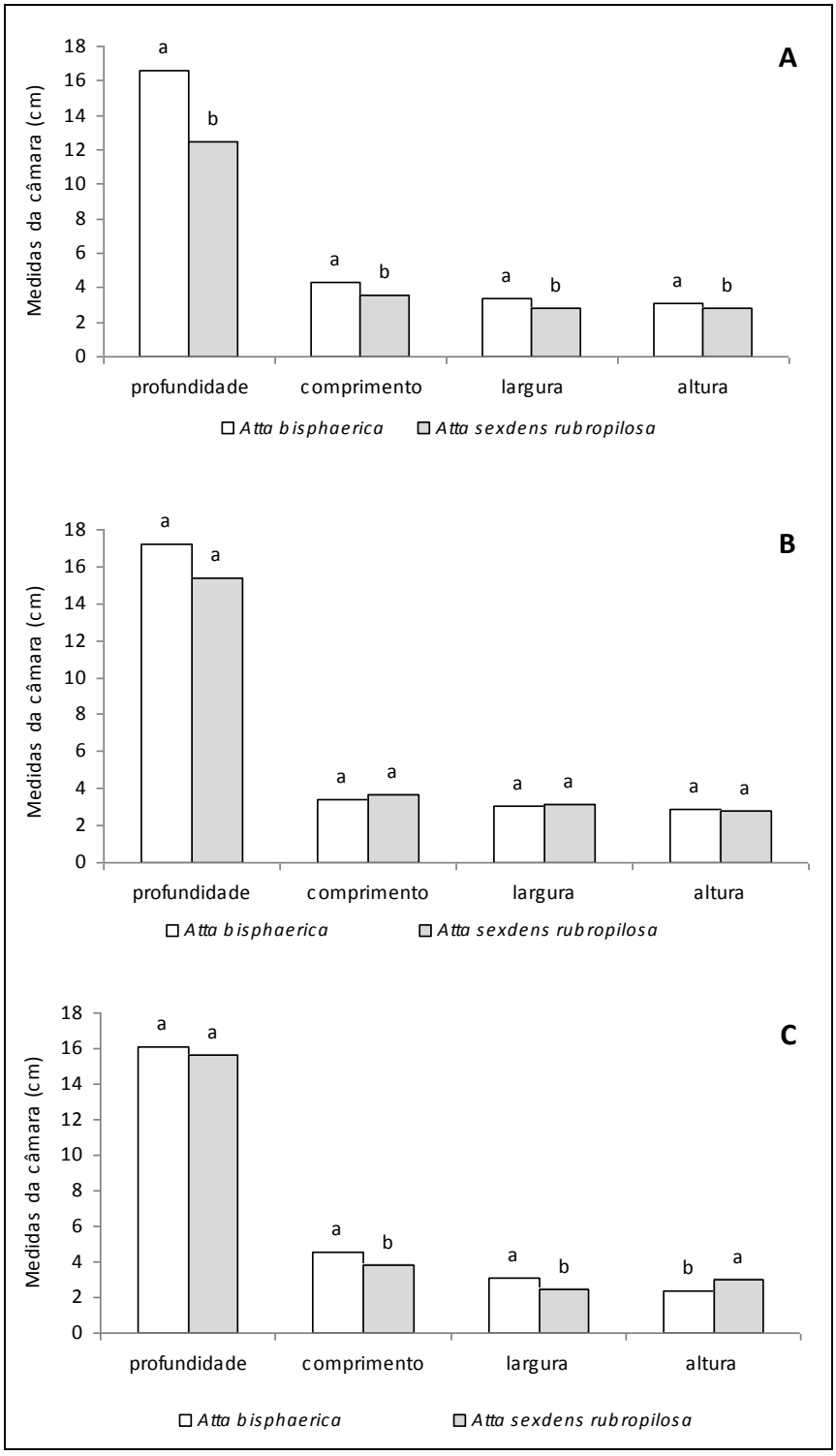

Figura 1. Comparação entre as medidas da câmara recém-fundada de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa*, nos três anos de estudo: (A) 2007, (B) 2008 e (C) 2009.

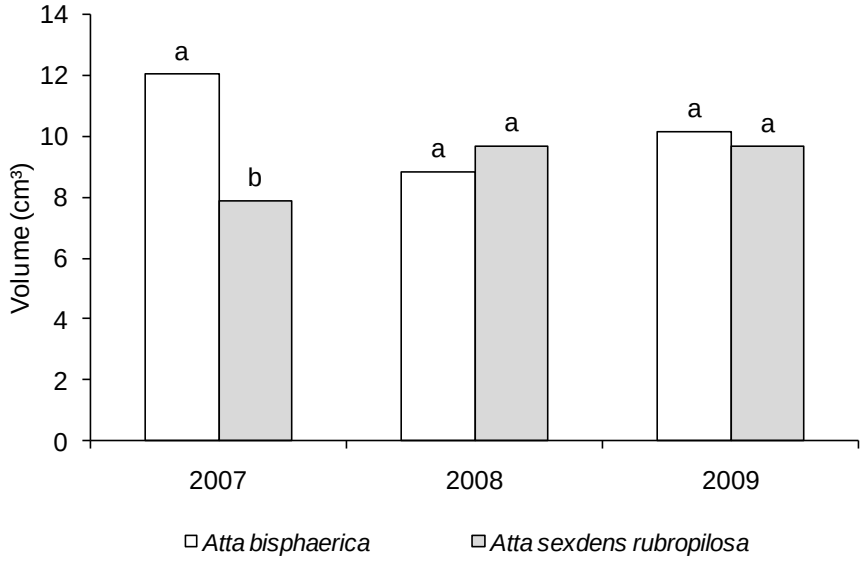

Figura 2. Comparação entre o volume da câmara recém-fundada de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa*, nos três anos de estudo.

3.1.3. Medidas da câmara em função do tempo de fundação.

Diferentes períodos de escavação revelaram diferentes valores para as medidas da câmara, com tendência a maior média com o passar do tempo de fundação, pois os dois últimos tempos de avaliação (180 e 225 dias) apresentaram dimensões significativamente superiores em relação aos demais períodos, para algumas das medidas estudadas.

Em *A. bisphaerica*, todas as avaliações com diferenças significativas ocorreram ao nível de 1% de probabilidade ($p<0,0001$) (Tabela 4). Em relação ao comprimento da câmara, a média aos 45 dias (4,32, cm) diferiu da média no período 90 (5,14 cm) e 225 (5,74 cm) dias. A largura da câmara aos 45 dias (3,34 cm) apenas não diferiu do período 90 dias (4,41 cm), apresentando menor média em relação aos demais tempos de fundação: 135 dias (5,04 cm), 180 dias (4,88 cm) e 225 dias (5,72 cm).

A altura e a profundidade foram as medidas que melhor demonstraram o comportamento de ampliação nas médias com o tempo de fundação, com diferença entre a média no período 45 dias (3,05 cm) e as médias encontradas nos períodos 180 dias (5,68 cm) e 225 dias (6,23 cm). Acompanhando o mesmo padrão gradual de crescimento, a profundidade aos 45 dias (16,20 cm), diferiu estatisticamente das médias nos períodos 180 e 225 dias de construção dos ninhos, respectivamente, 19,88 cm e 20,60 cm.

O volume da câmara de *A. bisphaerica* aos 45 dias (12,02 cm^3) e 90 (19,79 cm^3) diferiram do volume encontrado nos períodos 135 dias (50,40 cm^3), 180 dias (44,14 cm^3) e 225 dias (57,42 cm^3).

Para *A. sexdens rubropilosa*, para algumas medidas também ocorreu tendência de aumento nas dimensões da câmara em função do tempo de fundação, levando em conta os ninhos vivos, (Tabela 5). O comprimento observado foi semelhante em todos os períodos de observação. As médias da largura apresentaram diferiram significativamente entre o tempo 45 e 180 dias de fundação, sendo as médias, respectivas de 2,89 cm e 5,40 cm ($p=0,0036$). A altura foi significativamente superior no período 180 dias (4,42 cm), diferindo em relação aos 45 dias (2,76 cm) e 135 dias de fundação (3,08 cm) ($p<0,0001$).

A profundidade da câmara, aos 45 dias de fundação apresentou a menor média (12,68 cm), diferindo dos demais períodos, ao nível de 5% de probabilidade ($p=0,0201$). O volume da câmara aos 45 dias (7,80 cm^3), 90 dias (13,76 cm^3) e 135 dias (10,31 cm^3) foi significativamente menor comparado ao volume aos 225 dias de fundação (22,75 cm^3) ($p<0,0001$).

Tabela 4. Média e desvio padrão das medidas da câmara de *Atta bisphaerica*, em função do tempo de fundação, ano 2007. Botucatu (SP), 2010.

	Medidas da câmara (cm)				
Período	**Comprimento**	**Largura**	**Altura**	**Profundidade**	**Volume (cm^3)**
45 dias	4,32 ± 0,65 c	3,34 ±0,69 b	3,05 ± 0,38 c	16,20 ± 2,42 c	12,02 ± 3,27 b
90 dias	5,14 ± 1,21 abc	4,41 ± 1,43 ab	3,94 ±0,93 b	17,44 ± 2,13 bc	19,79 ± 13,90 b
135 dias	4,63± 0,79 bc	5,04 ± 1,79 a	4,33 ± 1,19 b	18,88 ±2,75 ab	50,40 ± 40,35 a
180 dias	5,26± 0,77 ab	4,88 ± 1,03 a	5,68 ± 0,93 a	19,88 ± 1,60 a	44,14 ± 36,52 a
225 dias	5,74 ± 0,90 a	5,64 ± 1,90 a	6,23 ± 1,12 a	20,60 ± 2,63 a	57,42± 36,87 a
P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
CV%	18,00	31,08	21,63	13,32	39,84
d.m.s	0,86	1,37	0,90	2,40	21,84

*Médias seguida de mesma letra na coluna não apresenta diferença significativa ao nível de 1 ou 5 % de probabilidade.
**Médias do volume transformadas em Raiz quadrada (Y).

Tabela 5. Média e desvio padrão das medidas da câmara de *Atta sexdens rubropilosa*, em função do tempo de fundação, ano 2007. Botucatu (SP), 2010.

	Medidas da câmara (cm)				
Período	**Comprimento**	**Largura**	**Altura**	**Profundidade**	**Volume (cm^3)**
45 dias	3,65 ± 0,57 a	2,89 ± 0,80 b	2,76 ± 0,52 c	12,68 ± 2,66 a	7,80 ± 3,36 c
90 dias	4,56 ± 0,64 a	3,99 ± 1,38 ab	3,47 ± 0,79 abc	14,53 ± 2,56 a	13,76 ± 8,39 bc
135 dias	3,80 ± 1,04 a	3,59 ± 0,78 ab	3,08 ± 0,62 bc	15,80 ± 2,99 a	10,31 ± 6,48 c
180 dias	3,77 ± 2,63 a	5,40 ± 3,37 a	4,42 ± 1,30 a	14,72 ± 2,83 a	27,66 ± 21,27 ab
225 dias	3,65 ± 0,36 a	3,52 ± 0,36 ab	4,08 ± 0,74 ab	16,53 ± 4,52 a	22,75 ± 21,00 a
P	0,0148	0,0036	<0,0001	0,0201	<0,0001
CV%	24,59	37,67	22,96	20,39	39,19
d.m.s	1,07	1,31	0,73	2,85	10,35

*Médias seguida de mesma letra na coluna não apresenta diferença significativa ao nível de 1 ou 5 % de probabilidade.
**Médias do volume transformadas em Raiz quadrada (Y).

3.1.3.1 Análise de Correlação de Pearson entre as medidas da câmara de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa*, em função do tempo de fundação.

Em *A. bisphaerica* por meio da Análise de Correlação de Pearson (Tabela 6), foi verificada correlação entre as medidas da câmara para a maioria dos períodos avaliados. Aos 45 dias a profundidade teve correlação com comprimento (0,488; p=0,00835), com a largura (0,398; p=0,0361) e com a altura (0,715; p=0,0001). Aos 90 dias foi verificada relação positiva e significativa entre profundidade do ninho e a largura da câmara, com índice de 0,587 (p=0,0001) e com a altura da câmara com índice de 0,570 (p=0,0002).

Os índices entre a profundidade e comprimento aos 135 dias foi 0,490 (p=0,00814); aos 180 dias=0,494 (p<0,0001) e aos 225 dias=0,488 (p=0,008). Índice de correlação entre profundidade e largura: 90 dias=0,587 (p=0,0001), 135 dias= 0,402 (p=0,003), 180 dias=0,482 (p=0,008) e 225 dias=0,398 (p=0,040). Valores da correlação entre profundidade e altura: aos 90 dias=0,570 (p=0,0002), 135dias=0,644 (p=0,002), 180 dias=0,546 (p=0,0022) e aos 225 dias=0,715 (p<0,0001).

O comprimento da câmara apresentou correlação com a largura da câmara nos períodos, 135dias=0,468 (p=0,010) e 180 dias=0,683 (p<0,0001) e com a altura da câmara aos 45 dias=0,356 (p=0,04), 135 dias=0,665 (p<0,0001), 180 dias=0,788 (p=0,0001) e 225 dias=0,571 (p=0,0001) (Tabela 8). A largura da câmara foi diretamente correlacionada com a altura aos 90 dias=0,824 (p<0,0001), 135 dias=0,720 (p=0,0002) e 180 dias=0,715 (p<0,0001).

Para *A. sexdens rubropilosa* ocorreu relação positiva e significativa entre a profundidade e o comprimento aos 45 dias=0,346 e 180 dias=0,673 (p=0,0083). Com a altura a profundidade correlacionou-se apenas aos 180 dias=0,850 (p<0,0001) (Tabela 6).

O comprimento apresentou correlação positiva e significativa com a largura aos 45 dias=-0,339 e aos 225 dias=0,667 (p=0,0250). Com a altura o comprimento apresentou correlação em todos os períodos. Aos 45 dias=0,356, aos 90 dias=0,474 (p=0,0126), aos 135 dias=0,524 (p=0,0086), aos 180 dias=0,839 (p<0,0001) e aos 225 dias=0,671 (p=0,0237).

A largura apenas apresentou forte correlação com a altura aos 225 dias=0,849 (p=0,0010).

Tabela 6. Índice de determinação do teste de correlação de Pearson entre as medidas da câmara inicial de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa*, por período de fundação, 2007. Botucatu (SP), 2010.

		Atta bisphaerica			***Atta sexdens rubropilosa***		
Período (dias)	**Dimensões da câmara**	**Comprimento**	**Largura**	**Altura**	**Comprimento**	**Largura**	**Altura**
45	Profundidade	0,488 **	0,398 *	0,715 **	0,346 *	0,102 ^{ns}	0,135 ^{ns}
	Comprimento		0,0736 *	0,571 **		-0,339 *	0,356*
	Largura			0,349 ^{ns}			0,134 ^{ns}
90	Profundidade	0,173 ^{ns}	0,587 **	0,570 **	0,0996 ^{ns}	0,283 ^{ns}	0,262 ^{ns}
	Comprimento		0,353 ^{ns}	0,362 ^{ns}		0,173 ^{ns}	0,474 *
	Largura			0,824 **			0,212 ^{ns}
135	Profundidade	0,490 **	0,402 *	0,644 **	0,124 ^{ns}	0,169 ^{ns}	0,370 ^{ns}
	Comprimento		0,468 *	0,665 **		0,0195 *	0,524 **
	Largura			0,720 **			0,282 ^{ns}
180	Profundidade	0,494 **	0,482 **	0,546 **	0,673 **	-0,0350 ^{ns}	0,850 **
	Comprimento		0,683 **	0,788 **		0,251 ^{ns}	0,839 **
	Largura			0,728 **			0,156 ^{ns}
225	Profundidade	0,488 **	0,398 *	0,715 **	-0,0676 ^{ns}	0,0653 ^{ns}	0,251 ^{ns}
	Comprimento		0,073 ^{ns}	0,571 **		0,667 *	0,671 *
	Largura			0,349 ^{ns}			0,849 **

Correlação significativa (**) ao nível de 1%, (*) ao nível de 5% e não significativa (^{ns}), de acordo com Correlação de Pearson.

3.1.3.2 Comparação entre as medidas da câmara inicial de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa* em função do tempo de fundação, ano 2007.

A espécie *A. bisphaerica* apresentou dimensões de câmara maiores do que as câmaras de *A. sexdens rubropilosa*. Profundidade, comprimento, largura e altura da câmara foram significativamente maiores para primeira espécie, dentro dos períodos de avaliação: 45, 135 e 225 dias. Ou seja, *A. sexdens rubropilosa* construiu, para o período e local de estudo, câmaras com menores dimensões e mais superficiais comparada à *A. bisphaerica*.

As médias de profundidade por período de fundação para *A. bisphaerica* e *A. sexdens rubropilosa* foram, respectivamente: aos 45 dias, 16,55 cm e 12,23 cm ($p<0,0001$; C.V%: 17,21), aos 135 dias, 18,38 cm e 14,92 cm ($p<0,0001$; C.V%:17,23) e aos 225 dias, 18,85 cm e 14,86 cm ($p<0,0001$;C.V%:19,52) (Figura 3A).

Em relação ao cumprimento, as médias, respectivas, para *A. bisphaerica* e *A. sexdens rubropilosa* foram: aos 45 dias, 4,29 cm e 3,25 cm, aos 135 dias, 4,47 cm e 3,83 cm e 4,75 cm e 3,54 cm (Figura 3B).

Largura média para *A. bisphaerica* e *A. sexdens rubropilosa*, respectivamente: aos 45 dias: 3,33 cm e 2,84 cm; aos 135 dias, 4,61 cm e 3,12 cm e 225 dias, 4,45 cm e 2,92 cm (Figura 3C). Em relação à altura, as médias para *A. bisphaerica* e *A. sexdens rubropilosa*, respectivamente: aos 45 dias: 3,05 cm e 2,77 cm, 135 dias, 4,08 cm e 2,96 cm e aos 225 dias, 4,87 cm e 3,33 cm (Figura 3D).

O volume aos 225 dias de fundação diferiu dos períodos 45, 90 e 135 períodos. A média do volume também diferiu entre os períodos 45 e 135 dias de fundação (Figura 4).

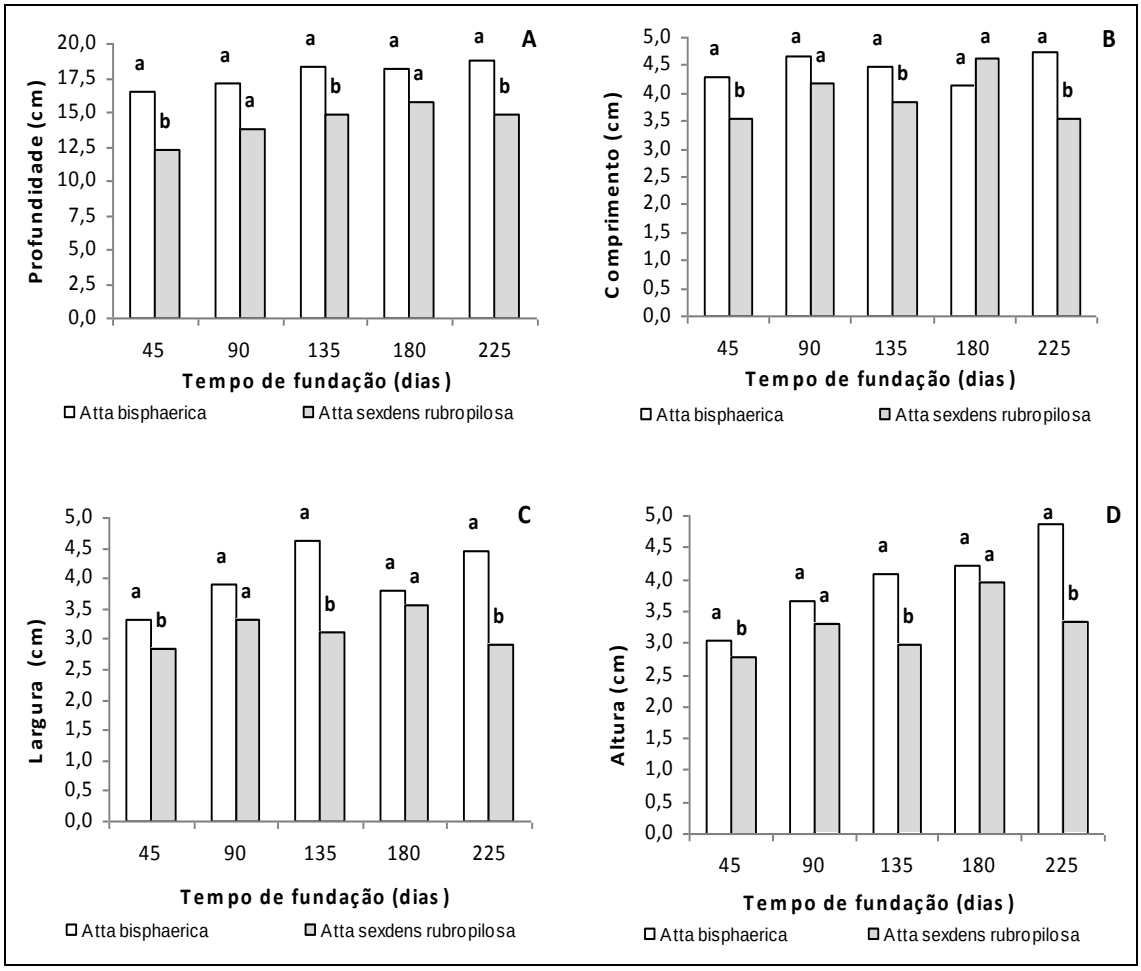

Figura 3. Medidas da câmara inicial (cm) de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa*, em função do tempo de fundação: (A) Profundidade, (B) Comprimento, (C) Largura e (D) Altura, ano 2007.

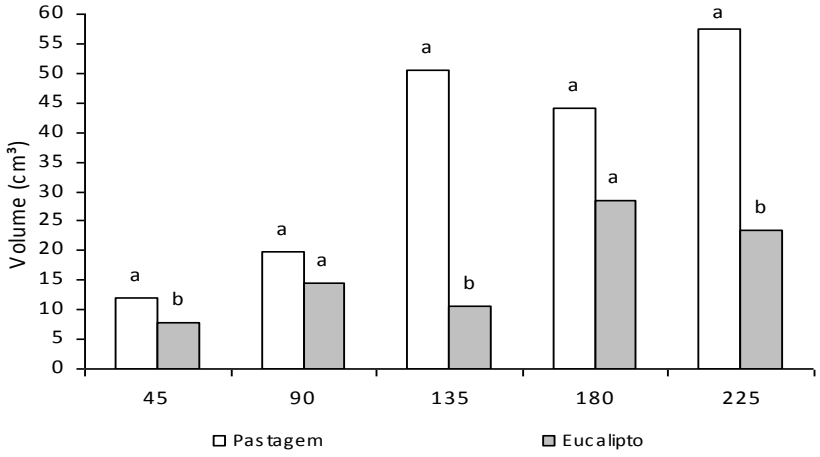

Figura 4. Volume da câmara inicial (cm^3) de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa*, em função do tempo de fundação, ano 2007.

3.2 Período e percentual de escavação da segunda câmara.

3.2.1 *Atta bisphaerica*

A ocorrência de uma segunda câmara em ninhos de *A. bisphaerica* foi verificada nos dois últimos períodos estudados, como consequência da ampliação estrutural do ninho. Aos 180 dias da fundação da câmara inicial, do total de ninhos vivos (n=10), foi verificado que 70% deles (7 ninhos) apresentava o segundo túnel, sendo que em cinco deles a segunda câmara já havia sido escavada (Figura 6, b-e).

Os ninhos com segunda câmara tiveram sua primeira câmara construída a profundidades entre 18,30 e 22,00 cm, sendo a média de 19,73 cm (Tabela 7). Os demais ninhos sem a câmara 2, mais com rainha viva, também estavam no mesmo padrão de profundidade.

As medidas da primeira panela escavada pelas operárias variaram dentro dos seguintes limites: 4,1 cm a 5,8 cm de comprimento, 1,6 a 4,9 cm de largura, 2,9 cm a 5,2 cm de altura e 65,50 cm a 179,00 cm de profundidade. As médias e desvio padrão para comprimento, largura, altura e profundidade da câmara foram, respectivamente: 4,88 ± 0,72 cm, 3,12 ± 1,41 cm, 4,1 ± 0,89 cm e 97,48 ± 36,97 cm.

No último período de escavação (225 dias de fundação) sete ninhos do total (n=9) apresentavam colônia e rainha vivas (77,78%) com presença de novo túnel e segunda câmara. Estes ninhos apresentaram primeira câmara construída entre 17,50 e 25,80 cm, revelando a maior profundidade de "câmara real" já encontrada no período experimental. Contudo, essa câmara certamente já foi ampliada pelo trabalho de escavação da prole adulta e, portanto, não corresponde à profundidade original escavada pela rainha.

Média e desvio padrão para as medidas da câmara 2 escavadas aos 225 dias foram de 3,51±1,30 cm para comprimento, 2,37±1,65 cm para largura, 3,83±1,18 cm para altura e 91,11±25,14 cm para profundidade (Tabela 8). Estes valores foram inferiores às médias encontradas nos ninhos escavados aos 180 dias de fundação.

Considerando os dois períodos de escavação, é possível observar que do total de ninhos escavados (n=62), 19 deles, o que corresponde a 30,64% estavam vivos e, destes (14), 73,68% conseguiram chegar à segunda câmara aos 225 dias de fundação da câmara inicial.

Tabela 7. Medidas da segunda câmara (cm) de *Atta bisphaerica* (Hymenoptera: Formicidae) aos 180 dias de fundação, 2007. Botucatu (SP), 2010.

	Medidas da câmara 2 (cm)					
	Prof.Câm.1	**Prof. Túnel 2**	**Comprim.**	**Larg.**	**Altura**	**Prof. total**
1	22,00	76,00	-	-	-	98,00
2	21,30	87,60	4,20	1,60	3,70	108,90
3	20,50	159,00	5,00	2,50	4,00	179,00
4	19,00	112,00	5,30	4,90	5,20	131,00
5	18,50	67,00	-	-	-	85,50
6	18,50	111,00	5,8	4,30	4,70	129,50
7	18,30	47,20	4,1	2,30	2,90	65,50
Média e DP	**19,73±1,52**	**94,26±36,79**	**4,88±0,72**	**3,12±1,41**	**4,10±0,89**	**113,91±36.97**

Tabela 8. Medidas da segunda câmara (cm) de *Atta bisphaerica* (Hymenoptera: Formicidae) aos 225 dias de fundação, 2007. Botucatu (SP), 2010.

	Medidas da câmara 2 (cm)					
	Prof.Câm.1	**Prof. Túnel 2**	**Comprim.**	**Larg.**	**Altura**	**Prof. total**
1	17,50	28,00	3,80	2,10	4,20	53,90
2	22,30	94,80	5,90	5,50	5,30	123,80
3	22,70	50,50	2,20	1,20	3,10	70,30
4	25,80	91,50	2,70	0,60	2,70	117,5
5	20,30	67,00	2,30	1,60	2,50	97,30
6	21	75,00	3,50	2,10	5,40	96,00
7	19	60,00	4,20	3,50	3,60	79,00
Média e DP	**21,23±2,71**	**66,69±23,38**	**3,51±1,30**	**2,37±1,65**	**3,83±1,8**	**91,11±25,14**

3.2.2 *Atta sexdens rubropilosa*

Dos ninhos escavados de *A. sexdens rubropilosa*, aos 180 dias (n=40), 3,57% apresentaram rainhas vivas e destes apenas um ninho, correspondendo 20% apresentou novo túnel e segunda câmara. O ninho estava a 20 cm somente da câmara fundada pela rainha e 39 cm da superfície do solo. As medidas da câmara foram: 7,00 cm de comprimento, 3,30 cm de largura, 6,10 cm de altura e 39,00 cm de profundidade (Tabela 9) e a rainha ainda estava presente na câmara próxima a superfície. Apesar da segunda câmara se localizar a uma profundidade menor em relação às câmaras construídas por *A. bisphaerica*, as demais medidas foram semelhantes (largura) e até maiores (comprimento e altura). Túnel menos profundo certamente favoreceu escavação de câmaras com maiores dimensões, pois menor foi o tempo gasto com a escavação do canal.

No período de 225 dias da fundação também foi localizado apenas um ninho com novo túnel construído (20%), dos cincos que estava vivos. Contudo a câmara não foi localizada devido dificuldade na escavação em decorrente da alta resistência à penetração no solo, paralisando a escavação quando o canal apresentava 1,5 m de profundidade (Tabela 9).

Tabela 9. Dimensões da câmara 2, construída pelas operárias, aos 180 dias, área eucalipto, ano 2007.

			Medidas da câmara (cm)			
Ninho (dias)	Profund. câmara 1	Profund. Túnel 2	Comprimento	largura	altura	Profund.total
180	19,00	20,00	7,00	3,30	6,10	39,00
225	13,00	> 150,00	-	-	-	-

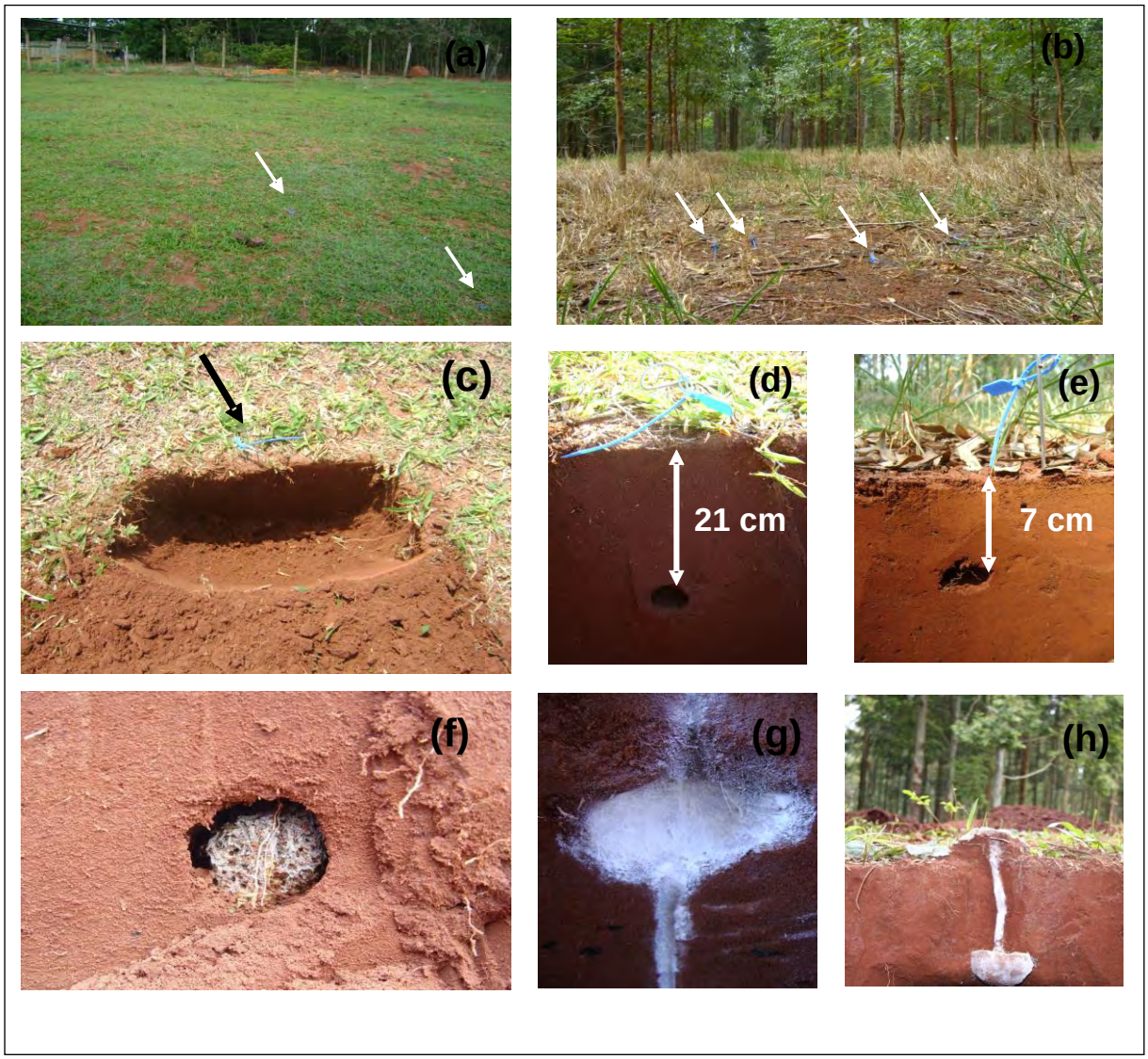

Figura 5. Ninhos selecionados em (a) área de pasto, (b) área de eucalipto, (c) trincheira aberta ao lado do ninho; câmara recém-fundada (aos 45 dias) de (d) *Atta bisphaerica* e (e) *Atta sexdens rubropilosa* (f) formato esférico da câmara inicial de *A. bisphaerica* aos 180 dias; (g - h) formato hemisférico da câmara inicial aos 90 dias para *A. bisphaerica* e *A. sexdens rubropilosa*, respectivamente.

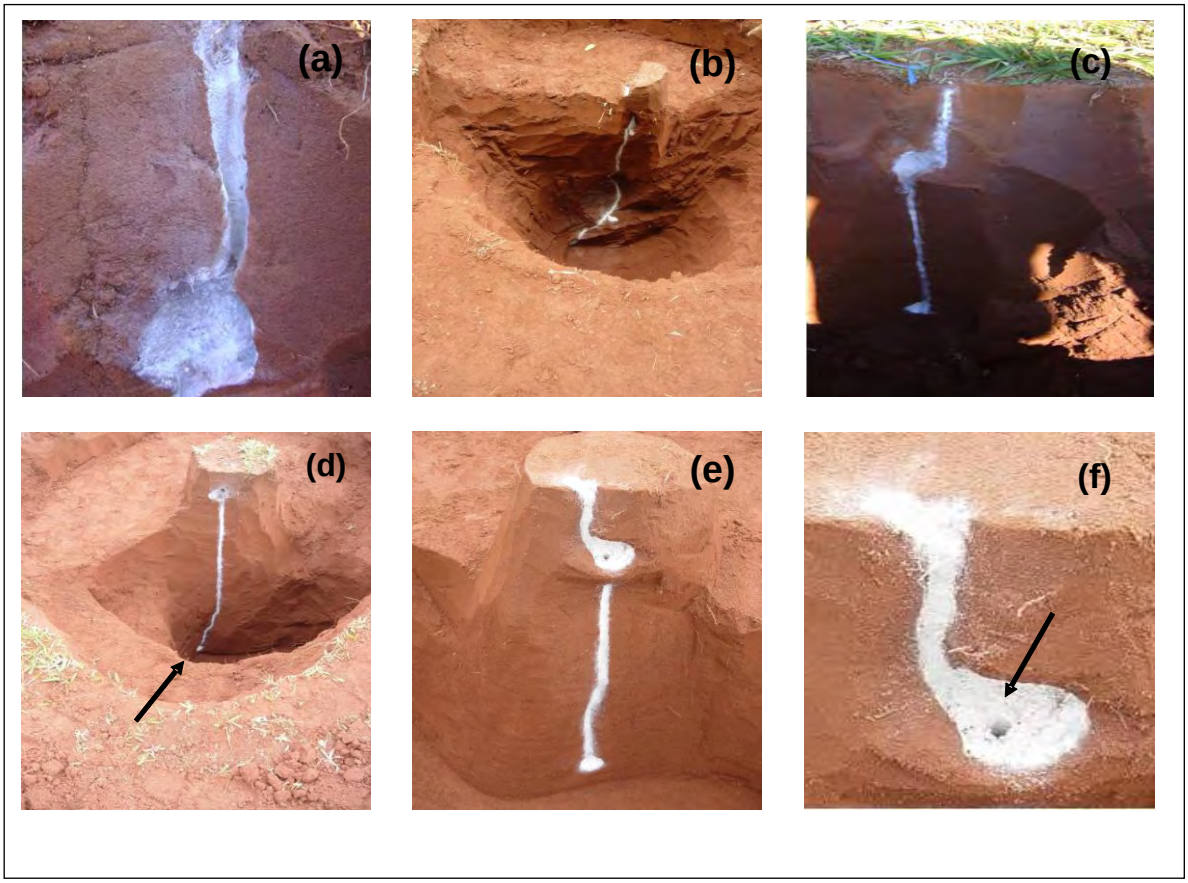

Figura 6. (a) Câmara inicial de *A. sexdens rubropilosa*, (b, c, d, e) ninhos de *A. bisphaerica*, com duas câmaras construídas; (f) câmara inicial de *A. bisphaerica*, mostrando o orifício inicial do segundo túnel escavado.

4. DISCUSSÃO

De acordo com Amante (1972), na dinâmica de construção dos ninhos, as formigas obedecem rigorosamente a critérios de diâmetro, formato e profundidade das câmaras. Os dados coletados nos anos de 2007 a 2009 revelaram que as câmaras recém-fundadas, tanto de *A. bisphaerica* quanto de *A. sexdens rubropilosa* apresentaram formato hemisférico, estando de acordo com a descrição de Autuori (1942) para *A. sexdens rubropilosa*. Com a ampliação das medidas pelo trabalho de escavação desempenhado pelas operárias a câmara adquire o

formato de uma esfera. Jacoby (1950) define a câmara inicial como uma estrutura esférica ou elipsóide, com cúpula fechada e às vezes cuidadosamente alisada.

Embora ninhos adultos de espécies diferentes possam apresentar diferença entre si (GONÇALVES, 1960), ninhos iniciais das duas espécies em estudo, apresentaram formato semelhante nos primeiros meses de fundação. Contudo, em 2007, *Atta bisphaerica* construiu ninhos mais profundos e com maiores medidas de comprimento, largura e altura da câmara do que *Atta sexdens rubropilosa*. Este parece ser o primeiro registro sobre medidas de câmara inicial de *A. bisphaerica*, em condições de campo. Em condições de laboratório, Araújo et al. (2003) encontrou profundidade de 8,83±0,41 cm para câmara fundada por rainha desta espécie. *Atta sexdens rubropilosa* teve ninhos iniciais dimensionados por Autuori (1941) e Jacoby (1943, 1950) e Mariconi (1970).

Em 2007, a diferença de profundidade entre as espécies foi mais acentuada em relação aos demais anos de estudo. A menor profundidade média observada para *A. sexdens rubropilosa* em 2007, pode estar associada a diferenças observadas em relação às condições físicas do solo (compactação) nos pontos de seleção e escavação dos ninhos. Em 2008, com a mudança de área para marcação de ninhos fundados por *A. sexdens rubropilosa*, tal diferença não foi verificada. De acordo com Stein e Xavier (1984), solos compactados podem limitar a profundidade dos ninhos.

Entretanto, a profundidade média dos ninhos de *A. sexdens rubropilosa*, incluindo no ano de 2007 (12,5 ± 2,52 cm), estão conforme dados encontrados no município de Botucatu, à mais de três décadas atrás, em sauveiros recém fundados, sendo localizados a profundidades de 12 a 15 cm (PEREIRA-DA-SILVA, 1975). Também estão de acordo com os valores de profundidade observados por Autuori (1942) que variou de 8,5 a 15,00 cm.

No entanto, o presente estudo revelou a menor profundidade de fundação já encontrada para ninhos de *A. sexdens* (7,00 cm) (Figura 5e). O mesmo não pode ser afirmado para a máxima profundidade encontrada que foi de 17,50 cm, pois Ribeiro (1972) encontrou câmaras variando entre 8,00 e 22,00 cm de profundidade, enquanto Ribeiro e Woessner (1982) encontraram 31,80 e 32,10 cm de profundidade, para câmaras de *A. sexdens sexdens* em diferentes anos de estudo

À rainha cabe a função de fundação e manutenção do ninho inicial, às operarias, fica a responsabilidade de aumentar o ninho estruturalmente, com a escavaçao de novos túneis e outras câmaras (AUTUORI, 1941; AMANTE, 1972; RODRIGUES; RIBEIRO, 1983).

Ampliações nas dimensões do ninho inicial foram evidenciadas na maioria das avaliações, em função do aumento na população dentro do ninho, inicialmente composto apenas pela rainha e pequena porção do fungo simbionte. Assim, até 90 dias de escavação não foi observado diferença no tamanho da câmara, o que já era esperado, pois havia presença de poucos adultos nesse período, sendo que em alguns ninhos só foi encontrada a rainha e o fungo.

De acordo com Autori (1942), após emergirem, os primeiros adultos (62 – 66 dias), permanecem dentro do ninho em torno de 20 dias, realizando a demorada tarefa de limpeza da rainha. Mariconi (1970) caracteriza como jardineiras, as primeiras operárias a habitarem a colônia. Essa casta normalmente se ocupa do cultivo do fungo e, portanto é provável que somente em torno dos 90 dias, com a presença de operárias maiores tenham-se realizado outras tarefas dentro e fora da ninho. Conforme Jacoby (1950), a câmara fundada pela rainha tem suas dimensões ampliadas a cada dia pelas operárias. Isso foi evidenciado através do aumento das medidas da câmara, especialmente da altura, resultando no aumento da profundidade do ninho e na mudança de formato da mesma de hemisférico a esférico.

A literatura relacionada ao aumento do ninho em números de câmaras é escassa. O presente estudo revelou o período de 4, 5 meses (135 dias) para escavação da segunda câmara, em ambas as espécies. Tal resultado discorda de Mariconi (1970) que descreve o período de 15 meses desde a fundação, para escavação do novo canal e segunda câmara. Porém os resultados se aproximam do estudo de Jacoby (1943) com *A. sexdens rubropilosa*, onde ocorreu construção da segunda câmara aos 4 e 5 meses após a fundação da colônia.

Para a espécie *A. bisphaerica*, a maioria dos ninhos com 6 meses (180 dias) de fundação apresentaram a segunda câmara escavada. Porém para maioria desses ninhos a colônia e fungo ainda se encontravam na primeira câmara. Em poucos ninhos apenas foi observado porções da cultura do fungo em plena fase de transferência de câmara, pelas operárias. Esse comportamento pode sugerir que a câmara 2 ainda não estava completamente construída, pois de acordo com Jacoby (1943), a colônia nunca estabelece o fungo em panelas em construção, mais apenas em câmaras finalizadas.

A transferência da colônia para a segunda câmara fundada parece ser um momento crítico para o grupo, sendo observado para maioria dos ninhos, em ninhos Assim, o simples fato de construção da câmara não significa sucesso no estabelecimento da colônia. De acordo com o observado em campo, no período correspondente à construção e transporte para nova câmara foi verificando maior mortalidade de rainhas. Tal afirmação corrobora com o sugerido por Autuori (1950), que define a fase de escavação da segunda câmara como um dos períodos críticos para a colônia em estabelecimento.

Contudo, uma vez conseguido o transporte da colônia sem prejuízo à mesma, as chances de estabelecimento até a fase adulta são favorecidas, pois em maiores profundidades são menores as variações de temperatura e umidade, e ainda, conforme Bento et al. (1991) em maiores profundidades ocorre menor população microbiana, tanto entomopatogênicos quanto competidores do fungo simbiôntico, levando consequentemente à maior proteção e estabilidade da colônia. Conforme Jacoby (1943) em maiores profundidades, com exceção dos tatus, a colônia encontra-se protegida dos demais inimigos naturais.

5. CONCLUSÕES

- A câmara inicial das espécies *A. bisphaerica* e *A. sexdens rubropilosa* apresentou semelhante padrão de formato nos primeiros meses de fundação, inicialmente hemisférico e posteriormente esférico, a partir da ampliação das medidas;

- Câmaras fundadas pela rainha de ambas as espécies foram ampliadas, resultando em alteração do volume, em função do aumento especialmente das medidas altura e largura;

- Em ambas as espécies estudadas, o período de construção da segunda câmara ocorreu após quatro meses de fundação do ninho.

- De acordo com as condições do presente estudo, a segunda câmara construída pela espécie *A. bisphaerica* foram localizadas entre 65,50 e 179 cm de profundidades.

Capítulo 2

MORTALIDADE DE RAINHAS DE *Atta bisphaerica* E *Atta sexdens rubropilosa* DURANTE OS PRIMEIROS MESES DE FUNDAÇÃO DO NINHO.

RESUMO

Segundo a literatura, a sobrevivência da rainha de *Atta* spp., após fundação do ninho é muito baixa, em torno de 0,05%, até o primeiro ano de fundação. Esse estudo teve como objetivo avaliar a mortalidade natural de rainhas de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa*, em ninhos iniciais, através de escavações periódicas. Em 2007, as escavações aconteceram aos 45, 90, 135, 180 e 225 dias de fundação. Em 2008, aos 20, 45 e 90 dias e aos 60 dias em 2009. Em cada ano foram escavados cerca de 40 ninhos de cada espécie. Para os resultados da mortalidade foram ajustados modelos de regressão logística, obtendo-se a significância pelo teste da razão de verossimilhança e sendo apresentadas as razões das chances ("Odds Ratio"). Em função do tempo de fundação, em 2007, foi revelada menor mortalidade de rainhas aos 45 dias e maior aos 225 dias, sendo, respectivamente de 2,83 % e 73,53 % para *A. bisphaerica* e de 20,59 % e 88,89 % para *A. sexdens rubropilosa*. Do total de ninhos escavados, a taxa de mortalidade foi de 38,10 % para *A. bisphaerica* e de 62,59 % para *A. sexdens rubropilosa*. Em 2008, as avaliações somente foram realizadas até os 90 dias de fundação e não mostrou diferenças na mortalidade entre os períodos, para as duas espécies. A mortalidade total no segundo ano foi de 19,00 % e 32,38 % para *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa*, respectivamente. No último ano (2009) a mortalidade foi de 34,82 % para *A. bisphaerica* e de 68,42 % para segunda espécie. O ajuste do modelo de regressão logística revelou que, em 2007, a chance de mortalidade das rainhas de *Atta sexdens rubropilosa* foi 2,718 vezes maior do que rainhas de *A. bisphaerica*; em 2008, foi de 2,042 e em 2009 de 1,912 vezes mais. A curva de sobrevivência para ninhos marcados em 2008 e acompanhados sem escavação revelou que a sobrevivência em ambas as espécies é semelhante até os cinco meses de fundação, aproximadamente, e que a taxa de sobrevivência até esse período é alta.

Palavras Chave: Formiga cortadeira, sobrevivência, fundação.

Chapter 2

MORTALITY OF THE QUEENS OF *Atta bisphaerica* AND *Atta sexdens rubropilosa* DURING THE FIRST MONTHS OF NEST FOUNDATION.

SUMMARY

According to the literature, the survival of the queen of *Atta* spp. after the foundation of the nest is very low, around 0.05% until the first year of foundation. This study was undertaken to evaluate the natural mortality of the queens of *Atta bisphaerica* and *Atta sexdens rubropilosa* in initial nests, through periodic excavations in the years 2007, 2008 and 2009. In each year were excavated about 40 nests of each species. For the mortality results were adjusted logistic regression models, resulting in significance with the likelihood ratio test is presented and the odds ratios. Due to the time of founding in 2007, was revealed lower queen mortality at 45 days and higher at 225 days, respectively of 2.83% and 73.53% for *A. bisphaerica* and 20.59% and 88.89% for *A. sexdens rubropilosa*. Of the total number of nests excavated, the mortality rate was 38.10% for *A. bisphaerica* and 62.59% for *A. sexdens rubropilosa*. In 2008, assessments were only performed at 90 days of foundation and showed no difference in mortality between the periods, for both species. The overall mortality in the second year was 19% and 32.38% for *Atta bisphaerica* and *Atta sexdens rubropilosa*, respectively. Last year the mortality was 34.82% for *A. bisphaerica* and 68.42% for the second species. The fit of the logistic regression model revealed that in 2007, the chance of mortality of the queens of *Atta sexdens rubropilosa* was 2.718 times higher than queens of *A. bisphaerica*; in 2008 was 2.042 and in 2009 was 1.912 times higher. The survival curve for nests marked in 2008 and followed without excavation revealed that the survival of both species is similar until five months of the foundation, and that the survival rate until this period is high.

Keywords: Leaf-cutting ant, survival, foundation.

1. INTRODUÇÃO

O período de fundação do ninho representa um dos momentos mais críticos para a sobrevivência e estabelecimento da colônia (WILSON, 1971), exigindo grande esforço da fundadora. Esta, além da construção da câmara, utiliza reserva corporal para manter suas atividades até as primeiras operárias emergirem e iniciarem o forrageamento (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990), mantém o cuidado com a prole, cultivo do fungo simbionte e limpeza própria e da colônia (AUTUORI, 1942).

O sucesso na fundação e estabelecimento do novo sauveiro, portanto, depende da sobrevivência da rainha (AUTUORI, 1941; ARAÚJO et al., 2003), o que na maioria das vezes é comprometido, pois a chance de mortalidade da mesma é grande durante a revoada e na fase inicial de fundação (AUTUORI, 1950).

Isso se dá uma vez que a colônia apresenta alta vulnerabilidade à ação de predadores, competidores e micro-organismos patogênicos (AUTORI, 1950; FERNÁNDEZ et al., 2004). O próprio solo utilizado para fundação do ninho pode ser considerado um grande reservatório de fungos entomopatogênicos. Até mesmo o substrato em que cresce o fungo simbionte representa um meio favorável ao desenvolvimento de diversos

micro-organismos (PAGNOCCA, 1997; LITTLE et al., 2006), dentre eles fungos, bactérias e leveduras.

A vulnerabilidade aumenta uma vez que, para a existência da colônia, é necessário a presença do fungo simbionte o que requer das formigas proteção de si e do fungo, que também encontra-se constantemente ameaçado por micro-organismos presentes no solo e no substrato ofertado (LITTLE et al., 2006). O cuidado com o fungo tem início logo após a fundação do novo ninho exigindo das rainhas estratégias de higiene (FERNÁNDEZ-MARIN et al., 2004).

As condições ambientais também exercem influência sobre o sauveiro inicial, pois o teor de nutrientes no solo e fatores climatológicos, como chuvas fortes e abundantes também podem influenciar no processo de fundação de uma nova colônia (BENTO et al., 1991), afetando diretamente a rainha ou o fungo simbionte, o que indiretamente também levará a morte da fundadora. Isso ocorre devido à estreita associação de dependência entre formiga e fungo *Leucogaricus gongylophorus*.

Esse tipo de mutualismo leva a fêmea virgem a carregar uma pequena porção do fungo ao sair do formigueiro de origem, através da cavidade infrabucal (DELLA LUCIA; ARAÚJO, 1993). Dessa forma, o sucesso da colônia recém-fundada também esta diretamente relacionada à sobrevivência do fungo simbionte, sendo necessárias condições climáticas adequadas para o bom desenvolvimento do mesmo, o que nem sempre acontece.

Estudos que representam diferentes fases de desenvolvimento de colônias são relativamente raros e a maioria tem focado em mudanças ontogênicas na morfologia e comportamento (TSCHINKEL, 1988; WETTERE, 1994). Pouco se tem estudado sobre os fatores que afetam a sobrevivência das colônias ou o crescimento das mesmas (VIEIRA NETO; VASCONCELOS 2010).

O conhecimento sobre o sucesso na fundação e sobrevivência da rainha (consequentemente da colônia), durante os primeiros meses de implantação do ninho, é importante e de aplicação prática, pois, se confirmados os altos índices de mortalidade na fase inicial do ninho, desnecessárias são intervenções visando à mortalidade das colônias durante os primeiros meses de fundação, exceto e áreas com plantio jovem de determinadas culturas, como por exemplo, eucalipto.

Diante do exposto, o estudo teve como objetivo verificar a taxa de mortalidade natural de rainhas de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa*, nos primeiros meses de fundação do ninho.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização da área experimental

O trabalho foi realizado no município de Botucatu/SP. Ninhos de *Atta bisphaerica* foram estudados em pontos da Fazenda Santana, situada a 22°50' S e 48°26' W. Ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* foram selecionados em área com plantio de eucalipto, pertencente à Fazenda Experimental Lageado- FCA/UNESP (22°50'S e 48°26' W). O solo de ambas as áreas pertencem à classe Latossolo Vermelho Escuro.

2.2 Marcação e escavação dos ninhos

Após a revoada, foram marcadas 500 fundações para cada área de estudo e por ano (2007 e 2008). Em 2009, apenas 40 ninhos por área. Para tal foram utilizadas estacas de arame, sendo o ninho marcado somente após o fechamento do orifício inicial. As estacas foram fincadas (fixadas) no solo à 5,00 cm do orifício escavado, no sentido sul do ninho, de acordo com o Norte Magnético, para facilitar a localização.

A metodologia de escavação foi semelhante à utilizada por Autuori (1942) e Pretto (1996). Foi aberta uma trincheira ao lado do ninho, expondo o canal e a câmara, sem danos aos mesmos e à rainha. Para isso foram utilizadas ferramentas manuais.

As escavações aconteceram aos 45, 90, 135, 180 e 225 dias da fundação, no ano de 2007 e aos 20, 45 e 90 dias no ano de 2008. No ano de 2009, apenas aos 60 dias de fundação. A cada período determinado foram abertos 40 ninhos verificando-se a sobrevivência ou não da rainha. As rainhas vivas, a prole (quando presente) e o fungo por elas cultivado foram colocados em potes com gesso no fundo, umedecido, e conduzidas para laboratório de Insetos Sociais Pragas da FCA/UNESP. Rainhas mortas foram colocadas em recipientes esterilizados para posterior análise microbiológica.

2.3 Avaliação da sobrevivência de colônias em campo, sem escavação.

Do total de ninhos marcados em 2008 (500), a maioria foi acompanhada sem escavação, verificando-se a sua sobrevivência ou mortalidade das colônias, através da atividade dos mesmos. Para isso, levou-se em conta principalmente a presença de terra depositada na superfície do ninho e a presença de olheiro.

Por ocasião das escavações, as colônias vivas foram colocadas em potes com gesso no fundo e conduzidas para Laboratório de Insetos Sociais Pragas da FCA/UNESP. Rainhas mortas foram colocadas em recipientes esterilizados para posterior análise microbiológica.

2.4 Fatores ambientais possivelmente relacionados à mortalidade da rainha

2.4.1 Fatores bióticos

Para avaliação das possíveis causas da mortalidade de rainhas, também foram coletadas uma amostra de 500 rainhas de *Atta* spp., principalmente e *A. bisphaerica* e *A. sexdens rubropilosa* foi coletada no Campus da FCA/UNESP, no período da revoada, logo após descerem ao solo para fundação dos ninhos. A coleta ocorreu em dois anos consecutivos (2007 e 2008), totalizando 1000 espécimes no período de estudo. As rainhas recém coletadas foram armazenadas em recipientes plásticos com 11 cm de diâmetro, 8 cm de altura, contendo 1 cm de gesso no fundo e a temperatura do laboratório foi mantida à 24°C. A umidade do pote foi controlada adicionando-se água destilada. Diariamente foi feita observação das rainhas e as encontradas mortas foram estudadas para verificação da possível causa da mortalidade.

As rainhas mortas com início de extrusão de fungo foram desinfetadas para isolamento dos mesmos. A desinfecção ocorreu superficialmente através da imersão por dois minutos em solução de álcool 70%, em hipoclorito de sódio 2% e, posteriormente, em água destilada. Em seguida, retirou-se uma porção interior do tecido do tórax com bisturi esterilizado. Tal fragmento foi inoculado em BDA suplementado com penicilina-G e incubado à 25°C no escuro durante três a quatro dias. Os fungos que se desenvolveram nesses fragmentos foram isolados, purificados e armazenados à 9°C. Os isolados representativos foram identificados através de métodos clássicos descritos na literatura, principalmente, baseados na morfologia

da colônia e das estruturas de reprodução (DOMSCH et al., 1980; SAMSON et al. 2000; SUNG et al., 2007). A desinfecção e isolamento dos fungos ocorreram em câmara asséptica.

2.4.2 Fatores abióticos

2.4.2.1 Precipitação, temperatura e umidade atmosférica

Os dados de precipitação, temperatura e umidade relativa do ar foram extraídos da Estação Agrometeorológica da Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA/UNESP), Campus de Botucatu (SP).

2.4.2.2 Temperatura e umidade do solo

Para verificação das condições características físicas do solo durante a fundação e estabelecimento do sauveiro, em 2008, fez-se a verificação da temperatura, umidade e resistência à penetração dos solos pertencentes às áreas onde os ninhos foram fundados e estudados.

A temperatura foi registrada através da instalação de um termômetro (data logger) à 20 cm de profundidade do solo, desde o momento da revoada até 90 dias de fundação dos ninhos. Em cada área foi utilizado um termômetro, sendo estes colocados ao solo às 17:00 horas em ambas as áreas de estudo.

A umidade do solo também foi avaliada, através de coletas semanais, a começar na revoada. As amostras de solo foram colocadas em placa de Petri e conduzidas ao laboratório. Foram realizadas 10 amostras em cada área, à profundidade de 20 cm. em estufa à e depois pesadas novamente para cálculo da umidade. O solo foi pesado, seco em estufa à 150 ^{o}C por 24 horas e pesado novamente para o cálculo da umidade. As coletas foram realizadas também até seis meses de fundação do ninho.

2.5 Análises Estatísticas

Para a análise dos resultados de mortalidade das rainhas de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa*, ajustou-se o modelo de regressão logística, obtendo-se significância pelo teste da razão de verossimilhança ("Likelihood Ratio"), sendo que o nível de significância adotado foi de $\alpha = 0,05$. Foram apresentadas as razões das chances ("Odds Ratio") e os respectivos intervalos de confiança a 95%.

A análise de sobrevivência dos ninhos não escavados foi feita através de uma curva de sobrevivência de ambas as espécies. Para isso, ninhos inativos (mortos) foram codificados como "0" e ninhos considerados ativos (sobreviventes) enquadram-se na codificação "1". As análises foram realizadas utilizando-se o programa SAS 9.2 for Windows.

3 RESULTADOS

3.1 Mortalidade de rainhas de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa* em ninhos recém-fundados

3.1.1 *Atta bisphaerica*

Os resultados das escavações realizadas mostraram que a mortalidade de rainhas foi menor nos primeiros períodos de escavação, ou seja, com menor tempo de fundação, verificando-se tendência de aumento na taxa de mortalidade com a idade do ninho. Isso foi verificado principalmente em 2007, quando as escavações foram realizadas até os 225 dias de fundação.

Assim, para *A. bisphaerica* a menor taxa de mortalidade de rainha ocorreu aos 45 dias da fundação (2,94%) enquanto que aos 225 dias foi registrado o maior percentual de rainhas mortas (73,53%) (Figura 1A). Houve diferença entre os períodos 45, 90 (22,85%) e 135 (22,22%), em relação aos 180 (58,62%) e 225 dias ($p=0,0010$). O percentual nos últimos períodos, na realidade, poderia ser maior, visto que ninhos encontrados vivos poderiam apresentar rainhas mortas no período seguinte, caso a colônia não tivesse sido retirada do solo.

Por meio do cálculo da razão das chances, os intervalos de confiança a 95% de probabilidade revelaram significância para os períodos 45, 90 e 135 dias em relação ao tempo 225 dias, ou seja, a mortalidade foi superior no tempo de 225 dias de fundação (Tabela 1). Logo, fazendo a inversão, a chance de sobrevivência de rainhas no período 45 dias foi 90,91 vezes maior do que no período 225 dias. Aos 90 e 135 dias de fundação do ninho as chances de sobrevivência foram, respectivamente, de apenas 4,69 e 9,71 vezes mais do que no último período.

No ano seguinte (2008), os resultados mostraram que a taxa de mortalidade foi de: 22,22% aos 20 dias, 16,67% aos 45 dias e 17,86% aos 90 dias de fundação. Não foi verificada diferença na taxa de mortalidade entre os períodos (Figura 1B).

O cálculo da razão das chances para 2008 mostrou que a chance de mortalidade de *A. bisphaerica* no tempo 20 e 45 dias não diferiu da mortalidade no tempo 90 dias de fundação (Tabela 2).

Comparando os períodos 45 e 90 dias de fundação entre os anos 2007 e 2009, verificou-se que a mortalidade aos 45 dias foi menor par ao ano de 2007, enquanto que aos 90 dias a mortalidade foi semelhante entre os dois anos (Figura 1C).

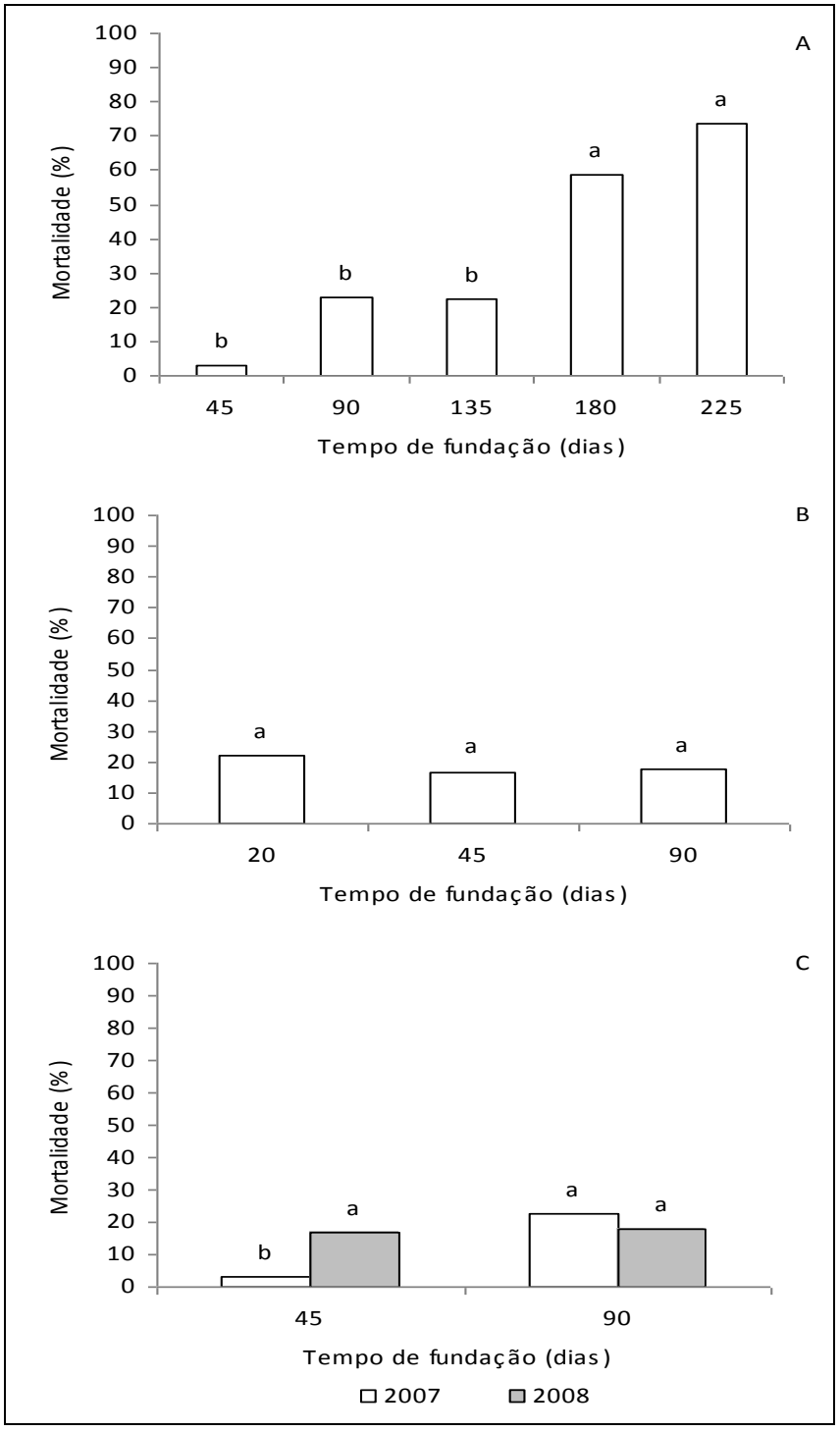

Figura 1. Mortalidade (%) *A. bisphaerica* (Hymenoptera: Formicidae): (A) mortalidade de rainhas por tempo de fundação do ninho (dias), 2007; (B) mortalidade por tempo de fundaçãodo ninho (dias), 2008 e (C) mortalidade entre 2007 e 2008 nos períodos 45 e 90 dias de fundação.

Tabela 1. Razão das Chances ("Odss Ratio") para mortalidade de *Atta bisphaerica* (Hymenoptera: Formicidae), em função do tempo de fundação, ano 2007. Botucatu (SP), 2010.

Período de fundação (dias)	Razão das chances (mortalidade)	IC (95%)	Sobrevivência
45 *versus* 225	0,011 *	0,001 – 0,092	90,91
90 *versus* 225	0,213 *	0,076 – 0,593	4,69
135 *versus* 225	0,103 *	0,034 – 0,307	9,71
180 *versus* 225	0,510 ns	0,176 – 1,474	1,96

IC: Intervalo de Confiança a 95% de confiabilidade. * significativo; ns: não significativo.

Tabela 2. Razão das Chances ("Odss Ratio") para mortalidade de *Atta bisphaerica* (Hymenoptera: Formicidae), em função do tempo de fundação, em ninhos iniciais, ano 2008. Botucatu (SP), 2010.

Período de fundação(dias)	Razão das chances (mortalidade)	IC (95%)	Sobrevivência
20 *versus* 90	1,314 ns	0,378 – 4,569	-
45 *versus* 90	0,920 ns	0,249 – 3,393	1,09

IC: Intervalo de Confiança a 95% de confiabilidade. * significativo; ns: não significativo.

3.1.2 *Atta sexdens rubropilosa*

No primeiro ano de estudo (2007), a mortalidade também foi menor aos 45 dias para *Atta sexdens rubropilosa*, revelando 20,59% de rainhas mortas, enquanto que aos 225 dias essa taxa subiu para 88,89 %, diferindo significativamente ($p<0,0001$). No tempo 90, 135 e 180 dias a mortalidade foi, respectivamente, 66,67 %, 67,86 % e 74,07 % e também deferiram do tempo 45 dias (Figura 2A). A freqüência de rainhas mortas foi próxima aos 90 e 135 dias, sendo resultado semelhante observado para os ninhos de *Atta bisphaerica*.

O valor calculado da razão das chances mostrou que apenas no período de 45 dias a mortalidade foi significativamente diferente em relação à mortalidade no tempo 225 dias de

fundação: 0,047 (IC95%: 0,012 – 0,182) (Tabela 3). Logo, a chance de sobrevivência da rainha foi de 21,28 vezes mais aos 45 dias.

Em 2008, a mortalidade variou de 26,47% a 38,89 %, não apresentando diferença entre os três períodos avaliados (p=0,5344) (Figura 2B), semelhante ao ocorrido com a espécie *A. bisphaerica*.

A razão das chances estimadas para este ano, mostrou que a mortalidade aos 90 dias foi significativamente maior em relação à mortalidade nos períodos 20 e 45 dias. Ou seja, no período 20 dias o valor da razão foi de 0,047 (IC95%: 0,211 – 0,931) e no período 45 dias foi de 0,129 (IC95%: 0,059 – 0,281) (Tabela 4). Assim, as chances de sobrevivência foram de 2,26 e 7,75 vezes mais para os períodos 20 e 45 dias, respectivamente, comparado aos 90 dias de fundação.

Comparando os períodos 45 e 90 dias de fundação entre os anos 2007 e 2009, verificou-se que a mortalidade aos 45 dias foi semelhante entre os dois anos de estudo e maior significativamente em 2007, aos 90 dias de fundação (Figura 2C).

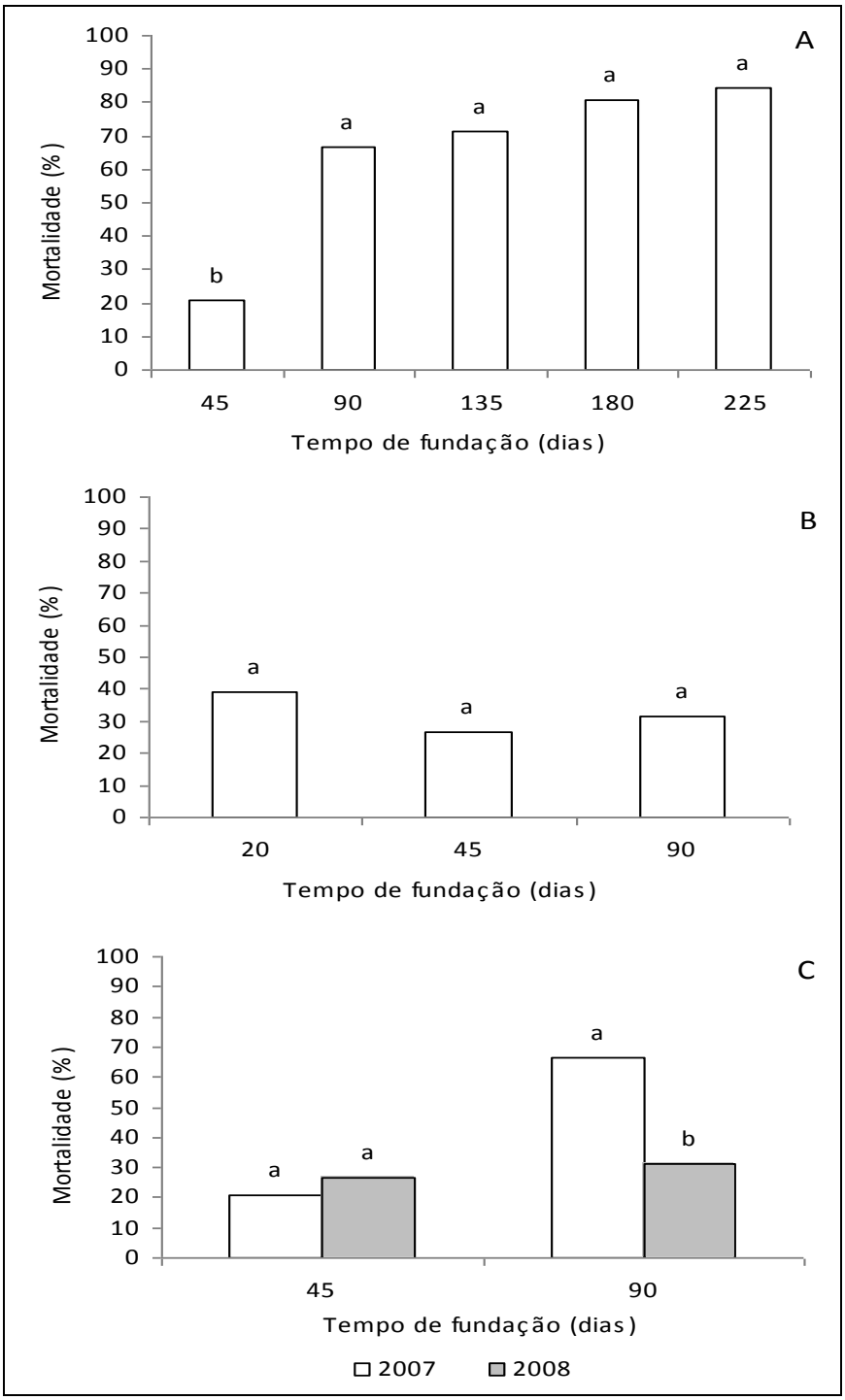

Figura 2. Mortalidade (%) de *A. sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae): (A) mortalidade por tempo de fundação do ninho (dias), 2007; (B) mortalidade por tempo de fundação do ninho (dias), 2008 e (C) mortalidade entre 2007 e 2008 nos períodos 45 e 90 dias de fundação.

Tabela 3. Razão das Chances ("Odss Ratio") para mortalidade de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae), em ninhos iniciais, em função do tempo de fundação, ano 2007. Botucatu (SP), 2010.

Período de fundação (dias)	Razão das chances (mortalidade)	Intervalo de confiança (95%)	Sobrevivência
45 *versus* 225	0,047 *	0,012 – 0,182	21,28
90 *versus* 225	0,364 ns	0,100 – 1,318	2,78
135 *versus* 225	0,455 ns	0,119 – 1,744	2,20
180 *versus* 225	0,764 ns	0,180 – 3,237	1,31

IC: Intervalo de Confiança a 95% de confiabilidade. * significativo; ns: não significativo.

Tabela 4. Razão das Chances ("Odss Ratio") para mortalidade de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae), em ninhos iniciais, em função do tempo de fundação, ano 2008. Botucatu (SP), 2010.

Período de fundação (dias)	Razão das chances (mortalidade)	Intervalo de confiança (95%)	Sobrevivência
20 *versus* 90	1,388 ^{ns}	0,522 – 0,369	-
45 *versus* 90	0,785 ^{ns}	0,277 – 2,231	1,27

IC: Intervalo de Confiança a 95% de confiabilidade. * significativo; ns: não significativo.

3.1.3 Comparação entre a mortalidade de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa*

Comparando-se as duas espécies, em 2007, foi verificado diferença na taxa de mortalidade entre elas nos períodos 45, 90 e 135 dias de fundação. Aos 45 dias a mortalidade foi de 2,83% para *A. bisphaerica* e 20,59% para *A. sexdens rubropilosa* (p=0,0239), aos 90 dias de 37,14% e 66,67% para primeira e segunda espécie, respectivamente (p=0,0149) e aos 135 a mortalidade foi de 22,22% para *A. bisphaerica* e 67,86% para *A. sexdens rubropilosa* 1% (p < 0,0001). Observa-se um aumento de 36,40% na taxa de mortalidade entre os 135 e 180 dias na espécie *A. bisphaerica*, não diferindo de *A. sexdens rubropilosa* nos dois últimos períodos de estudo: 180 dias: p= 0,070 e 225 dias: p=0,3017 (Figura 3A).

O cálculo da razão das chances para cada período confirma que a mortalidade foi maior para espécie *A. sexdens rubropilosa*, comparada à *A. bisphaerica* (Tabela 5). Porém valores significativos ocorreram aos 90 e 135 dias. Aos 90 dias, as chances de mortalidade foi de 3,38 vezes mais (IC95%:1,25 - 9,17) e aos 135 dias de 8,75 vezes mais (IC95%=2,811 – 27,24) para *A. sexdens rubropilosa*.

Em 2008, não ocorreu diferença na mortalidade entre as espécies, em função do tempo de fundação (Figura 3B). O cálculo da razão das chances confirma esse resultado, pois a chance de mortalidade para ambas as espécies foi semelhante nos três períodos estudados (Tabela 6).

Entretanto, a avaliação da mortalidade das rainhas em função do ano de estudo, revelou que para *A. bisphaerica* foi significativamente menor comparada à *A. sexdens rubropilosa*, nos três anos. Em 2007, as taxas foram de 38,10 % para *A. bisphaerica* e de 62,59% para *A. sexdens rubropilosa* ($p<0,0001$); em 2008, a mortalidade foi de 19,00 e 32,38%, respectivamente, para primeira e segunda espécie ($p=0,0200$) e finalmente em 2009, a taxa de mortalidade para *A .bisphaerica* foi de 34,82 e 68,42% para *A. sexdens rubropilosa* ($p=0,0200$) (Figura 7). Os valores mostram que a probabilidade de sobrevivência de *A. bisphaerica* foi cerca de 50% mais do que a espécie *A. sexdens rubropilosa*, nos três anos de estudo.

A razão das chances confirma tal resultado, apresentando maior chance de morte para *A. sexdens rubropilosa* em todos os períodos sendo que em 2007, foi de 2,718 vezes mais (IC95%:1,722 - 4,291), em 2008 foi de 2,042 vezes maior (IC95%: 1,071 - 3,893) e em 2009 de 1,912 vezes mais (IC95%: 2,633 – 19,986) do que *A. bisphaerica* (Tabela 7).

Somando-se os valores de mortalidade das duas espécies por ano de estudo, foi possível mostrar que a taxa de mortalidade de *Atta* em 2007 foi 49,68 % até os 7 meses de fundação; 26,09% em 2008 até os três meses de fundação e 63,41% em 2009, aos dois meses de fundação, ocorrendo diferença estatística entre os anos ($p<0,0001$) (Figura 4).

Através do cálculo de razão das chances, em 2009 a chance de morte das rainhas foi significativamente superior comparada aos anos anteriores, a 95% de probabilidade, sendo a razão da chance de 0,570 em relação à 2007 e de 2,204 em relação à 2008 (Tabela 8).

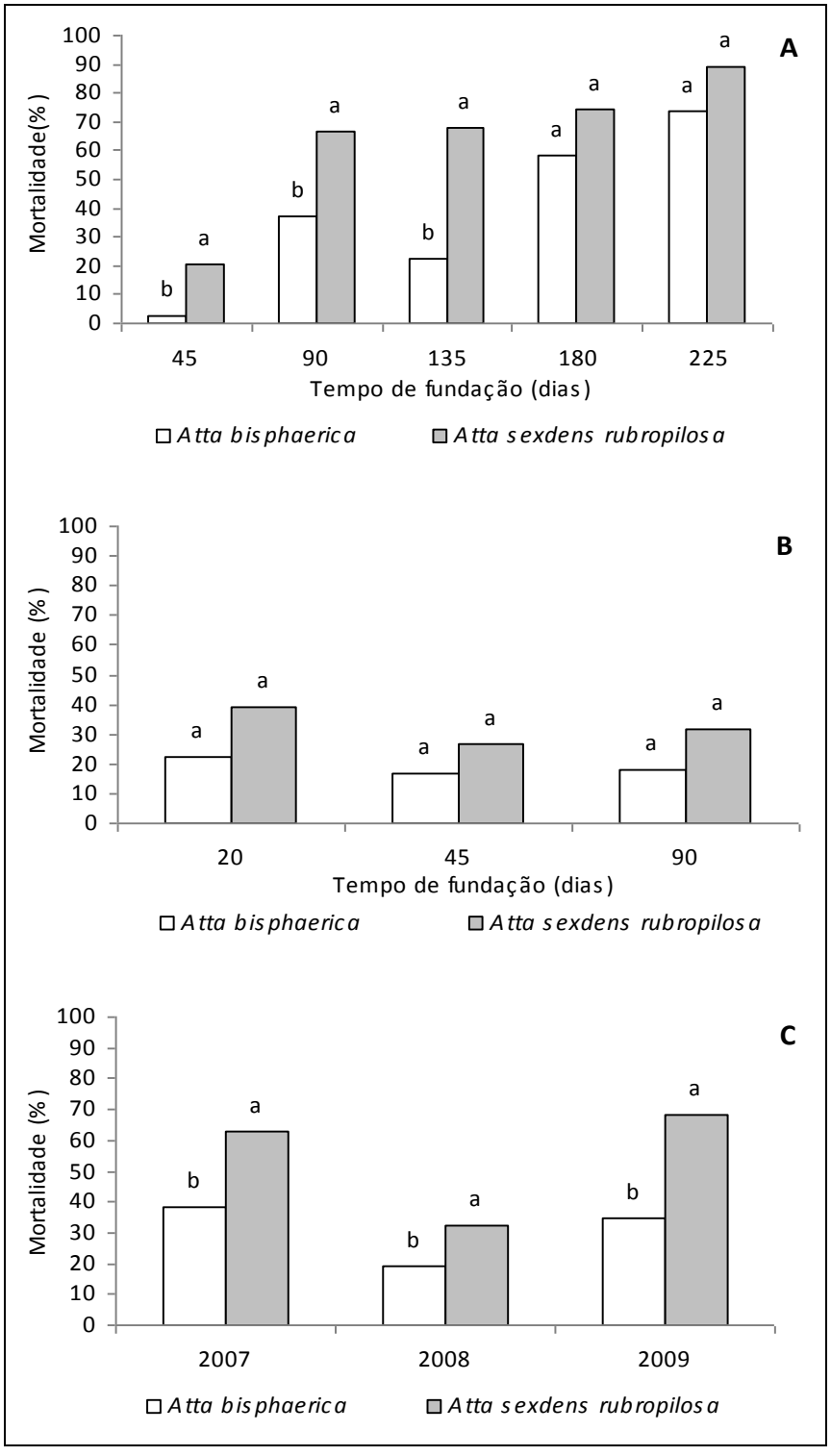

Figura 3. Taxa de mortalidade entre *A. bisphaerica e A. sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae): (A) mortalidade por tempo de fundação do ninho (dias), 2007; (B) mortalidade por tempo de fundação do ninho (dias), 2008; (C) mortalidade por ano de fundação.

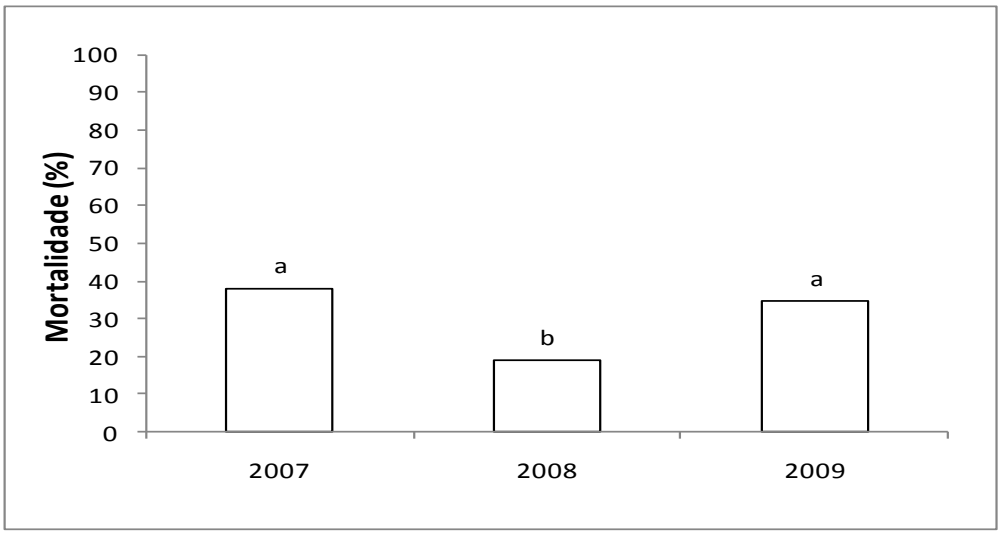

Figura 4. Mortalidade de rainhas de *Atta* (Hymenoptera: Formicidae), em função do ano de escavação.

Tabela 5. Razão das Chances ("Odss Ratio") para mortalidade entre *Atta bisphaerica* e *A. sexdens rubropilosa,* ano 2007. Botucatu (SP), 2010.

Período	Espécie (mortalidade)	Razão das chances	IC (95%)
45 dias	*Atta sexdens rubropilosa* versus *Atta bisphaerica*	8,56 ns	0,99 - 73,89
90 dias	*Atta sexdens rubropilosa* versus *A. bisphaerica*	3,38 *	1,25 - 9,17
135 dias	*Atta sexdens rubropilosa* versus *Atta bisphaerica*	8,75 *	2,81 – 27,24
180 dias	*Atta sexdens rubropilosa* versus *Atta bisphaerica*	2,965 ns	0,87 – 10,07
225 dias	*Atta sexdens rubropilosa* versus *Atta bisphaerica*	1,980 ns	0,53 – 73

IC: Intervalo de Confiança a 95% de confiabilidade. * significativo; ns: não significativo.

Tabela 6. Razão das Chances ("Odss Ratio") para mortalidade entre *Atta bisphaerica* e *A. sexdens rubropilosa,* ano 2008. Botucatu (SP), 2010.

Período	Espécie (mortalidade)	Razão das chances	IC (95%)
20 dias	*Atta sexdens rubropilosa* versus *Atta bisphaerica*	2,227 ns	0,793 – 6,250
45 dias	*Atta sexdens rubropilosa* versus *Atta bisphaerica*	1,80 ns	0,564 – 5,750
90 dias	*Atta sexdens rubropilosa* versus *Atta bisphaerica*	2,108 ns	0,634 – 7,013

IC: Intervalo de Confiança a 95% de confiabilidade. * significativo; ns: não significativo.

Tabela 7. Razão das Chances ("Odss Ratio") para mortalidade entre *Atta bisphaerica* e *A. sexdens rubropilosa*, por ano de fundação. Botucatu (SP), 2010.

Ano	Espécie (mortalidade)	Razão das chances	IC (95%)
2007	*Atta sexdens rubropilosa* versus *Atta bisphaerica*	2,718 *	1,722 - 4,291
2008	*Atta sexdens rubropilosa* versus *Atta bisphaerica*	2,042 *	1,071 - 3,893
2009	*Atta sexdens rubropilosa* versus *Atta bisphaerica*	1,912 *	2,633 –19,986

IC: Intervalo de Confiança a 95% de confiabilidade. * significativo; ns: não significativo.

Tabela 8. Razão das Chances ("Odss Ratio") para mortalidade entre *Atta* entre os anos de estudo. Botucatu (SP), 2010.

Ano	Razão das chances (mortalidade)	IC (95%)
2007 *versus* 2009	0,570 *	0,345 – 0,940
2008 *versus* 2009	2,204 *	0,118 – 0,352

IC: Intervalo de Confiança a 95% de confiabilidade. * significativo; ^{ns} não significativo.

3.2 Avaliação da sobrevivência de colônias em campo, sem escavação

As curvas de sobrevivência de ninhos iniciais, ou seja, a proporção de sobreviventes no decorrer do tempo é diferente entre as espécies, sendo para *A. bisphaerica* maior do que *A. sexdens rubropilosa* ($p<0,0001$) (Figura 5).

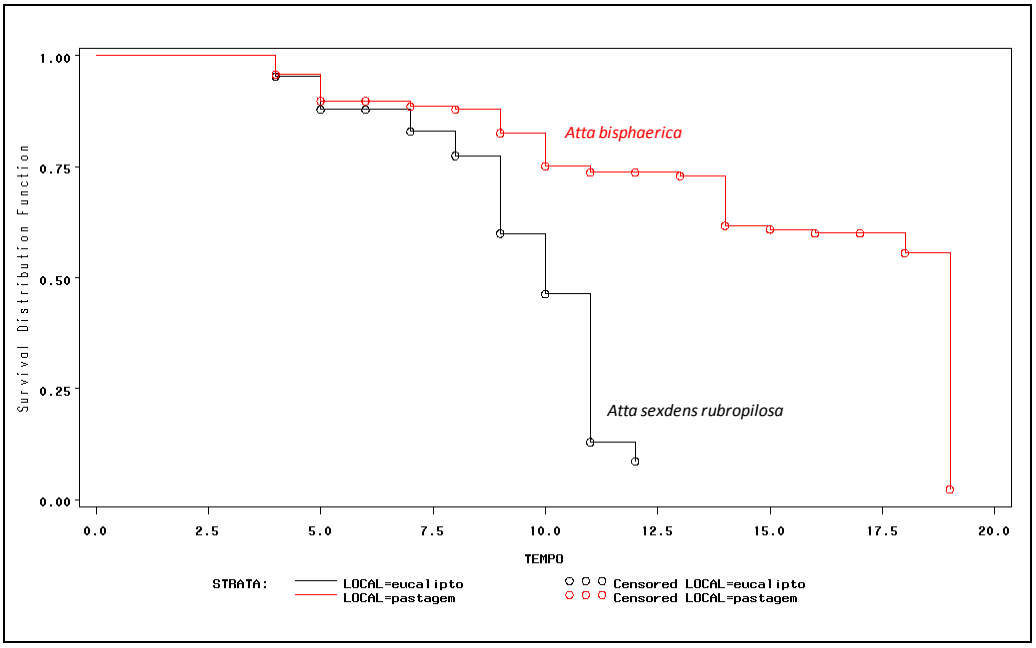

Figura 5. Curva de Sobrevivência de ninhos iniciais de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa*, ano 2008.

3.3 Fatores bióticos possivelmente relacionados à mortalidade da rainha

Dentre os fatores biológicos encontrados nesse estudo e que certamente contribuíram para a mortalidade de rainhas de *A. bisphaerica* e *A. sexdens rubropilosa* ocorreu destaque para fungos de ocorrência natural em solos. Em 2007, das 500 rainhas coletadas e mantidas no laboratório, 182 (36,40%) morreram até o terceiro mês após a coleta. Deste total, aproximadamente 120 (24%) apresentaram o desenvolvimento de fungos filamentosos na região do tórax. Em 2008, do total de rainhas amostradas (500), 199 (39,80%) rainhas morreram e 136 (27,20%) delas apresentaram fungos filamentosos (Figura 11).

Apenas um isolado de *M. anisopliae* foi identificado no presente estudo, sendo referente à rainha da revoada de 2008. A proporção de cadáveres de rainhas com fungos do gênero *Fusarium* compreendeu 30,83% e 30,88 % em 2007 e 2008, respectivamente, sendo o fungo encontrado em maior proporção no estudo. Já *B. bassiana* ocorreu em 10% dos cadáveres em 2007 e 7,35% em 2008; *P. lilacinus* ocorreu em 6,66% e 4,41% dos cadáveres em 2007 e 2008, respectivamente; *I. fumosorosea* apenas foi encontrado em 2007, à uma freqüência de 6,66%. Foi isolado também, em 2007, *Aspergillus flavus* (7,8%) e *Aspergillus*

niger (3,8%). E em 2008 apenas *A. flavus* ocorreu em menor percentual (abaixo de 3%) em relação ao ano anterior.

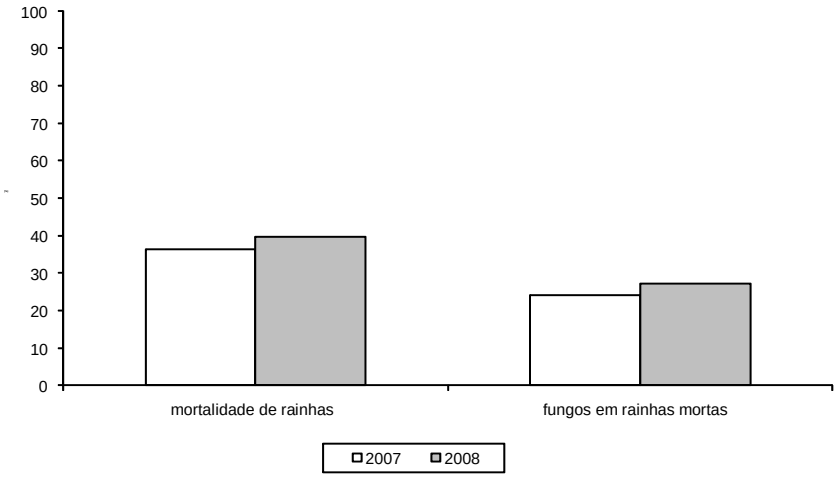

Figura 6. (A) Mortalidade de rainhas do gênero *Atta* spp. (Hymenoptera: Formicidae) mantidas em laboratório e (B) percentual de fungos em rainhas mortas.

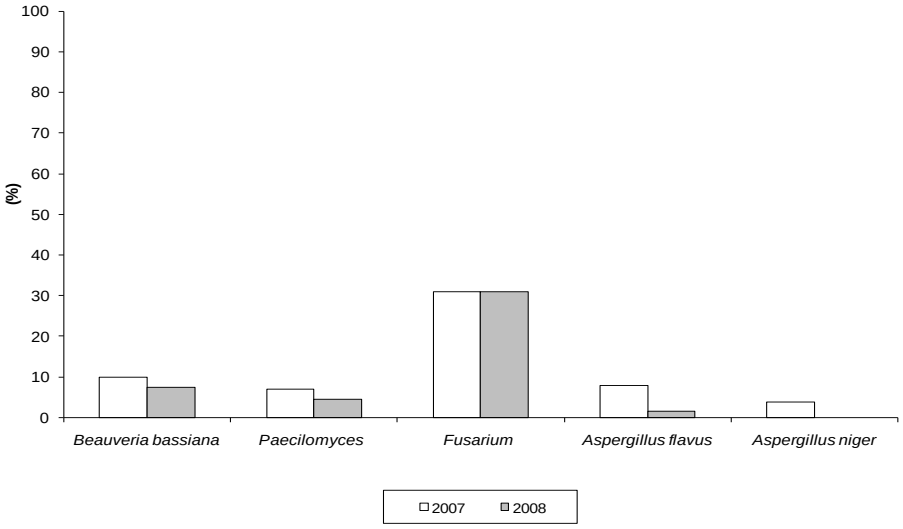

Figura 7. Frequencia (%) dos fungos filamentosos encontrados em rainhas do gênero *Atta* spp (Hymenoptera: Formicidae), ano 2007 e 2008.

Nematóides e ácaros foram encontrados em vários cadáveres de rainhas coletadas na revoada e observadas a mortalidade em laboratório. A presença de tais organismos foi verificada nas formigas coletadas apenas no ano de 2007. Do total, 500 rainhas, 19,60% dos cadáveres apresentaram juvenis efetivos saindo pelo tegumento e em 18% dos cadáveres apresentaram presença de ácaros.

Das rainhas coletadas em campo, além da presença de fungos, outros organismos também foram encontrados e que também certamente contribuíram para altas taxas de mortalidade de rainhas de *A. bisphaerica* e *A. sexdens rubropilosa*, entre eles: *Canthon* spp. (Figura 12) e outras espécies de formigas habitando o ninho, onde a rainha encontrava-se morta ou ausente.

Das rainhas de *A. bisphaerica* encontradas mortas nos ninhos com até 45 dias de fundação, no ano de 2008, 2,5% foram utilizadas para ovoposição de ovos de *Canthon* spp. (Figura 13D). Foram encontrados larvas e adultos desse inseto (Coleoptera: Scarabaeidae) em câmaras provavelmente escavadas por tais coleópteros, porém possivelmente aproveitando-se do próprio canal escavado pela rainha, pois os abdomes de rainhas (até 6 abdome por ninho) parasitados por larvas de *Canthon* spp. foram encontrados escavando-se canal marcado com estaca no dia da revoada. Adultos de *Canthon* também foram encontrados nos ninhos.

3.4. Fatores abióticos possivelmente relacionados à mortalidade da rainha

3.4.1 Precipitação, temperatura, umidade atmosférica.

Em 2007, no dia revoada, que ocorreu em 26 de outubro, a temperatura média foi de 22,9 ^{o}C e não ocorreu precipitação. No segundo ano de estudo (2008), no dia da revoada (03/10), a precipitação foi de 0,4 mm e a temperatura 22,90 ^{o}C. Dois dias anterior à revoada, ocorreu precipitação de 39,7 mm em 2007 e 45,4 mm em 2008, o que provavelmente permitiu a saída de machos e fêmeas para o voo nupcial e favoreceu a umidade do solo, fundamental para o processo de escavaçao do ninho e cultivo do fungo simbionte. Pereira-da-Silva verificou 8,7 mm de precipitação anterior à revoada.

Dois dias após a revoada também ocorreu precipitação, sendo de 14 e 37,4 mm para os anos de 2007 e 2008, respectivamente (Figura 10).

Para 2009, a revoada de *A. bisphaerica* aconteceu aos 17 de outubro, enquanto para *A. sexdens rubropilosa* foi se deu no dia 21 do mesmo mês. Na primeira data não houve precipitação e temperatura e umidade atmosféricas foram, respectivamente 18,2 ^{o}C. Para segunda data, ocorreu 13,1 mm de precipitação, 21,9 ^{o}C a temperatura média e 52,6 de UR.

A média da umidade relativa semanal para os três anos foram, 43%, 86,90 % e 72,2%, respectivamente para 2007, 2008 e 2009.

Acompanhando os dados climatológicos em função do tempo de fundação, pode-se verificar que em relação à precipitação, para o ano de 2007, da revoada até os 45 dias de fundação, a média da precipitação semanal variou de 5 mm (menor) a 105 mm (maior), sendo que a maior ocorreu na semana seguinte após a revoada (Figura 8A). Dos 45 aos 90 dias, a mínima e a máxima precipitação semanal foram, respectivamente, 15 e 70 mm (Figura 8B). Dos 90 aos 135 dias, a mínima permaneceu 15 mm enquanto a máxima foi acima de 90 mm (Figura 8C). No período seguinte, compreendido entre os 135 aos 180 dias, apenas em uma semana não choveu e a maior média semanal ficou acima dos 60 mm de precipitação (Figura 8D).

Em 2008, também choveu na maioria dos dias que sucederam a fundação do ninho pela rainha. Da revoada aos 20 dias de fundação, a semana em que ocorreu a revoada apresentou a maior média semanal, com 80 mm de precipitação pluviométrica (Figura 9A). Dos 20 aos 45 dias, em apenas uma semana choveu abaixo de 40 mm (Figura 9B) e dos 45 aos 90 dais de fundação, a precipitação semanal variou de 2 a 115 mm (Figura 9C).

Em relação à temperatura semanal para o ano de 2007, da revoada aos 45 dias, variou de 24 e 21 ^{o}C (Figura 8A). No período compreendido entre os 45 e 90 dias a mínima por semana foi de 20,5 ^{o}C e a máxima de 26 ^{o}C (Figura 8B). Os dois períodos seguintes (90-135 dias) (Figura 8C) e (135-180 dais) (Figura 8D) a temperatura pouco oscilou, ficando em torno de 21,5 ^{o}C e 23 ^{o}C, respectivamente.

Em 2008, variou semanalmente entre 20 e 24 ^{o}C, para o primeiro período (da revoada aos 20 dias) (Figura 9A), 22 e 24 ^{o}C para segundo período (20 aos 45 dias) (Figura 9B) e 21 a 23 ^{o}C de temperatura (Figura 9C).

A umidade relativa variou semanalmente em 2007 entre 50 e 87% em todo o período de estudo (Figura 10a) e em 2008 a oscilação foi de 55 a 85%. (Figura 10b)

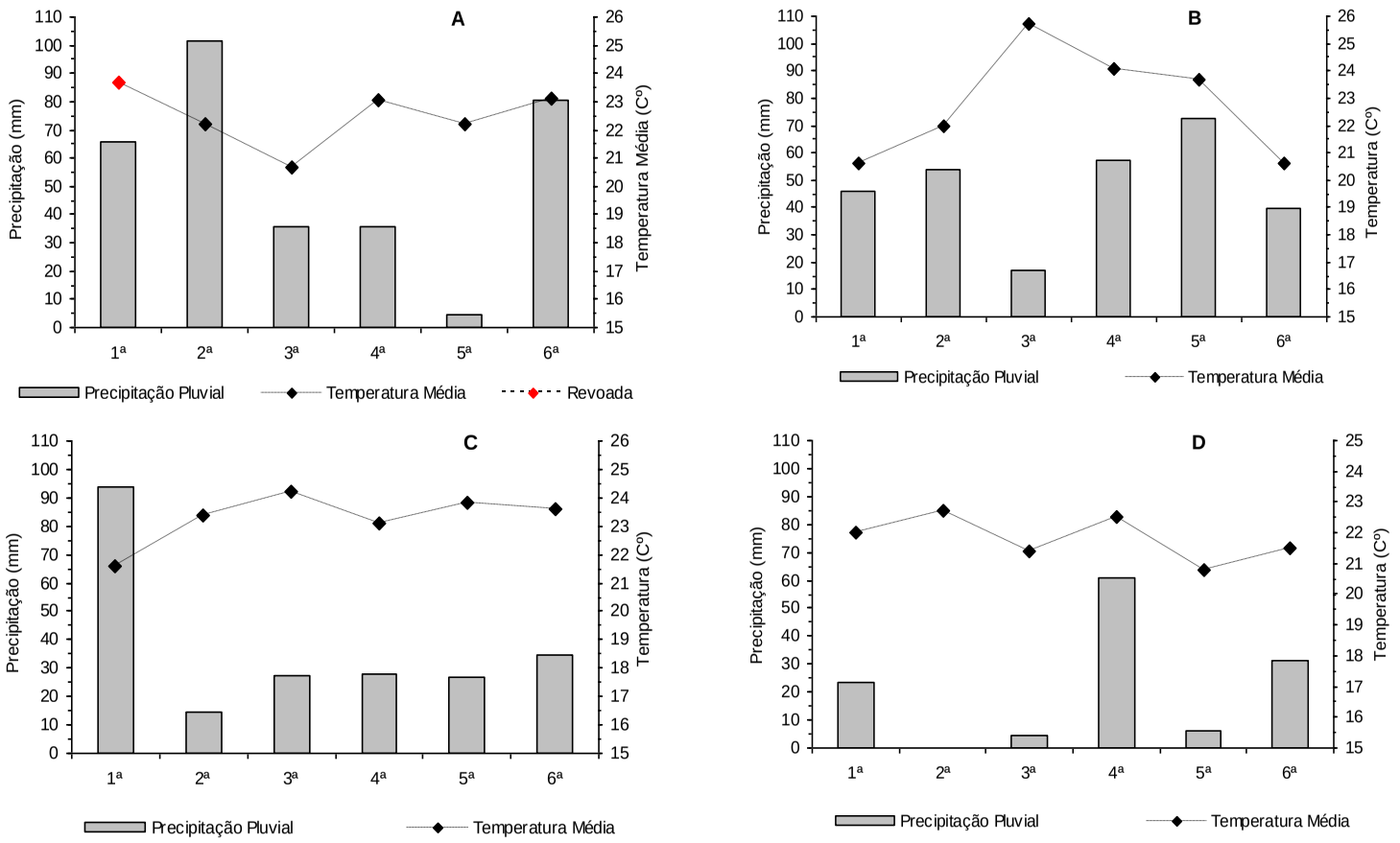

Figura 8. Precipitação e temperatura semanal (A) da revoada as 45 dias (B) dos 45 aos 90 dias (C) dos 90 aos 135 dias e (D) dos 135 aos 180 dias de fundação, ano 2007. Dados coletados pela Estação Agrometeorológica da Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA/UNESP), Campus de Botucatu (SP).

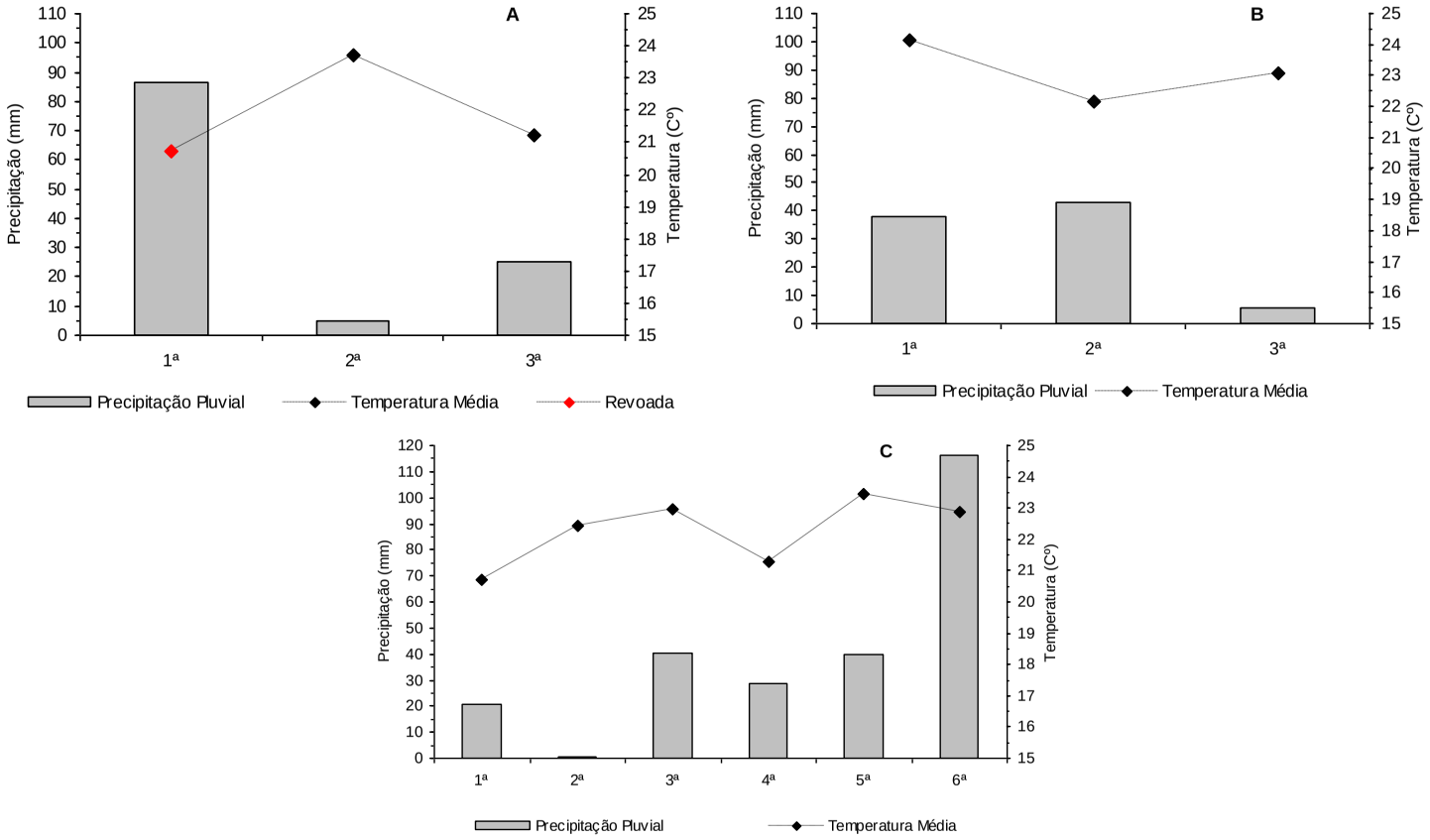

Figura 9. Precipitação e temperatura semanal (A) da revoada as 45 dias (B) dos 45 aos 90 dias (C) dos 90 aos 135 dias e (D) dos 135 aos 180 dias de fundação, ano 2007. Dados coletados pela Estação Agrometeorológica da Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA/UNESP), Campus de Botucatu (SP).

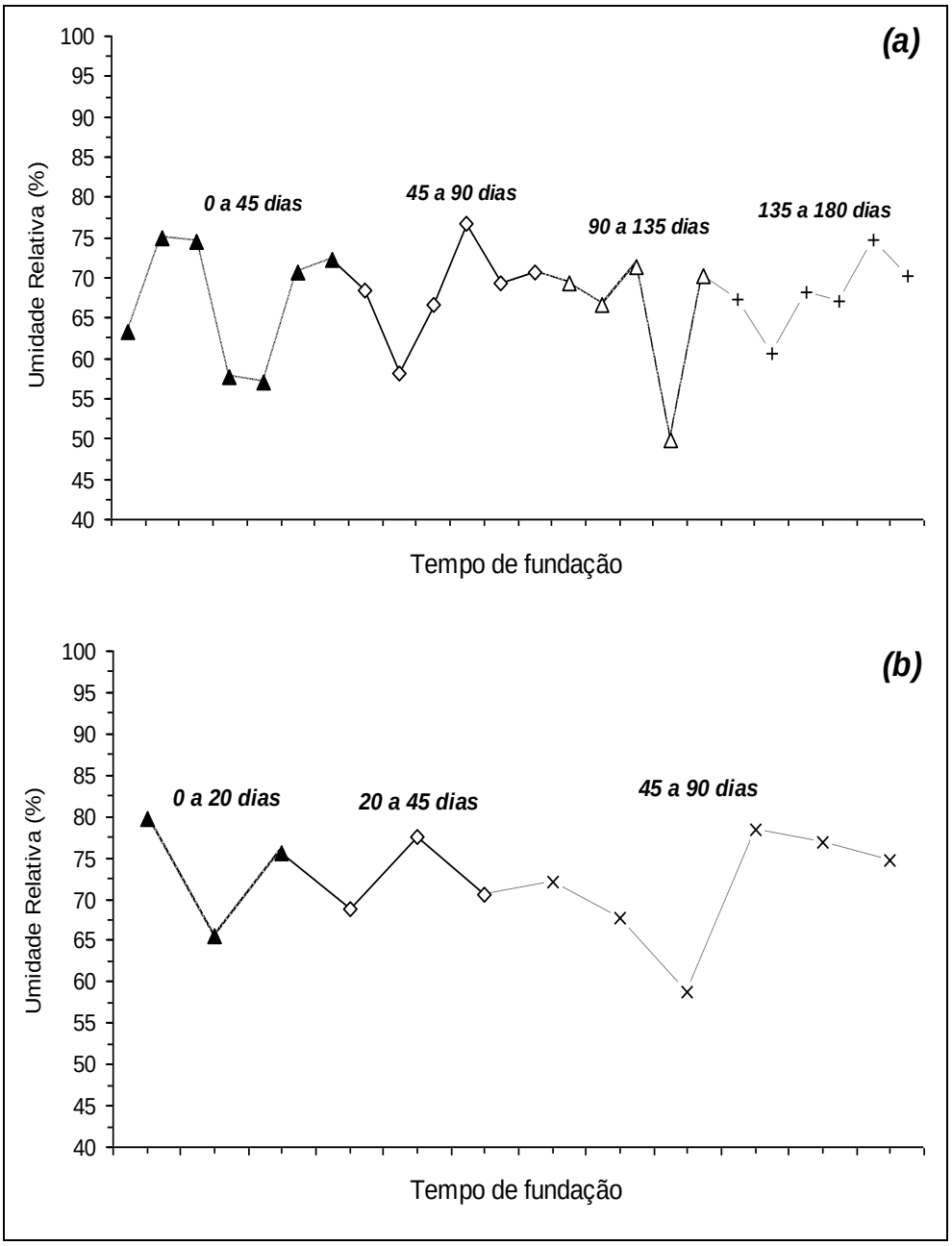

Figura 10. Média de umidade relativa em função do tempo de fundação do ninho. Ano 2007 e 2008. Dados coletados pela Estação Agrometeorológica da Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA/UNESP), Campus de Botucatu (SP)

3.4.2 Temperatura e umidade do solo

Através de termômetros (data-logger) instalados em 2008 foi possível registrar a temperatura do solo em ambas as áreas estudadas. Assim, no dia da revoada, a temperatura do solo às 17:00 horas foi menor na área de pastagem, sendo de 23,45^{o}C, enquanto que na área de eucalipto foi de 24,70 ^{o}C. Nas demais horas, a temperatura do solo na área de pastagem foi superior apresentando uma diferença de 2^{o}C em relaçao à área de eucalipto, na maioria das horas estudadas. Às 18h, a temperatura do solo na pastagem foi 2,70 ^{o}C acima da temperatura do solo na área com plantio de eucalipto, onde foram selecionados os ninhos de *A. sexdens rubropilosa*.

Da revoada até os 20 dias de fundaçao a temperatura da área de pastagem variou de 19,00 a 26 ^{o}C (dia) e 20,5 a quase 28,00 ^{o}C (noite). Na área de eucalipto variou entre 18,00 e 24 ^{o}C (dia) e entre 18,5 a 24,00 ^{o}C (noite) (Figura 11a).

Dos 20 aos 45 dias de fundação, a temperatura oscilou entre 18,41 e 27,74 ^{o}C (dia) e de 22 a 28 ^{o}C (noite) na área de pastagem, onde encontravam-se os ninhos de *A. bisphaerica*, e de 21,00 a 24,00 ^{o}C (dia) e 22,00 a 23,00 ^{o}C (noite) na área de eucalipto, onde foram selecionados os ninhos de *A. sexdens rubropilosa*. Portanto, a temperatura do solo na pastagem variou até 9 ^{o}C e na área de eucalipto cerca de 3 ^{o}C (Figura 11b).

Dos 45 aos 90 dias, variou de 22,00 a 27,00 ^{o}C (dia) e 22,50 a 28 ^{o}C (noite) na primeira área e de 22,00 a 24,00 ^{o}C (dia) e 22,50 a 24,5 ^{o}C na área de eucalipto (Figura 11c).

Para o presente estudo a temperatura do solo, fora do ninho, variou entre 18,5 e 28,5 ºC em área com ninhos de *A. bisphaerica* e 18,5 a 26 ºC em área com ninhos de *A. sexdens rubropilosa.*

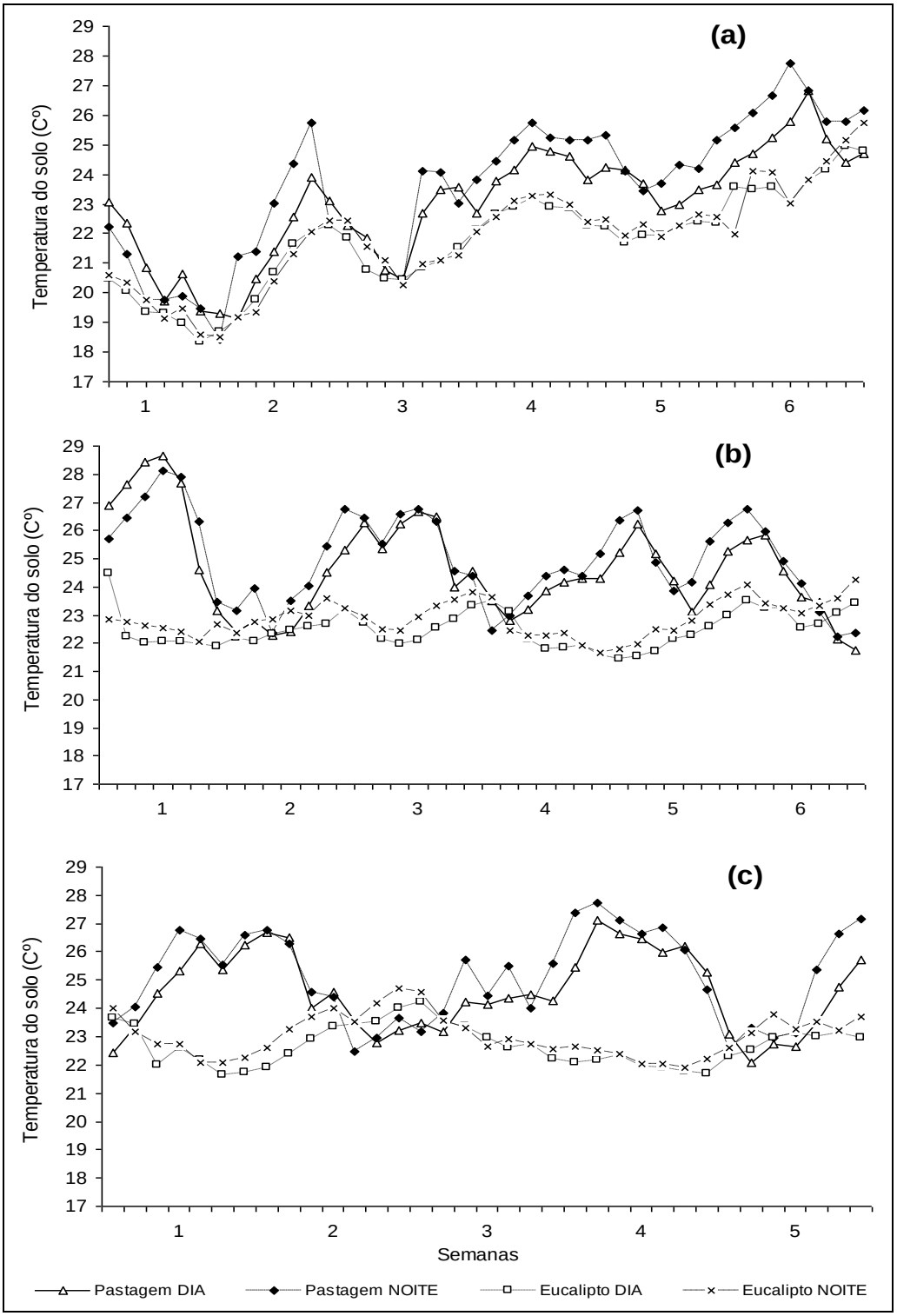

Figura 11. Dados semanais da temperatura do solo, dia e noite (a) do período compreendido da revoada aos 20 dias (b) dos 20 aos 45 dias e (c) dos 45 aos 90 dias de fundação, ano 2008.

Em área de pastagem, da revoada até os 5 meses a umidade do solo variou de 5,23 a 11,78%. Em área de eucalipto a média de umidade apresentou oscilação entre 6,30 e 14,07%. O maior valor foi encontrado 7 dias após a revoada (Figura 12). Através da ANOVA realizada, ocorreu diferença na média da umidade entre as áreas nos períodos de 7 (p=0,002), 60 (p=0,0002), 74 (p=0,01), e 105 (0,015) dias após a revoada.

Devido as proximidade das duas áreas estudadas, a umidade do solo apresentou padrão de variação semelhante entre elas. Contudo, para alguns períodos amostrais, a média de umidade do solo foi superior para área de eucalipto, onde ocorreram os ninhos de *A. sexdens rubropilosa*.

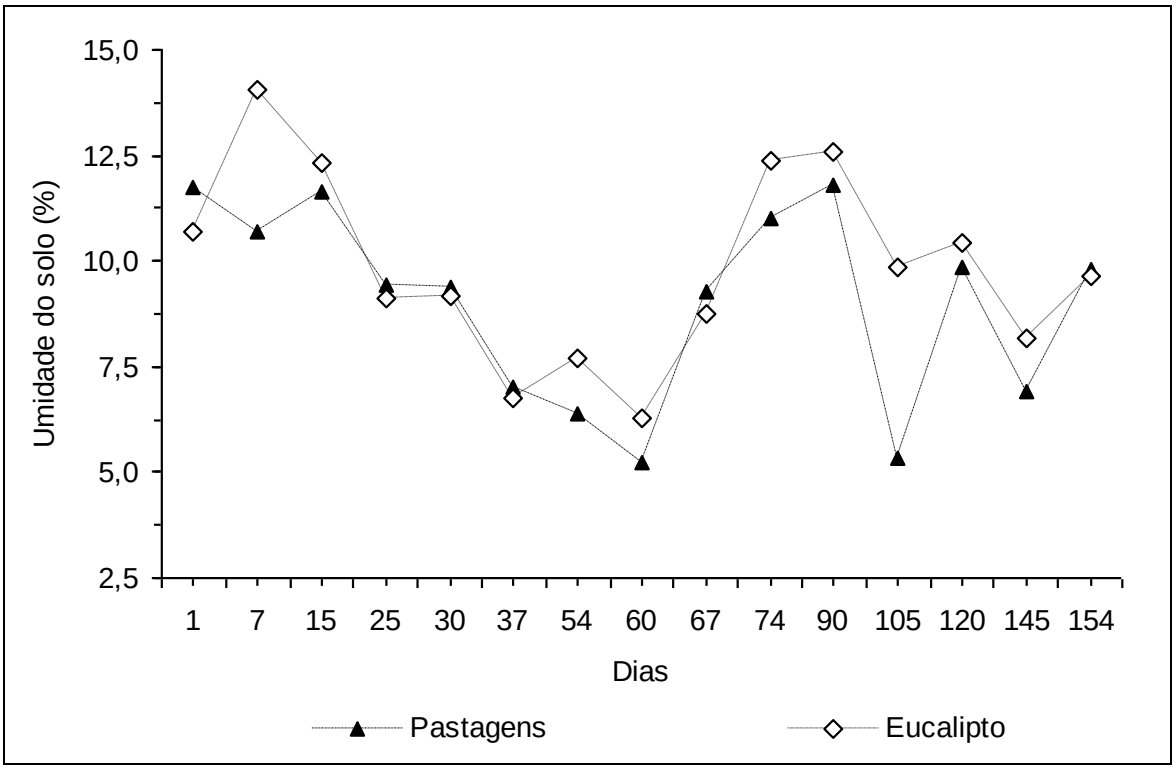

Figura 12. Média da umidade do solo por período (dias) a partir da fundação, para as duas áreas de estudo, ano 2008.

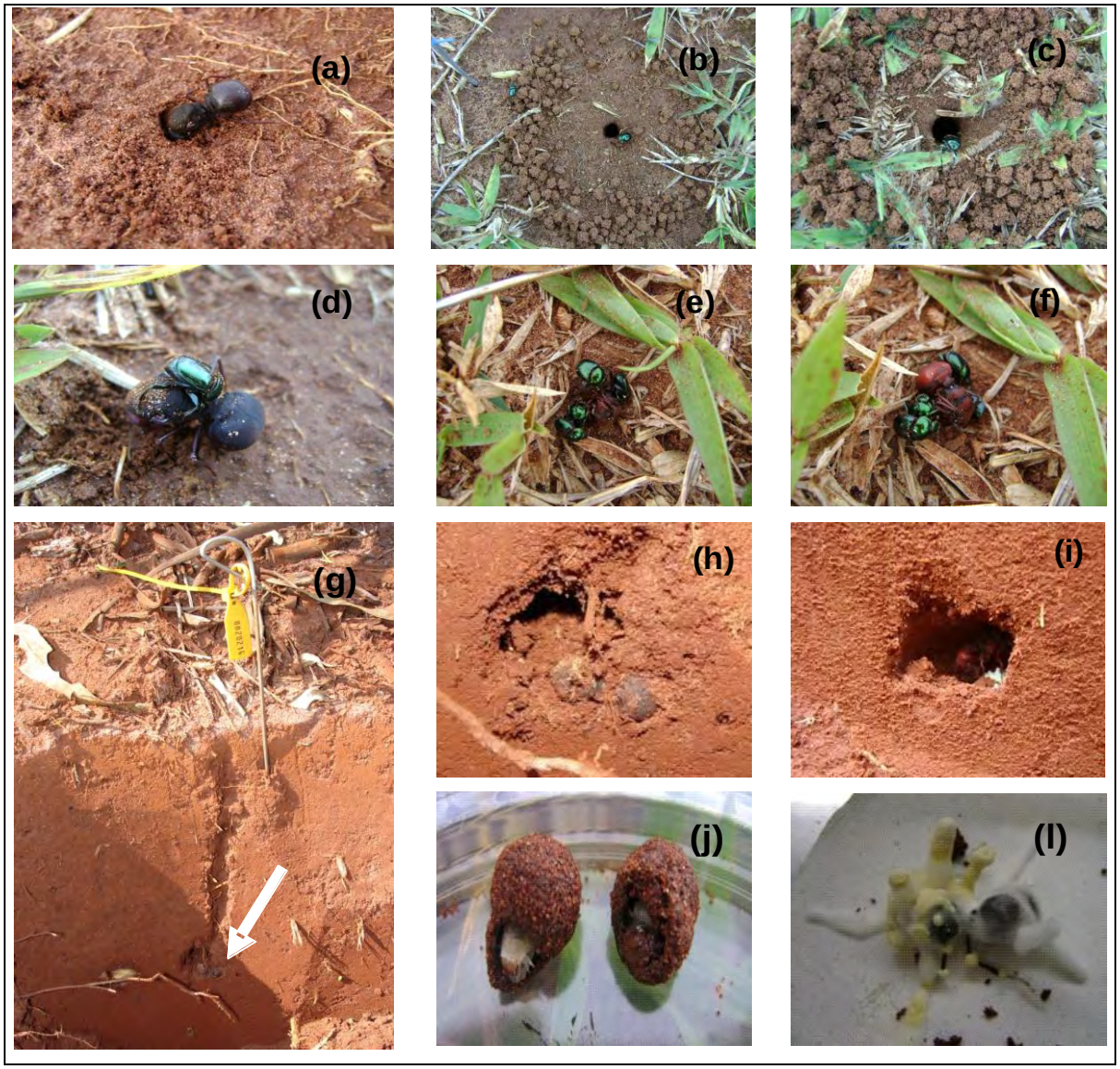

Figura 13. (a) Rainha de *Atta bisphaerica* iniciando o processo de fundação do ninho; (b) presença de *Canthon* spp. próximo a entra do túnel ainda em processo de escavaçao e (c) *Canthon* spp. na entrada do orifício do túnel; (d - f) rainha de *A. bisphaerica* atacada por *Canthon* spp.; (g) rainha de *A. sexdens rubropilosa* encontrada morta dentro da câmara; (g) detalhe da rainha de *A. sexdens rubropilosa* morta dentro da câmara; (i) rainha de *A. bisphaerica* encontrada viva dentro da câmara, com o fungo simbionte; (j) larvas de *Canthon* spp, parasitando abdômen de *A. bisphaerica* e (l) esporulação do fungo *B. bassiana* em cadáver de rainha de *A. sexdens rubropilosa*.

4 DISCUSSÃO

Nos três anos de estudo, a revoada ocorreu no mês de outubro, após forte chuva e elevação da temperatura. *Atta bisphaerica*, revoou sempre no período da manhã enquanto *Atta sexdens rubropilosa*, o voo nupcial se iniciava à tarde e tem o ápice, normalmente, entre 16:00 e 17:00 horas (horário de verão). Em 2007 e 2008, as duas espécies revoaram no mesmo dia e em 2009, o voo nupcial de *A. sexdens rubropilosa* ocorreu dois dias após a revoada de *A. bisphaerica*. Tais observações corroboram com o estudo de Amante (1972) que verificou o horário da manhã (até 12:30 horas) para revoada de *A. bisphaerica*, enquanto que para *A. laevigata*, *A. capiguara* e *A. sexdens rubropilosa* tal fenômeno ocorreu à tarde, após 12:00 horas.

A mortalidade de ninhos novos de *Atta*, em condições naturais, é sempre reportada em altas taxas pela literatura. Com base nos resultados apresentados, é possível afirmar que a mortalidade é alta dentro dos primeiros meses de fundação, para ambas as espécies estudadas. Tal verificação foi observada tanto para ninhos escavados quanto para ninhos não escavados.

Avaliando os ninhos através de escavações dos mesmos foi verificado que, em 2007, para *Atta bisphaerica* o período crítico para a sobrevivência da rainha foi a partir dos 180 dias de fundação. Em *Atta sexdens rubropilosa* aos 90 dias, a mortalidade encontrava-se superior a 50%.

Contudo, os resultados apresentados nesse estudo foram menores do que as taxas reveladas por Autuori (1950), estudando *A. sexdens rubropilosa* onde verificou 95,97% mortalidade de nos primeiros 100 dias de fundação. Também diferiram dos resultados de Ribeiro e Woessner (1982), onde registraram 95% de mortalidade em ninhos inicias de *A. sexdens sexdens* com apenas 98 dias de construção. No entanto, percentual de mortalidade para *A. sexdens rubropilosa* no ano de 2007 aproximaram-se dos resultados encontrados por Vieira-Neto e Vasconcelos (2010), para *A. laevigata*, cerca de 60% de mortalidade na fase claustral.

Por outro lado, as rainhas podem ter morrido em períodos anteriores embora os ninhos tenham sido selecionados apenas ao final das observações. O que não elimina a afirmação de que a mortalidade da rainha é alta em ninhos iniciais e, portanto corroborando com os trabalhos de Autuori (1941) e Ribeiro e Woessner (1982). Araújo et al. (2003) verificaram

100% de mortalidade de ninhos de *A. bisphaerica* com 18 meses de fundação, justificando a ação de fungos entomopatogênicos ou competidores os responsáveis por tal mortalidade.

O fato de a mortalidade ter sido verificada em maior percentual nos últimos períodos avaliados (180 e 225 dias), nas duas espécies, fica confirmado que o período de fundação da segunda câmara (cerca de seis meses da fundação) representa um dos períodos críticos para a rainha e, consequentemente para a colônia. Tal resultado corrobora com Autuori (1950) que em estudo sobre fundação e estabelecimento de um novo sauveiro, identifica quatro "períodos críticos" à sobrevivência de ninhos iniciais: (1) durante o voo nupcial, (2) durante o trabalho de escavação do canal (3) fase de eclausuramento da rainha e (4) período compreendido entre a abertura do primeiro olheiro e a fundação da segunda câmara.

Entre as causas da mortalidade para a segunda fase apresentada por Autuori (1950), além de pássaros, sapos e lagartos, *Canthon* sp. tem sido relatado em elevado número atacando as rainhas. No presente estudo, também foi registrada a ocorrência de larvas e adultos de *Canthon* sp. (Coleoptera: Scarabaeidae) parasitando rainhas encontradas mortas em ninhos escavados. Tais insetos podem ter utilizado do próprio canal escavado pela rainha, pois os mesmos foram encontrados em câmaras por meio das escavações do canal selecionado no dia da revoada. A literatura aponta que tais besouros decapitam e enterram as rainhas (HERTEL; COLLI, 1982).

Dentre as causas de mortalidade sugeridas durante o quarto período crítico para colônia, tem-se predacão por outras formigas como *Solenopsis*, *Paratrechina* e *Eciton*, além das condições climáticas adversas (Autuori, 1950). Evidência disso foi encontrada, pois em alguns ninhos escavados observou-se a ocorrência de outras espécies de formigas habitando a câmara fundada por rainhas de *Atta*.

A presença de diversos micro-organismos de ocorrência natural do solo também podem influenciar na mortalidade da rainha (PEREIRA-DASILVA, 1979; BENTO et al., 1991; ARAÚJO et al., 2003) Diversas espécies de fungos foram isoladas de rainhas, por ocasião das escavações e em laboratório, ocorrendo predomínio dos gêneros *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Isaria*, *Fusarium* e *Aspergillus*.

Este não foi o primeiro registro de fungos ocorrendo naturalmente em formigas do gênero *Atta*. Alves e Sosa-Gomez (1983) isolaram *B. bassiana* e *M. anisopliae* de rainhas de *A. sexdens rubropilosa* e recentemente Rodrigues et al. (2010) registraram *B. bassiana* em

fêmeas aladas de *A. laevigata* e *A. capiguara*. Contudo, possivelmente é o primeiro registro de *I. fumosorosea* em *A. sexdens rubropilosa*.

B. bassiana e *I. fumosorosea* são fungos reconhecidamente entomopatogênicos (DOMSCH et al., 1980), enquanto *P. lilacinus*, pertence a uma gênero com muitos representantes parasitas de insetos (ALVES, 1998), já tendo sido isolado de rainhas de *Atta colombica* por Fernandez-Marín et al. (2006) e de *A. laevigata* e *A. capiguara* por Rodrigues et al. (2010). De acordo com Domsch et al. (1980) é considerado um fungo de solo, com maior freqüência em áreas agrícolas.

O gênero *Fusarium*, que apresentou maior percentual de ocorrência em rainhas de *Atta*, embora abrigue representantes saprofíticos e fitopatogênicos, já foi isolado de artrópodes, e caracterizados como entomopatogênicos (TEETOR-BARSCH; ROBERTS, 1983; STEENBERG; HUMBER, 1999). *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* e *Fusarium graminearum* foram isolados de rainha de *A. capiguara* e *A. laevigata* por Rodrigues et al. (2010). O gênero *Aspergillus* também é comumente encontrados no solo, sendo considerado saprófito (DOMSCH et al., 1980), porém alguns isolados de *A. flavus* podem causar doenças em insetos em determinadas circunstâncias (HUGHES; BOOMSMA, 2004).

Carrión et al. (1996) e Rodrigues et al. (2010) sugerem que o contágio de rainhas de *Atta* por fungos pode se dar através do solo, principalmente quando estão escavando o túnel para fundar seu novo ninho. Carríon et al. (1996) considera pouco provável que o contágio ocorra a partir do solo do ninho de origem. No caso do presente estudo, a maioria das rainhas foi coletada logo após a revoada, anteriormente ou no início da escavação do solo. Com isso, apesar da pouca probabilidade, não se descarta a possibilidade de que o contato com o fungo tenha ocorrido anteriormente à revoada, no solo ou mesmo de micro-organismos presentes no jardim de fungos do ninho parental.

De acordo com Alves (1998) as condições existentes no solo conferem um ambiente apropriado para sobrevivência de diversos fungos, podendo permanecer ativo por alguns meses ou anos. Conforme Pagnocca (1997), o próprio substrato onde cresce o fungo simbionte favorece desenvolvimento de micro-organismos. Rodrigues (2004) e Carlos (2008) isolaram diversos fungos em esponja fúngica proveniente de ninhos de *A. sexdens rubropilosa* após tratamento com isca tóxica, dentre eles: *Syncephalastrum racemosum*, *Escovopsis weberi* e *Trichoderma harzianum.*

Além de fungos filamentosos, diversos outros fatores ambientais podem estar relacionados à mortalidade de rainhas. Autuori (1950) aponta as condições climáticas, especialmente chuvas fortes e abundantes e variação brusca de umidade e temperatura, como os principais responsáveis pela mortalidade dos ninhos iniciais na fase de clausura (até os 100 dias de fundação).

De acordo com Amante (1972), a revoada par ao estado de São Paulo acontece em período de início das chuvas, com temperaturas elevadas (setembro-dezembro). No caso do presente estudo, o fator precipitação possivelmente influenciou para os percentuais de mortalidade encontrados, pois os dados coletados mostraram altos valores logo após a fundação do ninho, certamente suficientes para causar afogamento da rainha, imaturos, adultos e fungo.

No geral, as câmaras foram fundadas na camada superficial do solo, embora ninhos de *A. bisphaerica* tenham sido, de maneira geral, construídos em maior profundidade, sendo o mais profundo observado à 25,70 cm. Contudo, de acordo com Pereira-da-Silva (1975), até 30 cm a temperatura do solo ainda pode sofrer oscilações, que seriam responsáveis por alta mortalidade de ninhos iniciais.

Powell e Stradling (1986), em condições experimentais verificaram que o fungo simbionte cresce entre 20 e 25 ^{o}C, sendo inibido por variação fora dessa faixa de temperatura; à 15 ^{o}C, ocorre apenas pequeno aumento da gongylidia (alimento das larvas), enquanto que temperaturas acima de 30 ^{o}C é letal para o fungo. Em condições naturais, Autuori (1947) registrou variação de temperatura dentro da câmara entre 26 e 28 ^{o}C.

De acordo com os resultados do presente estudo, a temperatura do solo durante todo o período de observação ficou entre 18,5 e 27 ºC, portanto próximas dos valores adequados para o desenvolvimento dos fungos simbionte, embora com maiores variações no solo onde foram fundados os ninhos de *A. bisphaerica*. Entretanto, de acordo com Roces e kleineidam, (2000), as condições de microclima dentro do ninho podem ser diferenciadas das condições do solo, pois a própria arquitetura do mesmo ajuda na estabilização das flutuações de temperatura e umidade. Amante (1972) verificou, em dia de revoada, uma diferença de 11,8 ºC entre a temperatura do canal (em ninhos adultos) e a do solo, submetendo-se os alados de *A. capiguara* bruscamente a essa diferença de temperatura.

Em relação à umidade, o fato da área de eucalipto ter apresentado maior percentual em vários períodos avaliados, pode ter favorecido a presença de micro-organismos patogênicos e antagonistas ao simbionte, de ocorrência natural do solo. Porém, para o ano de 2008 não foi verificada diferença considerável na mortalidade de rainhas em colônias iniciais entre as espécies estudadas, o que leva a sugerir que a umidade, assim como a temperatura do solo provavelmente não foram, isoladamente, causa de mortalidade observada, pelo menos até o período estudado (90 dias).

Os dados climatológicos mostraram que tanto precipitação pluviométrica e as variações de umidade e temperatura podem ter determinado a morte das rainhas. Contudo, o fato de a mortalidade ter sido maior para *A. sexdens rubropilosa* nos três anos de estudo, especialmente nos primeiros períodos do ano de 2007, sugere que as causas para isso, podem está relacionadas a fatores intrínsecos à cada espécie ou que possivelmente as condições de microclima ocorrentes nas áreas experimentais provavelmente foram mais adversas a esta *A. sexdens rubropilosa*.

Além disso, para o ano de 2007, possivelmente a mortalidade das rainhas de *A sexdens rubropilosa* sofreram influência da presença mais de microrganismos presentes no solo, já que na área de eucalipto a umidade do mesmo foi superior à de pastagem. Outro fator de influencia para esse ano parecem ser as condições físicas do solo. De acordo com Stein e Xavier (1984), solos compactados podem limitar a profundidade dos ninhos. Isso pode implicar em fundação de câmaras superficiais, que normalmente são mais suscetíveis às variações ambientais. Também exigem maior esforço da fundadora, visando alcançar profundidades adequadas para instalação do ninho. Camargo et al. (2010), avaliando o esforço da fêmea recém-fecundada na construção da câmara inicial, constataram a probabilidade de morte das rainhas é aumentada quando desprendi maior esforço para de escavação do ninho.

5 CONCLUSÕES

- Rainhas de *A. bisphaerica* e *A. sexdens rubropilosa* apresentaram altos percentuais de mortalidade em condições naturais, principalmente após os seis meses de fundação do ninho;

- Dentre as causas biológicas da mortalidade de rainhas, sugere-se: ocorrência de chuvas fortes, variações de temperatura e umidade e infecção por fungos filamentosos de ocorrência natural dos solos;

- Para as condições do presente estudo, as chances e os percentuais de mortalidade de rainhas foram maiores para a espécie *Atta sexdens rubropilosa*;

- Diversos fungos podem parasitar rainhas do gênero *Atta*, entre eles típicos entomopatogênicos como *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *I. fumosorosea*, além de outros com potencial patogênico como *P. lilacinus*, *A. flavus* e pertencente ao gênero *Fusarium*;

- Ninhos iniciais de *A. bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa* podem ser eficientemente eliminados pelos mecanismos naturais do ambiente, o que torna desnecessário intervenções de controle humano durante esse período; exceto em certos casos, como em áreas de plantios jovens de eucalipto; Estudos futuros são fundamentais para se conhecer o exato período de estabelecimento definitivo dos ninhos e assim detectar a idade ideal para o uso de técnicas de controle.

Capítulo 3

CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS DE OCORRÊNCIA NATURAL EM FÊMEAS REPRODUTORAS DE *Atta* spp.

RESUMO

Fungos filamentosos podem ocorrer em condições naturais sobre formigas cortadeiras, sendo que algumas espécies já foram isoladas do gênero *Atta*. Portanto, o presente estudo teve como objetivo isolar fungos de rainhas do gênero *Atta* e conhecer suas características para futuros estudos de patogenicidade. Foram coletadas rainhas de *Atta* spp., especialmente *Atta sexdens rubropilosa* no período da revoada e colocadas em potes de plástico com gesso. As rainhas foram observadas por três meses e as encontradas mortas foram desinfectadas superficialmente em álcool, hipoclorito de sódio e água destilada, tiveram retirado uma porção interior do tecido do tórax para isolamento de fungos. Tal fragmento foi inoculado em BDA suplementado com penicilina-G e incubado à 25°C no escuro, de 3 a 4 dias. Os fungos que se desenvolveram nesses fragmentos foram isolados, purificados e armazenados à 9°C. Os isolados representativos foram identificados através de métodos clássicos descritos na literatura e, principalmente, baseados na morfologia da colônia e das estruturas de reprodução. Entre os fungos isolados obteve-se: *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces lilacinus*, *Isaria fumosorosea*, *Metarhizium anisopliae*, *Fusarium oxysporium*, *Fusarium solani*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*. O número de conídios variou de 1,25 x10^6 a 7,14x10^6 conídios/mL entre os isolados estudados. Isolados de *B. bassiana* apresentam padrão semelhante de crescimento micelial, apenas ocorrendo diferença entre alguns isolados aos 18 dias após a inoculação: BBOT11 (58,21 mm) diferiu de BBOT01 (37,81 mm), BBOT04 (41,37 mm) e BBOT06 (45,25 mm). Os isolados do gênero *Isaria* apresentaram crescimento micelial mais rápido do que isolados de *Beauveria bassiana*, alcançando 80 mm de diâmetro médio entre os 9 e 12 dias após a inoculação.

Palavras-chave: Formiga cortadeira, isolados, crescimento micelial.

Chapter 3

CHARACTERIZATION OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI NATURALLY OCCURRING IN Atta spp. GYNES

ABSTRACT

Filamentous fungi can occur in natural conditions on leaf-cutting ants, and some species has been isolated from the genus *Atta*. The objective of this study was to isolate fungi of queens of the genus *Atta* and determine its characteristics for future studies of pathogenicity. Queens of *Atta bisphaerica* and *Atta sexdens rubropilosa* were collected during the nuptial flight. To isolate the fungi, the dead queens, after superficial disinfection, had removed a portion of the tissue inside the chest for isolation of fungi. This fragment was inoculated on potato dextrose agar supplemented with penicillin-G and incubated at 25 ° C in the dark, for 3 to 4 days. The fungi that developed in these fragments were isolated, purified and stored at 9 °C. The representative isolates were identified by classical methods described in the literature and mainly based on colony morphology and reproductive structures. Among the isolated fungi was obtained: *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces lilacinus*, *Isaria fumosorosea*, *Metarhizium anisopliae*, *Fusarium oxysporium*, *Fusarium solani*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*. The number of conidia ranged from 1.25 x106 to 7.14x106 conidia/mL among studied isolates. Isolates of *B. bassiana* have similar pattern of mycelial growth, occurring only difference between some isolates at 18 days after inoculation: BBOT11 (58.21 mm) differed from BBOT01 (37.81 mm), BBOT04 (41.37 mm) and BBOT06 (45.25 mm). The isolates of the genus *Isaria* presented mycelial growth faster than isolates of *Beauveria bassiana*, reaching 80 mm in mean diameter between 9 and 12 days after inoculation.

Keywords: Leaf-cutting ant, isolates, mycelial growth.

1. INTRODUÇÃO

As formigas cortadeiras, gêneros *Atta* (saúvas) e *Acromyrmex* (quenquéns), são insetos dominantes em muitos ecossistemas terrestres (WILSON, 1987). Tais formigas são consideradas pragas de grande importância devido a prejuízos causados à agricultura, atividades pecuárias e silvicultura (FOWLER et al., 1979).

Pertencem à tribo Attini e apresentam associação com um fungo basidiomiceto cultivado geralmente em câmaras subterrâneas. Dentro dos ninhos, além do simbionte vários micro-organismos podem ocorrer como actinomicetos (bactérias filamentosas), fungos filamentosos e leveduras (CURRIE et al., 1999; PAGNOCCA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2008). Os microfungos, embora presentes normalmente manifestam-se somente quando as colônias entram em desequilíbrio devido interferência de determinados fatores, como por exemplo, aplicação de inseticidas para controle (RODRIGUES et al., 2005).

Fungos anamórficos (Ascomycota) como *Metarhizium* e *Beauveria* são considerados entomopatogênicos generalistas, sendo bastante estudados como agente de controle biológico de muitos insetos praga (DIEHL-FLEIG et al, 1988; HUGHES et al.,

2004b; CASTILHO et al, 2010). *B. bassiana* é frequentemente encontrado no solo, em saprogênese, podendo atacar muitos insetos em diferentes estágios (PEREIRA et al., 1993). No Brasil, apresenta ocorrência generalizada e em condições naturais podem colonizar enzoóticamente himenópteros, dípteros e ortópteros (ALVES, 1998), tendo-se registro de sua ocorrência em rainhas de *Atta sexdens rubropilosa* (ALVES; SOSA GÓMEZ, 1983), *Atta laevigata* e *Atta capiguara* (RODRIGUES et al., 2010).

M. anisopliae, também encontrado facilmente no solo, pode apresentar ocorrência natural sobre mais de 300 espécies de insetos de diferentes ordens (ALVES, 1998), e ocorrência registrada em rainhas de *Atta sexdens rubropilosa* (ALVES; SOSA GÓMEZ, 1983). Outro fungo cuja patogenicidade já foi comprovada para *A. sexdens rubropilosa* é a espécie *Isaria farinosus* (=*Paecilomyces farinosus*) (LOUREIRO; MONTEIRO, 2005).

Em formigas cortadeiras, a ação de micro-organismos testados varia muito em função da casta estudada e da forma de aplicação (DIEHL-FLEIG et al., 1988). Além disso, estes insetos têm desenvolvido diferentes estratégias para manter a cultura do fungo simbionte sem substancial crescimento de micro-organismos prejudiciais, apesar da contínua exposição a micro-organismos do solo e aos presentes no material vegetal que as operárias levam para o jardim de fungos (CURRIE et al., 1999; CURRIE; STUART, 2001). Apresentam eficiência na defesa da colônia, reconhecendo material danoso, inclusive micro-organismos entomopatogênicos, e demonstram reações comportamentais tais como remoção do material contaminante do ninho, incluindo formigas doentes ou mortas (KERMARREC et al., 1986).

A necessidade de reduzir os impactos ambientais causados pelo uso excessivo dos agroquímicos tem motivado estudos de formas alternativas para controle de pragas, dentre eles o uso de fungos entomopatogênicos. O conhecimento de fungos de ocorrência natural em formigas pode auxiliar na busca de novas alternativas eficazes no controle desses insetos. Assim, o objetivo do presente trabalho foi isolar e caracterizar fungos filamentosos (com ênfase nos entomopatogênicos) de ocorrência natural em rainhas do gênero *Atta*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Insetos Sociais Praga, no Setor de Defesa Fitossanitária do Departamento de Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA), UNESP, localizado no município de Botucatu – SP.

2.1 Coleta de rainhas para isolamento de fungos

Uma amostra de 500 rainhas de *Atta* spp., principalmente *A. sexdens rubropilosa* foi coletada no Campus da FCA/UNESP, no período da revoada, logo após descerem ao solo para fundação dos ninhos. A coleta ocorreu em dois anos consecutivos (2007 e 2008), totalizando 1000 espécimes no período de estudo. As rainhas recém coletadas foram armazenadas em recipientes plásticos com 11 cm de diâmetro, 8 cm de altura, contendo 1 cm de gesso no fundo e a temperatura do laboratório foi mantida à 24°C. A umidade do pote foi controlada adicionando-se água destilada.

2.2 Isolamento e identificação dos fungos

Durante o período de 90 dias após a coleta, acompanhou-se diariamente a mortalidade das rainhas. As rainhas mortas foram desinfectadas para isolamento de fungos. A desinfecção ocorreu superficialmente através da imersão por dois minutos em solução de álcool 70%, em hipoclorito de sódio 2% e, posteriormente, em água destilada. Em seguida, retirou-se uma porção interior do tecido do tórax com bisturi esterilizado. Tal fragmento foi inoculado em ágar batata-dextrose suplementado com penicilina-G e incubado à 25°C no escuro durante três a quatro dias. Os fungos que se desenvolveram nesses fragmentos foram isolados, purificados e armazenados à 9°C. Os isolados representativos foram identificados através de métodos clássicos descritos na literatura, principalmente, baseados na morfologia da colônia e das estruturas de reprodução (DOMSCH et al., 1980; SAMSON et al. 2000; SUNG et al., 2007). A desinfecção e isolamento dos fungos ocorreram em câmara asséptica.

2.3 Preservação e manutenção dos fungos

Os isolados foram preservados em tubos de vidro com ágar inclinado à ± 5°C. Adicionalmente, os fungos foram preservados pelo método de Castellani (1967) apud Smith e Onions (1983). Tal método consiste na preservação das cepas de fungos em frascos estéreis de vidro contendo 4 mL de água destilada estéril. Os vidros foram fechados hermeticamente com tampas especiais de borracha e cinta de alumínio e conservados a à ± 5°C.

2.4 Caracterização dos isolados

Os isolados de fungos extraídos de rainhas de *Atta* spp. e caracterizados neste estudo foram: BBOT01, BBOT04, BBOT05, BBOT06, BBOT07, BBOT10, BBOT11, BBOT12 e BBOT18 de *B. bassiana*, IBOT25 de *I. fumosorosea*, PBOT31, PBOT33, PBOT35 e PBOT36 de *P. lilacinus* e ABOT01 de *A. flavus*.

Como parâmetro para caracterização dos isolados foi estudado o número, o tamanho, a viabilidade dos conídios, além do crescimento micelial das colônias de fungos. Tais isolados também caracterizados quanto o aspecto geral da colônia e dos conídios.

Para avaliação do número, tamanho, viabilidade dos conídios e crescimento radial das colônias, os fungos foram primeiramente crescidos em meio BDA à 27 ± 1 °C, umidade relativa do ar acima de 80% e fotofase de 12 horas por 12 dias, no escuro.

2.4.1. Número e tamanho dos conídios

Foram preparadas suspensões de cada isolado e para contagem dos conídios, 1 alíquota de suspensão foi colocada em câmara de Neubauer, sendo os conídios contados em microscópio no aumento de 400x.

Para a medição do tamanho dos conídios, foram preparadas 4 lâminas de cada isolado e 30 conídios por lâmina foram medidos através do sistema de captura de imagem DN2 Microscope Image Processing System, no aumento de 400x. As características avaliadas foram tamanho dos conídios e a relação comprimento/ largura, determinando-se a forma dos conídios segundo Feitosa et al. (1977) apud Souza et al. (2007): Ccc = cilíndrico muito curto,

relação menor que 2,00; Cc = cilíndrico curto, relação entre 2,00 e 2,50; C = cilíndrico, entre 2,50 e 3,00; f = fusiforme, entre 3,00 e 3,50; ff = fusiforme muito alongado, relação maior do que 3,5.

2.4.2 Viabilidade dos conídios

A viabilidade dos isolados foi avaliada determinando-se o percentual de germinação dos conídios e o crescimento da colônia. Para a germinação, os conídios foram avaliados através de microcultivo e exame direto em lâmina.

Para a realização dos ensaios, foram marcados previamente cinco círculos na face inferior de cada placa de Petri. Em cada círculo foi inoculado 0,1 mL de suspensão fúngica com 10^5 conídios/mL. As placas foram incubadas a 27 ± 1°C na ausência de luz durante 18h. Após este período, foi colocada uma gota do corante lactoglicerol sobre a área do círculo, para deter a germinação e facilitar a visualização do conídio. Em seguida foi feita a contagem de 150 conídios em cada área, utilizando-se o aumento de 400x. Foram contados conídios germinados e não germinados, estabelecendo-se depois o percentual de germinação.

2.4.3 Crescimento micelial da colônia

Para a avaliação do crescimento micelial da colônia, para cada isolado, um cilindro de 7 mm de diâmetro de BDA contendo micélio da colônia foi inoculado em meio BDA e o crescimento foi quantificado através de medidas (em milímetros) de dois diâmetros previamente marcados na parte externa do fundo da placa de Petri. As medidas foram efetuadas a cada três dias, do 3^o ao 18^o dia após a inoculação. Para cada isolado foram realizados quatros repetições.

Para verificação da capacidade de esporulação das colônias cujo crescimento micelial foi acompanhado, fez-se uma suspensão de esporos, adicionando-se 10 mL de água destilada esterilizada em cada placa. Uma alíquota de 10 µL foi retirada para verificação de esporos em câmara de Neubauer.

2.5 Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. O comportamento do crescimento micelial foi avaliado através de análise de regressão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização dos isolados

Dentre os fungos isolados de tecido interno das rainhas ocorreu predomínio dos gêneros *Aspergillus*, *Beauveria*, *Fusarium*, *Paecilomyces* e *Isaria*. No total, foram encontrados 19 isolados de *B. bassiana*, 6 de *I. fumosorosea* e 12 de *P. lilacinus*, além de vários isolados de *F. oxysporum*, *F. solani*, *A. flavus e A. niger* Os isolados de *B. bassiana* foram identificados com o código de BBOT01 à BBOT22. Os isolados de *I. fumosorosea* receberam a codificação de IBOT23 a IBOT26 e os isolados de *P. lilacinus* foram codificados em PBOT27 a PBOT38.

3.1.1 Aspecto geral da colônia e conídios

Isolados de *B. bassiana* apresentaram colônias de coloração branca, com micélio hialino, centro levantado e de aspecto pulverulento devido à forte esporulação (Figura 1a), no reverso foi verificado aspecto incolor ou amarelo claro no centro da placa, para maioria dos isolados. Os conídios foram identificados como sub-hialinos, globoso ou elipsoidal com parede lisa (Figura 1e).

A maioria dos isolados de *P. lilacinus* mostraram colônia com micélio flocoso, coloração vinho e reverso incolor (Figura 1c), abundante esporulação rosada, sendo os conídios elipsóides, com parede lisa (Figura 1h). O fungo *I. fumosorosea*, apresentou colônia com coloração rosa abundante, aspecto também flocoso, com reverso laranja (Figura 1d) e conídios fusiformes e cilíndricos, hialinos e de parede lisa. *A. flavus* apresentou micélio de cor branco e conídios esféricos ou semi-esféricos, levemente rugosos (Figura 1b; g).

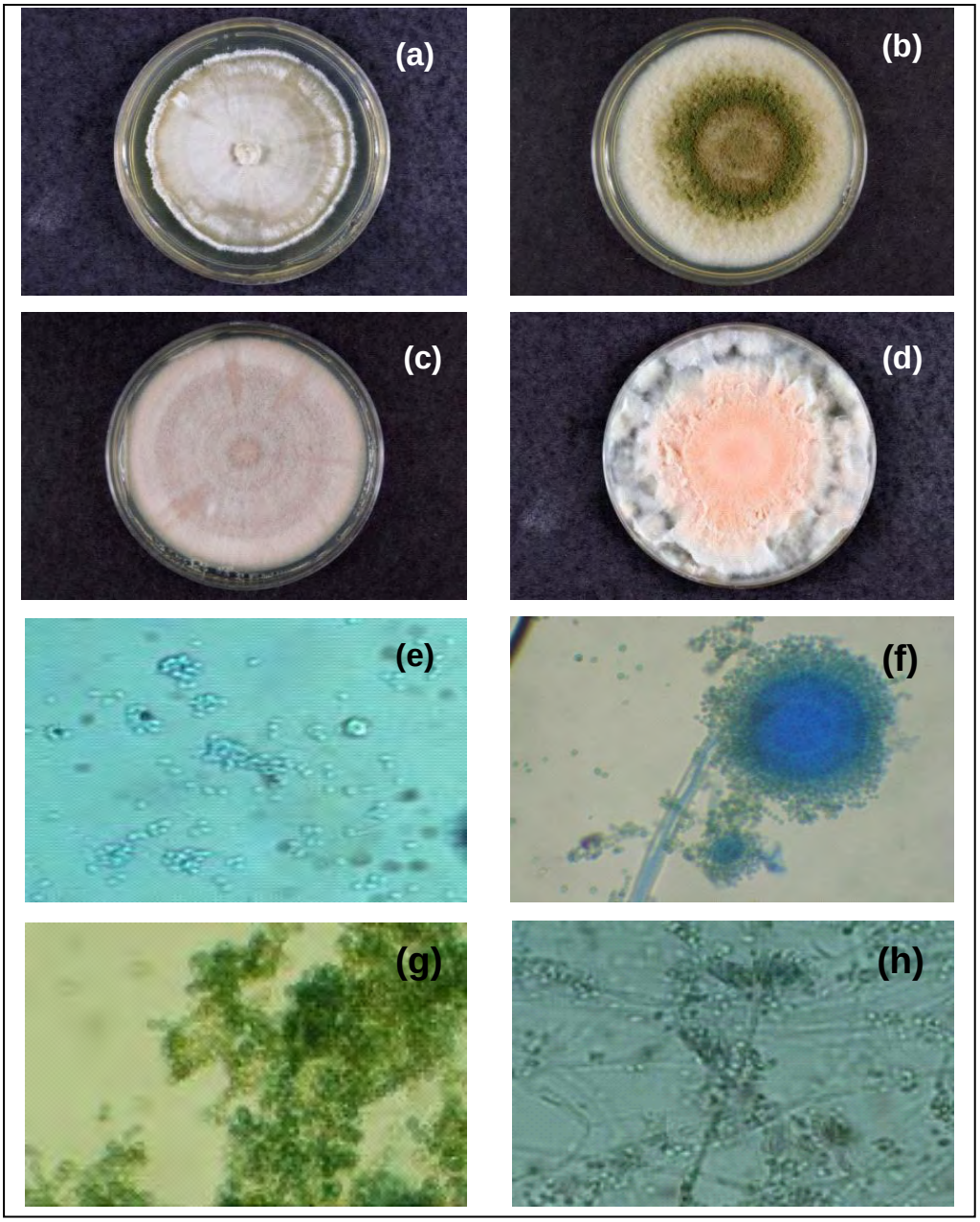

Figura 1. Aspecto geral da colônia de (a) *Beauveria bassiana*, (b) *Aspergillus flavus*, (c) *Paecilomyces lilacinus* e (d) *Isaria fumosorosea*; (e) conídios de *B. bassiana*, (f e g) conidióforo e conídios de *A. flavus*, respectivamente, (h) conidióforo e conídios de *P. lilacinus*.

3.1.2 Número, tamanho e viabilidade dos conídios

Entre os isolados de *B. bassiana*, o número de conídios variou de 1,25 x10^6 a 5,64x10^6, respectivamente para BBOT01 e BBOT18, ambos isolados de *B. bassiana*. O tamanho dos esporos de *B. bassiana* variou entre 2,29x1,71 µm e 2,51x2,02 µm;. entre 2,46x1,91 µm e 2,75x2,14 µm para *P. lilacinus*. O cilíndrico médio dos conídios dos isolados de *B. bassiana*, *P. lilacinus* e *I fumosorosea* foi considerado muito curto, pois a razão entre comprimento e largura não ultrapassou 2,00 µm. Apenas para *A. flavus* foi considerado fusiforme (Tabela 1).

O cálculo de viabilidade dos conídios revelou percentual acima de 90% para todos os isolados estudados, sendo o percentual de germinação após 17 h de inoculação superior para os isolados IBOT33 (98,40%), IBOT35 (97,07%) e IBOT36 (97,20%) (p=0,05, C.V%: 3,23).

Tabela 1. Número, tamanho e viabilidade dos conídios de *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* e *Paecilomyces lilacinus*, re-isolados de operárias de *Atta sexdens rubropilosa*. Botucatu (SP), 2010.

Isolados	Fungo	Número (10^6)	Tamanho (µm)	Cilindro (µm)	Viabilidade (%)
BBOT01	*Beauveria bassiana*	1,25	2,29x1,71	1,37	93,73 ab
BBOT04	*Beauveria bassiana*	2,16	2,00x2,01	1,20	95,73 ab
BBOT05	*Beauveria bassiana*	4,26	2,33x1,85	1,25	92,80 ab
BBOT06	*Beauveria bassiana*	3,00	2,43x2,01	1,23	96,00 ab
BBOT07	*Beauveria bassiana*	3,73	2,34x1,83	1,27	90,13 b
BBOT10	*Beauveria bassiana*	3,70	2,37x2,07	1,17	93,47 ab
BBOT11	*Beauveria bassiana*	3,47	2,38x1,86	1,30	94,40 ab
BBOT12	*Beauveria bassiana*	2,22	2,51x2,02	1,24	92,80 ab
BBOT18	*Beauveria bassiana*	5,64	2,29x1,85	1,27	94,27 ab
IBOT25	*Isaria fumosorosea*	1,42	2,70x2,01	1,35	93,60 ab
PBOT31	*Paecilomyces lilacinus*	2,31	2,30x1,90	1,21	93,60 ab
PBOT33	*Paecilomyces lilacinus*	2,17	2,46X1,91	1,31	98,40 a
PBOT35	*Paecilomyces lilacinus*	7,14	2,40x2,91	1,27	97,07 a
PBOT36	*Paecilomyces lilacinus*	5,16	2,75x2,14	1,36	97,20 a

*Tamanho dos conídios: Comprimento x largura.

3.1.3 Crescimento micelial

Por meio da análise de regressão do crescimento micelial dos isolados foi verificado que, houve interação entre o tempo de inoculação em BDA e o crescimento micelial, sendo o modelo linear o que melhor se aplicou para todos os isolados de *B. bassiana* (Figura 4A – 4F, 5A – 5C).

Para *A. flavus* e alguns isolados de *P. lilacinus*, o crescimento micelial das colônias em função do tempo de inoculação ocorreu pelo modelo polinomial, o que pode ser explicado pelo fato do diâmetro máximo (80,00 mm) ter sido alcançado nos primeiros dias de avaliação, demonstrando alta velocidade de crescimento micelial em BDA. Foram eles: PBOT31 (r^2=0,9591), PBOT35 (r^2 =0,9695) e PBOT36 (r^2=0,9401) e ABOT01 (r^2=0,9748) (Figura 5E, 6A, 6B e 6D). Contudo, PBOT33 (r^2=0,9794) e PBOT38 (r^2=0,9855) apresentaram modelo linear de crescimento micelial da colônia (Figura F e 5C), assim como IBOT25 (r^2=0,9592) (Figura 5D).

A média do diâmetro micelial para isolados de *B. bassiana* por tempo de inoculação foi: 3 dias: 12,60 ±0,66 mm; 6 dias: 17,21±2,34 mm; 9 dias: 25,85 ±2,88 mm; 15 dias: 37,21±3,73 mm e aos 18 dias: 47,40±5,75 mm. Calculando o crescimento a cada três dias, verificou-se que as colônias apresentaram tamanho médio de 4,61 mm, 8,64 mm, 5,48 mm, 5,88 mm e 10,19 mm, respectivamente para os períodos 3, 6, 9, 12, 15 e 18 dias após inoculação (Tabela 2).

O crescimento médio para os isolados de *P. lilacinus* foi de 21,55±9,55mm, 35,81±14,56 mm, 58,94±14,02mm, 66,11±9,49mm, 74,65±5,50mm e 79,20 ±0,86mm, respectivamente para os períodos 3, 6, 9, 12, 15 e 18 dias após inoculação. Isso correspondeu a um crescimento médio nas colônias de 14,26 mm, 23,13 mm, 7,17 mm, 8,54 mm, 4,55 mm.

Os gêneros *Aspergillus*, *Isaria* e *Paecilomyces* apresentaram crescimento micelial mais rápido do que todos os isolados de *B. bassiana*. O isolado ABOT01 (*A. flavus*) e IBOT35 (*P. lilacinus*) atingiram o máximo diâmetro permitido pelo tamanho da placa (80 mmm) aos 9 dias, enquanto o isolado IBTO25 (*I. fumosorosea*) atingiu 80,00 mm aos 12 dias. Os demais isolados atingiram ou ficaram próximos dos 80 mm de diâmetro micelial aos 18 dias da inoculação. Para todos os isolados avaliados a capacidade de esporulação foi confirmada por meio da visualização dos conídios a partir de lâminas preparadas em câmara de Neubauer.

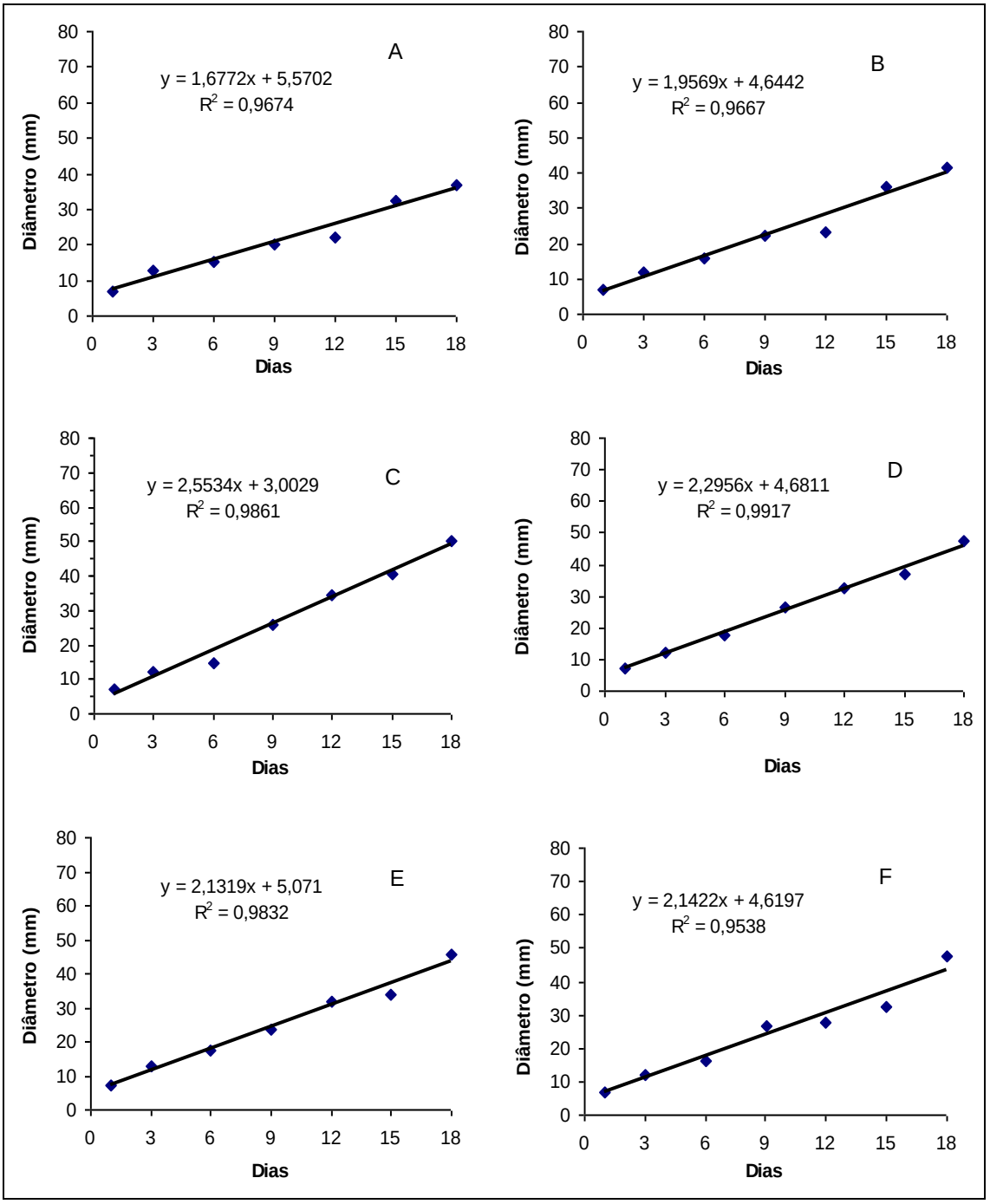

Figura 4. Equação de regressão para o crescimento micelial dos isolados de *Beauveria bassiana*: (A) BBOT01, (B) BBOT04, (C) BBOT05, (D) BBOT06, (E) BBOT07 e (F) BBOT10.

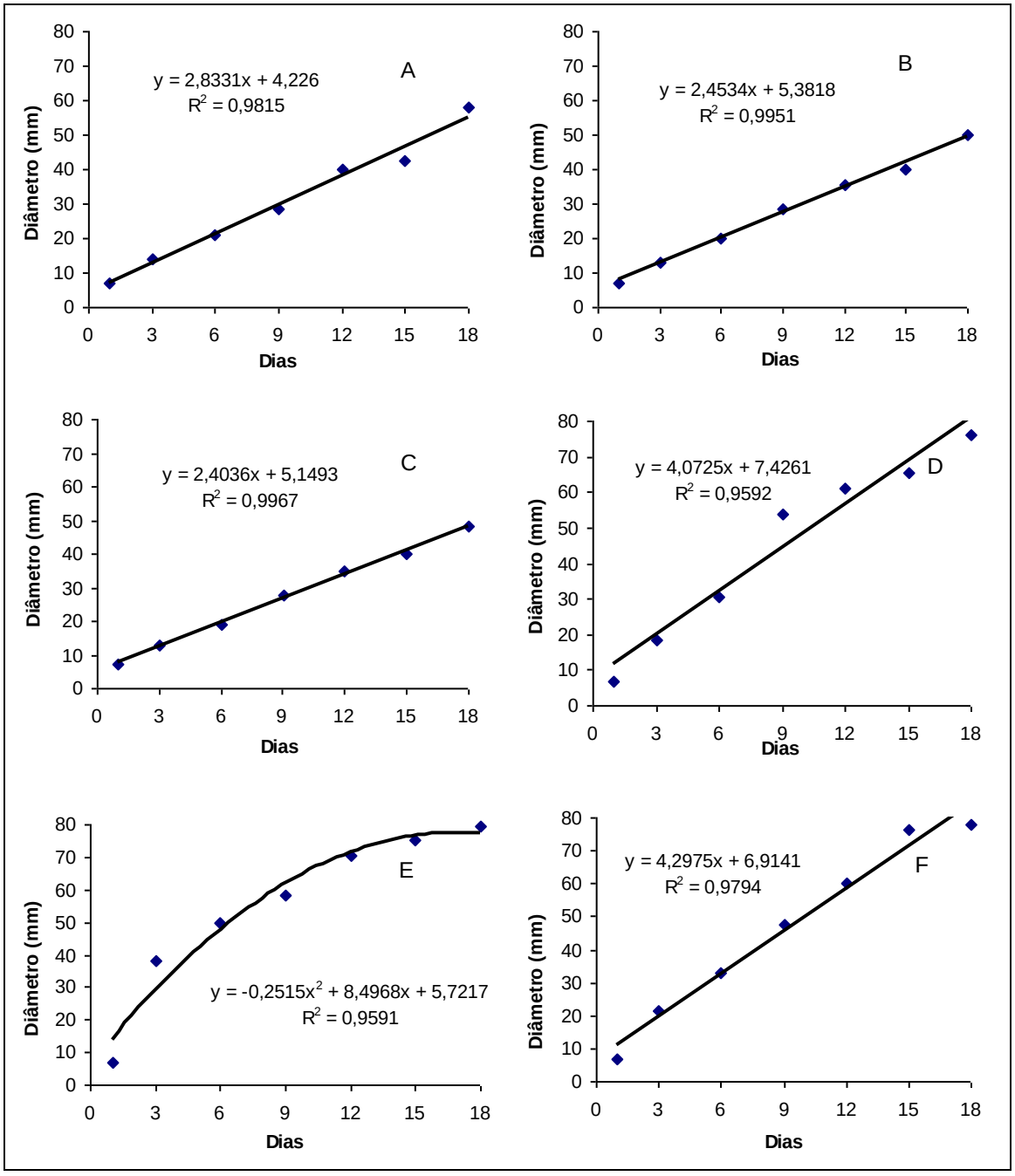

Figura 5. Equação de regressão para o crescimento micelial dos isolados de fungos entomopatogênicos: (A) BBOT11, (B) BBOT12, (C) BBOT18 de *Beauveria bassiana*, (D) IBOT25 de *Isaria fumosorosea* e (E) PBOT31 e (F) PBOT33 de *Paecilomyces lilacinus*.

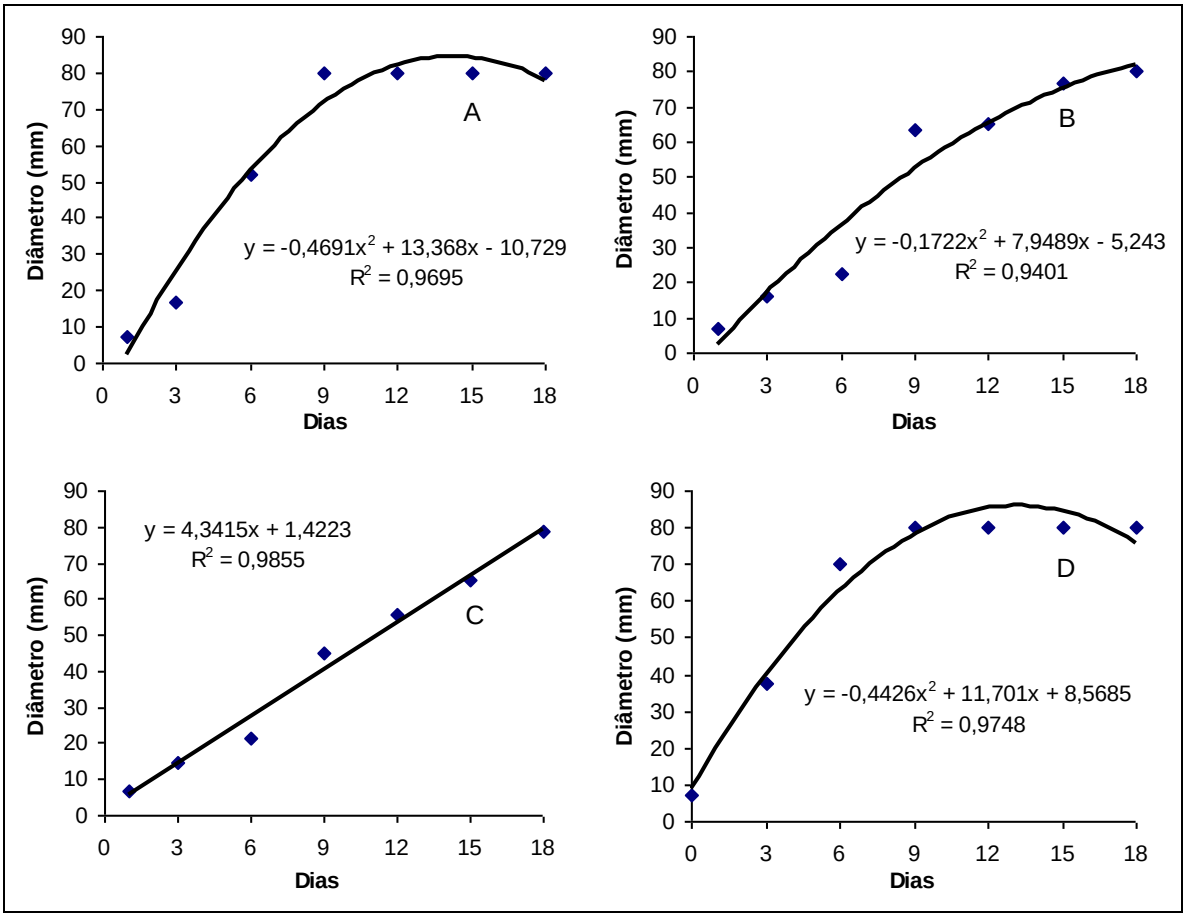

Figura 6. Equação de regressão para o crescimento micelial dos isolados de *Paecilomyces lilacinus*: (A) PBOT35, (B) PBOT36, (C) PBOT38 e (D) ABOT01.

3.1.4 Comparação entre o crescimento micelial dos isolados.

O crescimento micelial apresentou pouca diferenciação entre isolados de uma mesma espécie, ao contrário do que ocorreu quando se compara isolados de espécies diferentes. No geral, isolados de *P. lilacinus* e *I. fumosorosea* cresceram mais rapidamente em relação ao crescimento de colônias de *B. bassiana*. Em todos os períodos avaliados a diferenças foram significativas à 1% de probabilidade ($p<0,0001$) (Tabela 2).

Entre os isolados de *B. bassiana* somente ocorreu diferença no período compreendido entre 15-18 dias da inoculação, sendo o BBOT11 superior à BBOT01, BBOT04 e BBOT07.

Os isolados de *Isaria* apresentaram diferença no crescimento micelial na maioria dos períodos avaliados, com tendência à diminuição com o decorrer do tempo de inoculação, alcançando os isolados semelhança no diâmetro médio no último período avaliado (15-18 dias da inoculação).

Em todos os períodos os isolados IBOT25, PBOT31, PBOT35 e ABOT01 destacam-se como os de maior diâmetro micelial em função do tempo de inoculação. No período 3 dias, IBOT31 apresentou maior diâmetro médio (38,00 mm) e apenas não diferiu de ABOT01 (37,75 mm); no período 6 dias foi verificado maior diâmetro médio ABOT01 (69,87 mm), PBOT31 (49,94 mm) e PBOT35 (52 mm), diferindo dos demais isolados. Ocorreu também diferença entre o período 9 dias, sendo os isolados de maior diâmetro micelial: IBOT25 (79,12 mm), PBOT35 (80,00 mm), PBOT36 (63,97 mm) e ABOT01 (80,00 mm), diferindo IBOT25 e PBOT35 dos isolados PBOT31 (58,19 mm), PBOT33 (47,62 mm) e PBOT38 (45,12); no período de 9-12 dias, a diferença ocorreu entre IBOT25 e PBOT35 apenas não diferiram de PBOT31 (70,25 mm) e PBOT36 (65,00 mm); período de 15 dias IBOT25 e PBOT35 apenas diferiu de PBOT38 (65,67 mm).

Comparando as espécies, a diferença de crescimento micelial também foi significativa. Aos 3 e 6 dias de inoculação em BDA, PBOT31, PBOT33 e ABOT01 diferiram significativamente em relação a todos os demais isolados. Aos 9 dias, IBOT25 e PBOT35 e ABOT01 diferiram dos demais isolados, apresentando 79,12, 80,00 e 80,00 cm de diâmetro. Nos outros períodos avaliados, todos os isolados de *P. lilacinus*, o isolado de *I. fumosorosea* e *A. flavus* apresentaram diâmetro médio superior, significativamente, em relação aos isolados de *B. bassiana*.

Tabela 2. Comparação entre o crescimento micelial das colônias de *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* e *Paecilomyces lilacinus* e re-isolados de operárias do gênero *Atta sexdens rubropilosa*, em meio BDA, por tempo de inoculação. Botucatu (SP), 2010.

	Crescimento micelial (mm)					
	(Dias)					
Tratamento	3	6	9	12	15	18
	Beauveria bassiana					
BBOT01	12,62 d	15,19 cd	20,25 e	22 d	32,44 c	37,81 c
BBOT04	12,00 d	15,87 cd	22,25 e	23,37 d	35,87 c	41,37 c
BBOT05	12,19 d	14,50 d	25,68 e	34,22 d	40,62 c	59,20 bc
BBOT06	11,94 d	15,44 bcd	26,56 e	32,62 d	36,75 c	47,37 bc
BBOT07	12,75 d	17,44 bcd	23,50 e	31,56 d	33,94 c	45,75 c
BBOT10	12,06 d	16,31 cd	26,56 e	27,50 d	32,62 c	47,37 bc
BBOT11	13,94 cd	21,19 bcd	28,25 e	40,12 cd	42,31 c	58,21 b
BBOT12	13,25 d	20,06 bcd	28,50 de	35,44 d	40,19 c	50,25 bc
BBOT18	12,69 d	18,87 bcd	27,81 de	35,12 d	40,12 c	48,25 bc
Média	**12,60±0,66**	**17,21±2,34**	**25,85±2,88**	**31,33±5,95**	**37,21±3,73**	**47,40±5,75**
	Isaria fumosorosea					
IBOT25	16,00 cd	25,25 bcd	79,12 a	80,00 a	80,00 a	80,00 a
	Paecilomyces lilacinus					
PBOT31	38,00 a	49,94 a	58,19 bc	70,25 ab	75,00 ab	79,25 a
PBOT33	21,56 b	33,00 b	47,62 bc	59,87 b	76,37 ab	78,00 a
PBOT35	16,81 cd	52,00 a	80,00 a	80,00 a	80,00 a	80,00 a
PBOT36	16,94 cd	22,62 bcd	63,75ab	65 ab	76,50 ab	80,00 a
PBOT38	14,44 cd	21,50 bcd	45,12 cd	55,62 bc	65,37 b	78,75 a
Média	**21,55±9,55**	**35,81±14,56**	**58,94±14,02**	**66,11±9,49**	**74,65±5,50**	**79,20±0,86**
	Aspergillus flavus					
ABOT01	37,75 a	69,87 a	80,00 a	80,00 a	80,00 a	80,00 a
P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
CV%	12,21	25,66	17,14	16,35	9,09	7,96
d.m.s.	4,97	17,97	16,06	19,67	12,39	12,44

Estudos sobre comportamento dos fungos, tais como germinação, esporulação, número de colônias e crescimento radial são realizados para auxiliar na caracterização de fungos entomopatogênicos. Segundo Liu *et al*. (2003), esses parâmetros são importantes para definir a virulência de um isolado fúngico sendo, portanto, escolhidos no presente trabalho para auxiliar na caracterização da virulência dos fungos isolados de *Atta* sp.

Os conídios estudados estão de acordo com a descrição feita por Alves (1998): conídios de *B. bassiana* globoso ou semigloboso com comprimento e largura variando entre 2x2 a 3x2 µm; conídios de *I. fumosorosea* alongados e ovóides menores ou igual a 3 µm e *P. lilacinus* apresentando conídios elipsóides a fusóides com 2 a 3 µm.

Todos os isolados germinaram até 18 horas após a inoculação em BDA. De acordo com Alves (1998), o tempo de germinação pode variar de 18 a 24 horas para fungos sem armazenamento ou armazenados em freezer. A germinação de um isolado é uma importante característica dos fungos e para *B. bassiana* e *I. fumosorosea*, quanto maior a velocidade de germinação, maior a viabilidade do isolado (JACKSON et al., 1985 apud ALVES, 1998).

De acordo com Alves (1998) a rápida esporulação pode ser um importante critério para seleção de isolados fúngicos, pois auxilia na propagação de epizootias, além de ser uma vantagem em relação às defesas humorais de insetos; contudo, a velocidade de esporulação pode ser facilmente alterada por fatores abióticos como a temperatura e a umidade.

O crescimento radial também é empregado para avaliar linhagens quanto à virulência, pois, conforme Haejek; St. leger (1994) a taxa de crescimento radial pode está diretamente associada à velocidade de infecção no hospedeiro. Isolados de *P. lilacinus* e o isolado de *I. fumosorosea* apresentaram crescimento mais rápido comparados aos de *B. bassiana*, o que pode sugerir que venham a apresentar maior velocidade de infecção quando inoculados ao hospedeiro, embora essa característica, sozinha, possivelmente não consiga retratar o potencial de virulência de um determinado isolado. Entre isolados de *P. lilacinus* ocorreu diferença no crescimento micelial, e de acordo com Fargues et al. (1997) é comum a diferença entre o crescimento entre isolados de uma mesma espécie.

Assim, características morfológicas e comportamentais de fungos em meios de cultura podem auxiliar os testes de patogenicidade e virulência na seleção de isolados com maior potencial de causar doenças e realizar controle de insetos.

4 CONCLUSÕES

- Todos os isolados estudados apresentaram elevado percentual de esporulação, revelando alta viabilidade, recomendável para testes de patogenicidade em formigas do gênero *Atta*;

- Além da viabilidade, o crescimento micelial de todos os isolados apresentou comportamento desejável para um agente de controle biológico; contudo, os isolados de *P. lilacinus*, *I. fumosorosea* e *A. flavus* cresceram mais rapidamente.

Capítulo 4

PATOGENICIDADE DE FUNGOS À OPERÁRIAS DE *Atta sexdens rubropilosa* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

RESUMO

O estudo teve como objetivo testar a patogenicidade de isolados de *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces lilacinus* e *Isaria fumosorosea*, isolados de rainhas de *Atta* spp., em operárias de *Atta sexdens rubropilosa*. Foram realizados dois bioensaios para testar a patogenicidade dos isolados: (1) isolados retirados diretamente de tecido do tórax da rainha e (2) fungos re-isolados das operárias. Para tal, foram preparadas suspensões contendo $1x10^8$ conídios/mL e inoculadas em operárias por imersão nas suspensões. Foram testados 16 isolados e dois tratamentos controle (1) imersão de operárias em água destilada esterilizada e (2) imersão em suspensão do produto comercial boveril. Após imersão, as operárias foram colocadas em câmara úmida e mantidas a 25^{o}C e umidade relativa acima de 80%. Para cada tratamento foram utilizadas 20 formigas e cinco repetições, totalizando 100 formigas por tratamento. Diariamente foi contabilizado o número de formigas mortas, até a mortalidade total. Foi calculada a mortalidade acumulada, corrigida e confirmada para ambos os experimentos. Os dados foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados revelaram que todos os isolados testados possuem potencial patogênico para operárias de *A. sexdens rubropilosa*. Através do experimento I os isolados BBOT11 (*B. bassiana*) e PBOT33 (*P. lilacinus*) apresentam menor TL_{50}, respectivamente, 1,75 e 1,65 horas. No experimento II, destacaram-se BBOT01, BBOT11, BBOT12, PBOT33 e PBOT35, apresentando os respectivos TL_{50}: 1.99, 2.28, 2.17, 2.62 e 2.34 dias, sendo considerados os mais virulentos, causando mortalidade de 50% ou mais das operárias após 72 horas da inoculação.

Palavras-chave: Formiga cortadeira, isolados, bioensaios, mortalidade.

Chapter 4

PATHOGENICITY OF FUNGI IN THE WORKERS OF *Atta sexdens rubropilosa* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

ABSTRACT

Had the objective is to test the pathogenicity of isolates of *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces lilacinus* and *Isaria fumosorosea*, isolated from queens of *Atta* spp., on workers of *Atta sexdens rubropilosa*. Two bioassays were conducted to test the pathogenicity of the isolates: (1) isolated from tissue taken directly from the thorax of the queen and (2) fungi re-isolated from workers. To this end, suspensions were prepared containing $1x10^8$ conidia / mL and inoculated on workers by immersion in suspensions. It was tested 16 isolates, including a commercial product Boveril and the control (immersion of the workers in sterile distilled water) and two control treatments (1) immersion of the workers in sterile water and (2) immersion in the suspension of commercial product boveril. After immersion, the workers were placed in a moist chamber and kept at 25oC and relative humidity above 80%. For each treatment used 20 ants and five replications, totaling 100 ants per treatment. Was recorded daily the number of dead ants, until the total mortality. Cumulative mortality was calculated, corrected and confirmed in both experiments. Data were submitted to ANOVA and means compared by Tukey test at 5% probability. The results revealed that all isolates tested possess pathogenic potential for workers of *A. sexdens rubropilosa*. Through the experiment I, the isolates BBOT11 (*B. bassiana*) and IBOT33 (*Paecilomyces lilacinus*) have lower LT_{50}, respectively, 41.91 and 39.56 hours. In the second experiment it was highlighted BBOT01, BBOT11, BBOT12, IBOT33 and PBOT35, presenting, respectively, their LT_{50} as: 1.99, 2.28, 2.17, 2.62 e 2.34 days, being considered the most virulent, causing mortality of 50% or more of workers after 72 hours inoculation.

Keywords: Leaf-cutter ant, isolated, bioassays, mortality.

1. INTRODUÇÃO

A tribo Attini (Hymenoptera: Formicidae: subfamília: Myrmicinae) é composta por 13 gêneros compreendendo 202 espécies e 85 variedades (KEMPF, 1972 apud SCHULTZ; MEIER, 1995; BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES, 2001). As formigas cortadeiras, gêneros *Atta* (saúvas) e *Acromyrmex* (quenquéns) pertencem a essa tribo e são consideradas pragas de grande importância devido a prejuízos causados à agricultura, atividades pecuárias e silvicultura (FOWLER, 1979).

Apesar da literatura apresentar inúmeros métodos de controle, na prática, o método químico é a forma de controle efetivamente utilizada. Embora seja considerado prático, nem sempre é eficiente e pode envolver alto custo operacional, tendo demonstrado inconveniência devido à falta de especificidade, contaminação do meio ambiente e toxicidade para o aplicador (JACCOUD, 2000; LOUREIRO; MONTEIRO, 2004).

Dessa forma, por razões ambientais, tem crescido a demanda por novas tecnologias que contribuam para uma agricultura sustentável. Como resposta, a pesquisa científica tem avançado em projetos visando alternativas para o controle químico de formigas cortadeiras. Em alternativa ao uso das substâncias químicas, testes já foram realizados com

nematóides, ácaros e fungos entomopatogênicos encontrados na natureza associados a ninhos das cortadeiras (DELLA LUCIA et al. 1993b). O conhecimento a respeito de tais inimigos ainda é pequeno, sendo que os estudos tem se concentrados principalmente em testes com fungos entomopatogênicos.

Em laboratório e campo, o potencial patogênico de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, comumente utilizados no controle de várias pragas agrícolas, como a cigarrinha da folha da cana-de-açúcar e de pastagens, sinalizaram para o potencial patogênico que exercem nas operárias de *A. sexdens rubropilosa* (ALVES; SOSA GOMES, 1983; JACCOUD et al.1999, LOUREIRO; MONTEIRO, 2005; CASTILHO et al., 2010), *Atta cephalotes* (LÓPEZ et al. 1999; LOPEZ; ORDUZ, 2003), *A. sexdens piriventris* (DIEHL-FLEING et al., 1992), *Atta bisphaerica* (CASTILHO et al.; 2010) e *Acromyrmex* sp. (DIEHL-FLEIG, 1987; DIEHL-FLEIG et al.1988; SILVA; DIEHL-FLEIG, 1988; DIEHL-FLEIG et al. 1992; DIEHL-FLEIG et al., 1993).

Estudos sobre o potencial patogênico dos fungos em formigas cortadeiras contribuem para o conhecimento a cerca do controle biológico desse grupo de insetos. Portanto, através o presente estudo teve-se como objetivo verificar a patogenicidade de fungos de ocorrência natural em formigas rainhas do gênero *Atta*, como *B. bassiana*, *P. lilacinus, I. fumosorosea* (*=Paecilomyces fumosoroseus*) e *A. flavus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Insetos Sociais Praga, no Setor de Defesa Fitossanitária do Departamento de Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA), UNESP, localizado no município de Botucatu – SP.

Os fungos foram multiplicados por meio de semeadura de uma suspensão de conídios, seguida de espalhamento com alça de Drigalsky, em placas de Petri contendo meio de batata-dextrose-ágar (BDA). Após a semeadura, para incubação, as placas foram mantidas em câmara B.O.D. a 27 ± 1º C e fotofase de 12 horas, por um período de 12 dias. Após esse período, os conídios foram retirados por meio de raspagem com alça de níquel-cromo e utilizados para

confecção das suspensões utilizadas nos bioensaios, preparadas em solução de água destilada estéril e espalhante adesivo (Tween 80®) a 0,1%.

2.1 Procedência dos isolados

Os isolados testados foram recuperados de rainhas do gênero *Atta*, coletadas por ocasião das revoadas de 2007 e 2008: BBOT01, BBOT04, BBOT05, BBOT06, BBOT07, BBOT10, BBOT11, BBOT12, BBOT18 de *B. bassiana*; IBOT25 de *I. fumosorosea* e PBOT31, PBOT33, PBOT35, PBOT36 e PBOT38 de *P. lilacinus* e ABOT01 de *A. flavus*.

2.2 Avaliação de Patogenicidade

Para comprovar o potencial patogênico dos isolados encontrados em rainhas foram realizados dois experimentos utilizando-se operárias de *A. sexdens rubropilosa*: (i) experimento I, isolados na concentração de $1x10^8$conídios/mL conídios/mL; (ii) Experimento II, re-isolamento dos fungos após inoculação no experimento I e novos testes visando verificação do potencial infectivo dos isolados.

2.3 Preparação das suspensões de fungos

Em cada ensaio, foi preparada suspensão com os isolados e a mesma foi colocada em placa de Petri contendo BDA. Após a incubação a 27 ± 1 °C, umidade relativa do ar acima de 80% e fotofase de 12 horas por 12 dias, a colônia foi retirada através de raspagem do meio de cultura e transferida para tubos de ensaio, com adição de água destilada estéril. Em seguida os tubos foram agitados em agitador orbital vortex para separação dos conídios, formando-se nova suspensão, na qual foi filtrada e colocada em becker de 100 mL. A contagem do número de conídios foi realizada em microscópio óptico, através da câmara de Neubauer. A partir daí padronizou-se uma concentração de $1x10^8$conídios/mL.

2.4 Inoculação em operárias

Operárias médias de *Atta sexdens rubropilosa* foram provenientes de colônias mantidas no Laboratório de Insetos Sociais Praga/ FCA/UNESP/Botucatu, SP. Estas foram coletadas com o auxílio de pinça entomológica, previamente esterilizada e colocadas em frascos plásticos com tampa.

Para a inoculação dos patógenos as formigas foram imersas, individualmente, por 8 segundos, nas suspensões de conídios de cada isolado, nas concentrações determinadas. Posteriormente foram transferidas para câmaras úmidas, consistindo de placas de Petri com papel de filtro umedecido (MONTEIRO, 1988), ambos esterilizados. Em seguida foram incubadas à 25±1 °C, umidade relativa do ar acima de 80%. Além dos tratamentos com fungos, foram preparados dois tratamentos controle: Controle 1: formigas imersas em água destilada esterilizada) e Controle 2: formigas imersas em suspensão de Boveril (bioinseticida comercial de *B. bassiana* com concentração inicial de $5x10^{11}$ conídios viávies/kg). Para cada tratamento foram realizadas cinco repetições, sendo cada repetição constituída de duas câmaras úmidas com 10 formigas cada, totalizando 100 formigas por tratamento.

Os insetos foram mantidos sem alimentação, e para verificação da mortalidade as câmaras foram inspecionadas diariamente até o período de 192 horas. Para cada isolado foi calculada a porcentagem de mortalidade acumulada [= (número de indivíduos mortos/número total de indivíduos)*100] e o percentual de mortalidade corrigida pela fórmula de Abbott (1925), citado em Alves (1998): mortalidade corrigida [= % mortalidade no tratamento – % mortalidade no controle /100 - % mortalidade no controle × 100].

Para confirmação da mortalidade pelos fungos, as formigas mortas foram desinfetadas por 30s em álcool 70%, enxaguadas em água destilada, esterilizada, secas em papel de filtro esterilizado e mantidas em câmara úmida a 25±1^{o}C, 80±1% de UR, no escuro por 10 dias para verificar a extrusão do fungo. A mortalidade confirmada foi representada pela porcentagem de cadáveres de formigas em que ocorreu a extrusão do patógeno.

Para cada bioensaio foi calculada a mortalidade acumulada, corrigida e confirmada das operárias. Os resultados de mortalidade de cada isolado foram comparados em ambos os experimentos, verificando-se o comportamento dos fungos em cada um deles.

2.5. Análises estatísticas

Os resultados da mortalidade acumulada, corrigida e confirmada foram submetidos à ANOVA e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Para o teste de mortalidade acumulada as médias foram transformadas em Raiz de Y+1,0-SQRT (Y+1,0), pelo programa Sisvar. Para obtenção dos valores de TL_{50} (em horas) procedeu-se análise de Probit, através do Programa Statplus.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Patogenicidade dos isolados de *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces lilacinus*, *Isaria fumosorosea* e *Aspergillus flavus*, em operárias de *Atta sexdens rubropilosa*.

Por meio dos resultados apresentados, todos os isolados foram considerados patogênicos para operárias de *A. sexdens rubropilosa*. No experimento I, o potencial patogênico dos fungos testados foi revelado a partir das 24 horas após a inoculação, provocando mortalidade superior à observada no tratamento Controle 1 e continuou até 120h após inoculação, quando ocorreu mortalidade total para maioria dos tratamentos com fungo (Figura 1). Nesse período, o menor percentual de mortalidade (81%) foi evidenciado para PBOT38 enquanto que a maioria dos tratamentos atingiu 100% de mortalidade. No tratamento Controle 1 a mortalidade total ocorreu após 168 horas do início do experimento.

Dentro dos primeiros períodos de avaliação foram observadas diferenças entre a mortalidade nos tratamentos com diferentes isolados da mesma espécie e isolados de diferentes espécies de fungos. Em todos os tempos de observação as diferenças entre os tratamentos foram significativas ($p<0,0001$). Às 24 horas após a imersão das formigas nas suspensões de fungos, os isolados PBOT31 e PBOT33 de *P. lilacinus*, diferiram do tratamento Controle 1, provocando 15 % e 39% de mortalidade nas operárias, respectivamente (CV%= 59,70).

Às 48 horas, PBOT31, PBOT33 e BBOT11 (*B. bassiana*) causaram mortalidade superior ao Controle 1 (5%), sendo estas, respectivamente de 39%, 50% e 54% (CV%= 38,13%). Após 72 horas da inoculação, dos 16 isolados utilizados, cinco de *B. bassiana* e 2 de

P. lilacinus causaram mortalidade em mais de 50% das formigas, diferindo dos Controles 1 e 2 (Boveril), que apresentaram apenas, respectivamente, 10% e 36,25% de mortalidade. Os isolados mais virulentos foram: BBOT04 (56%), BBOT05 (80%), BBOT07 (75%), BBOT11 (96%) e BBOT12 (71%) de (*B. bassiana*), PBOT31 (55%) e PBOT33 (61%) de *P. lilacinus*. BBOT11 com maior percentual de formigas mortas apenas diferiu estatisticamente dos isolados BBOT10 (35%), IBOT25 (36%) e PBOT35 (38%) (CV%=21,55).

Após 96 horas da inoculação, PBOT38 apresentou a menor taxa de mortalidade, 60%, contudo ainda diferiu do Controle 1, que mostrou apenas 36% de formigas mortas (CV%=8,51). Às 120 horas, a mortalidade para operárias tratadas com PBOT38 foi de 81%, sendo os demais tratamentos acima desse percentual, chegando alguns isolados alcançar 100% de mortalidade das formigas, todos diferindo do tratamento do Controle 1, que apresentou percentual de 45% de mortalidade (CV%=4,86). *A. flavus*, após 96 horas de aplicação provocou 62% de mortalidade de operárias.

O resultado obtido através do experimento II (fungos re-isolados) confirmou a virulência da maioria dos isolados que se destacaram no experimento I, com exceção de BBOT04 e revelou aumento no potencial de virulência de outros isolados (Figura 2). A significância também foi de 1% em todos os tempos de observação ($p<0,0001$). A maioria dos tratamentos foram diferentes do Controle 1 para quase todos os períodos observados.

Após 24 horas da inoculação BBOT11 revelou diferença em relação ao tratamento sem fungo, pois apresentou 18,75% de formigas mortas enquanto no Controle 1, a mortalidade foi nula (CV%= 47,14). Às 48 horas do início do experimento, BBOT01 (16,25%), BBOT05 (30%), BBOT10 (28,75%), BBOT11 (23,75%), BBOT12 (38,75%) e PBOT35 (26,25%) deferiram da mortalidade no tratamento Controle 1 que foi de 1,25% (CV%=34,99).

No tempo de 72 horas após a inoculação, os isolados que apresentaram mortalidade de 50% ou mais das operárias foram: BBOT01, com 80%, BBOT05 (66,25%) BBOT06 (66,67%), BBOT07 (50%), BBOT10 (77,50%), BBOT11 (52,25%), BBOT12 (100%), BBOT18 (56,25%), PBOT33, com 68,75% e ABOT01 (*A. flavus*) com 60%. Houve diferença significativa entre BBOT12 e os isolados BBOT07 e BBOT18 (CV%=16,80). Nesse período a mortalidade no tratamento controle encontrava-se abaixo dos 10%. A partir das 96 horas todos os isolados causaram mortalidade diferente do Controle 1 (CV%=12,95), com exceção de IBOT25, que semelhante ao Controle apresentou 26,25 % de mortalidade.

B. bassiana e *I. fumosorosea* são fungos reconhecidamente entomopatogênicos (DOMSCH et al., 1980). *P. lilacinus* considerado fungo de solo, com potencial no controle de nematóides (SANTIAGO et al., 2006; CODIOLI et al., 2007). Porém, foi encontrado parasitando rainhas de *A laevigata* e *A. capiguara* por Rodrigues et al., 2010). *A. flavus*, embora considerado saprófitos (DOMSCH et al., 1980), podem causar doenças em insetos em determinadas circunstâncias (HUGHES; BOOMSMA, 2004).

Os dados de mortalidade acumulada (total) e mortalidade corrigida no tempo de 72 horas após inoculação, e ainda a mortalidade confirmada, para ambos os experimentos, estão resumidos na tabela 1. Em relação à mortalidade acumulada e corrigida para o experimento I, dos 16 isolados testados, BBOT05, BBOT07, BBOT11, BBOT12, PBOT33 e ABOT01 foram os mais virulentos, provocando mortalidade de mais de 50% da população dentro das 72 horas após a inoculação.

Levando em conta o experimento II, destacaram-se os isolados fúngicos BBOT01, BBOT05, BBOT06, BBOT11, BBOT12, BBOT18, PBOT33, PBOT35 e ABOT01. Tal resultado pode está associado ao aumento da virulência dos isolados após re-isolamento. A inoculação em insetos e re-isolamento de fungos consiste numa recomendação para reativar a capacidade infectiva dos isolados (VELEZ et al., 1997, ALVES, 1998).

Com exceção do Controle 1, a mortalidade foi confirmada para todos os tratamentos, pois após lavagem dos cadáveres foi verificada esporulação do patógeno inoculado (Figura 3). Para *A. flavus*, em ambos os experimentos ocorreu 100% de confirmação. Para o controle de insetos sociais, é de grande importância a capacidade de esporulação dos fungos sobre o corpo do inseto (LOPEZ et al. (1999). Pois de acordo Diehl-Fleig et al. (1988), tal comportamento além de ser uma prova da capacidade do fungo em penetrar, colonizar e causar a morte do inseto, pode indicar que os isolados apresentam potencial de causar infecção secundária, contaminando outras formigas dentro da colônia.

As características dos isolados discutidas no capítulo anterior, revelaram que todos eles mostram-se viáveis, com elevados percentuais de esporulação Contudo, alguns destacaram-se quanto ao crescimento micelial como BBOT04, BBOT11 e BBOT12 de *B. bassiana*, IBOT25 de *I.* fumosorosea, ABOT01 de *A. flavus* e basicamente todos os isolados de *P. lilacinus*. Assim, tais resultados somando-se às características de patogenicidade sugere os isolados BBOT11, BBOT12 e PBOT33 como os mais indicados para testes em colônias de *Atta*.

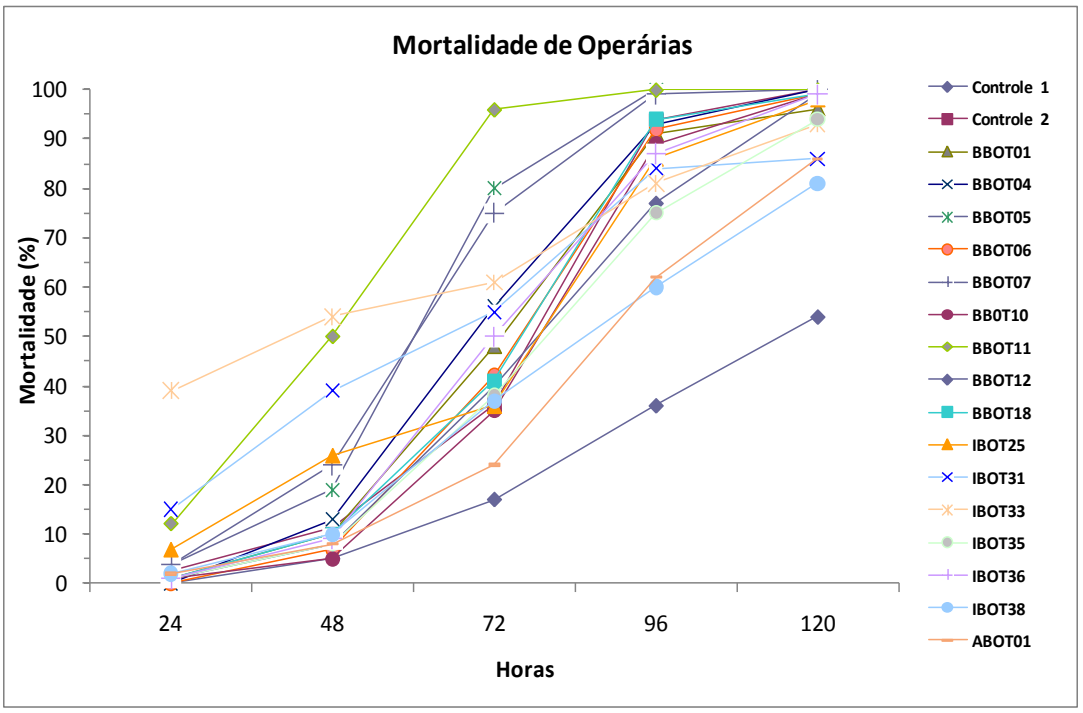

Figura 1. Mortalidade acumulada de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* inoculadas com isolados de *Beauveria bassiana* e *Isaria fumosorosea* e *Paecilomyces lilacinus*, em função do tempo de inoculação – Experimento I.

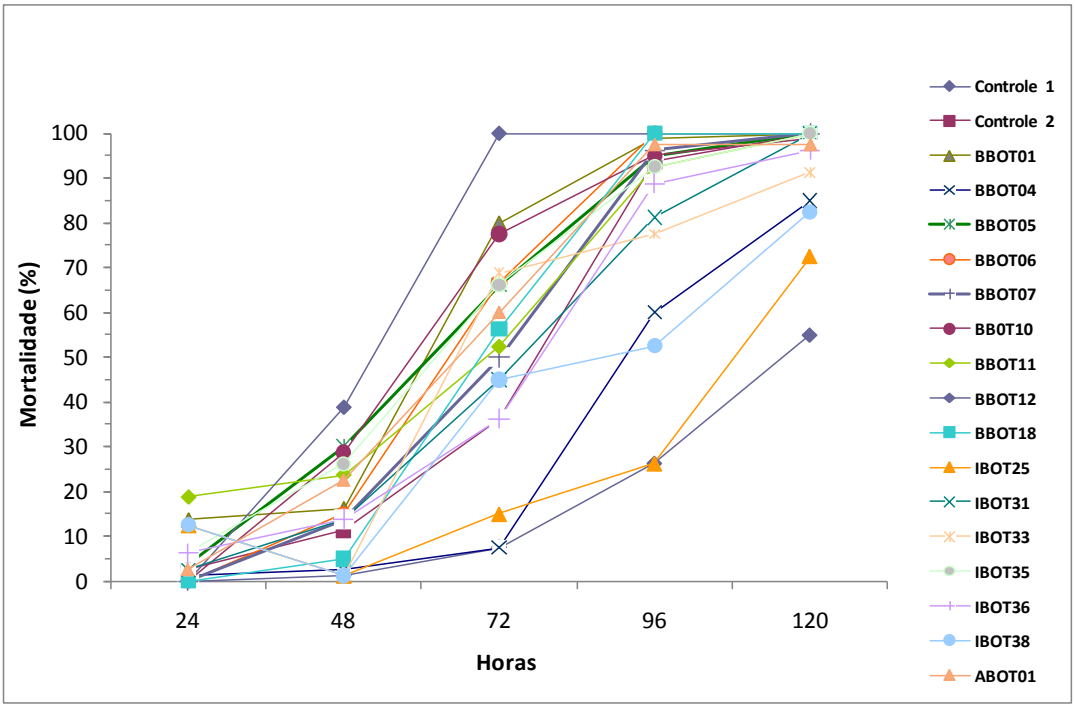

Figura 2. Mortalidade acumulada de operárias de *Atta sexdens rubropilosa*, inoculadas com isolados de *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* e *Paecilomyces lilacinus* em função do tempo de inoculação – Experimento II.

Tabela 1. Mortalidade total (MT), corrigida (MC) (após 72 horas de inoculação) confirmada (MCF) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* inoculadas com isolados de *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces lilacinus* e *Isaria fumosorosea*, para ambos os experimentos. Botucatu (SP), 2010.

	Experimento I			**Experimento II**		
Isolado	**MT %**	**MC %**	**MCF %**	**MT %**	**MC %**	**MCF %**
Controle	10,00 d	10,00 d	1,00 b	7,50 def	0,00 e	0,00 d
Boveril	30,00 cd	28,25 cd	61,25 a	36,25 bcdef	31,14 cd	61,25 bc
BBOT01	48,00 bcd	35,95 bcd	81,25 a	80,00 ab	78,07 ab	76,25 ab
BBOT04	56,00 abcd	47,27 abcd	80,00 a	7,50 def	0,00 e	81,25 ab
BBOT05	80,00 ab	76,80 ab	66,25 a	66,25 abc	63,81 abc	72,50 ab
BBOT06	42,00 bcd	28,19 cd	75,00 a	66,67 abcd	63,94 abc	85,00 ab
BBOT07	75,00 abc	68,44 abc	75,00 a	50,00 abcde	47,13 abcd	90,00 a
BBOT10	35,00 cd	22,14 cd	85,00 a	77,50 abc	75,95abc	88,75 ab
BBOT11	96,00 a	95,21 a	68,75 a	52,36 abcde	51,39 abc	80,00 ab
BBOT12	71,00 abc	63,75 abcd	80,00 a	100,00 a	100,00 a	73,75 ab
BBOT18	41,00 bcd	27,58 cd	87,50 a	56,25 abcd	52,63 abc	83,75 ab
IBOT25	36,00 cd	29,63 bcd	80,00 a	36,25 bcdf	31,14 cd	90,00 a
BOT31	55,00 abcd	45,93 bcd	58,75 a	45,00 abcde	40,42 abcd	33,75 c
IBOT33	61,00 abc	53,09 abcd	85,00 a	68,75 abcd	66,30 abc	86,25 ab
IBOT35	38,00 bcd	23,94 cd	68,75 a	66,25 abcd	66,38 abc	82,50 ab
IBOT36	50,00 bcd	38,61 bcd	80,00 a	36,25 bcdef	31,21 bcd	81,25 ab
IBOT38	37,00 bcd	26,10 cde	58,75 a	45,00 abcde	38,02 cde	37,75 c
ABOT01	24,00 cd	18,54 cd	100,00 a	60,00 abcd	45,55 cd	100,00 a
p	<0,0001	0,0002	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
CV%	21,55	36,94	16,36	17,06	22,02	13,62
d.m.s	43,76	20,98	33,02	41,23	41,12	28,55

3.2 Valores de TL_{50} de operárias inoculadas com diferentes isolados de fungos

A virulência dos isolados foi analisada através dos tempos letais medianos (TL_{50}) (Tabela 2 e 3). Assim, pela análise dos valores de TL_{50} foi possível observar o comportamento dos patógenos com relação ao tempo necessário para matar 50% da população de formigas.

No Experimento I, os valores de TL_{50} para os isolados variaram entre 1,65 dias (para PBOT33) e 3,48 dias (para ABOT01). Dentre os isolados de *B. bassiana* os que apresentaram menor TL_{50} foram BBOT05: com 2,31 horas, BBOT07 com 2,30 dias e BBOT011 com 1,75 dias. Para isolados de *P. lilacinus* destacaram-se PBOT31 com 2,33dias e PBOT33 com 1,65 dias. O tratamento Controle 1 apresentou TL_{50} de 4,20 dias. Contudo, BBOT011, PBOT31 e PBOT33 foram os isolado que melhor se adequaram ao modelo de Probit, além de PBOT35 e PBOT38. (Tabela 2).

No Experimento II, o tratamento Controle 1 apresentou TL_{50} de 3,91 dias, enquanto para os isolados os valores ficaram entre 1,81 e 3,81 dias. Os isolados com menor TL_{50} foram BBOT01, BBOT05, BBOT10, BBOT11, BBOT12 e PBOT35, apresentando respectivamente, 1,99, 2,34, 2,39 2,28, 2,17 e 2,34 dias para mortalidade de 50% das formigas. Foram mais adequados ao modelo de Probit os isolados BBOT10, BBOT12 e BBOT35 (Tabela 3).

Comparando o comportamento dos isolados entre os dois experimentos, verifica-se que BBOT05, BBOT11 e BBOT33 se destacaram, pois, em ambos, apresentaram o menor TL_{50}. A grande variabilidade genética encontrada nos fungos entomopatogênicos (ALVES, 1998), é apontada por Diehl-Fleig et al. (1988) como um dos principais fatores responsáveis pelas diferenças de virulência entre isolados e espécies.

Nos dois experimentos os valores de TL_{50} dos isolados aproximaram-se dos encontrados por diversos autores para trabalhos com operárias. Alves e Sousa-Gomes (1983) verificaram tempo de 2,79 dias, em testes avaliando a virulência de *B. bassiana* em operárias enquanto encontrou 4,04 dias para mortalidade soldados de *A. sexdens rubropilosa*.

Busarello (2008) também avaliando o efeito de *B. bassiana* em operárias e soldados de *A. sexdens rubropilosa*, verificou valores de 1,74 a 3,66 dias em operárias e 2,68 e 5,51 dias para soldados

Ainda para soldados, Castilho et al. (2010) verificaram menos valores em relação à Alves e Sousa-Gomes (1983) e Busarello (2008), sendo os valores de TL_{50} entre 1,68 e 3,57 dias para soldados de *A. sexdens rubropilosa* e entre 1,39 e 5,5 dias para soldados de *A. bisphaerica*, inoculados com *B. bassiana*. Loureiro e Monteiro (2005) em estudos com isolados de *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *P. farinosus*, sobre soldados de *Atta sexdens sexdens*, na concentração de $1x10^8$ conídios/mL, encontrou valores de TL^{50} de 2,72 a 2,97 para *B. bassiana*, 2,77 a 3,05 para *M. anisopliae* e 2,98 a 3,14 para *P. farinosus*.

Diehl-Fleig et al. (1988) verificou para soldados de *A. sexdens piriventris* TL^{50} de 2,72 dias, após infecção por *B. bassiana* e 3,00 dias após infecção por *M. anisopliae*. Em formigas cortadeiras, a ação dos agentes de controle biológico varia muito em função da casta estudada e o tipo de aplicação (DIEHL-FLEIG et al., 1988; ALVES, 1998),. Conforme Specht et al. (1994) determinada casta pode ser mais suscetível do que outra, ou ainda, determinada espécie de fungo pode ser mais patogênica para soldados do que para operárias. Alves e Sousa-Gomes (1983) e Busarello (2008) verificaram que a suscetibilidade de operárias à fungos como *B. bassiana* é maior, comparada à suscetibilidade dos soldados quando expostos ao mesmo patógeno.

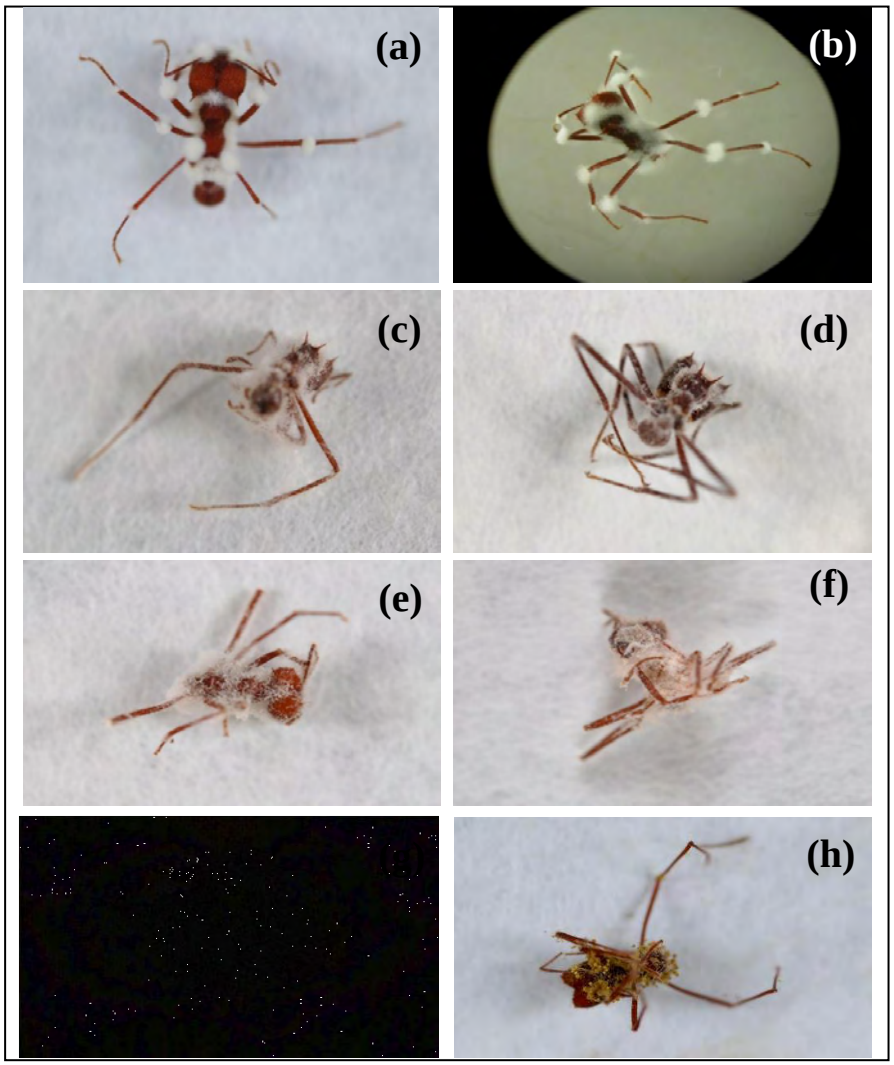

Figura 3. Mortalidade confirmada de operárias inoculadas com: (a-b) *Beauveria bassiana*, (c-d) *Paecilomyces lilacinus*, (e-f) *Isaria fumosorosea* e (g-h) *Aspergillus flavus*

Tabela 2. Comparação dos tempos letais (TL_{50}) em horas, intervalos de confiança (IC) (P <0,005), equação de regressão linear e valores de x^2 obtidos pela análise de Probit para atividade patogênica dos diferentes isolados de *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* e *P. lilacinus* sobre operárias de *Atta sexdens rubropilosa*, experimento I. Botucatu (SP), 2010.

Tratamento	TL_{50}	IC	Equação	x^2	p-valor	EP
			Beauveria bassiana			
Controle 1	4,19	3,2385-5,0507	Y=1,4162+5,7524.logx	68,32	0,0000	1,15
Controle 2	2,86	1,9208-4,2677	Y=1,5262+7,6041.logx	197,09	0,0000	3,57
BBOT01	2,89	2,3037+3,3891	Y=1,4343-7,7453.logx	54,38	0,0000	1,59
BBOT04	2,77	2,6427-2,8938	Y=1,03+8,9715.logx	18,28	0,0108	0,69
BBOT05	2,31	1,7536-2,7535	Y=2,2794+7,4822.logx	46,83	0,0000	1,68
BBOT06	2,99	2,8678-3,118	Y=0,3125+9,8401.logx	454,36	0,0000	0,76
BBOT07	2,30	1,9323-2,6298	Y=2,8863+6,9286.logx	22,37	0,0022	1,08
BBOT10	3,07	1,3443-7,0055	Y=0,6061+9,0228.logx	1.795,79	0,0000	10,63
BBOT11	1,75	1,5162-1,9655	Y=3,5367+6,0429.logx	6,45	04881	0,67
BBOT12	2,67	1,7157-3,4212	Y=1,2577+8,7787.logx	110,14	0,0000	2,75
BBOT18	2,89	2,1105-3,9835	Y=1,0795+8,48.logx	228,43	0,0000	3,63
			Isaria fumosorosea			
IBOT25	2,64	1,9598-3,2217	Y=2,7886+5,2475 logx	54,38	0,0000	1,59
			Paecilomyces lilacinus			
PBOT31	2,33	2,1176+2,5299	Y=3,7999+3,2703 logx	3,06	0,8798	0,20
PBOT33	1,65	1,0641-2,1519	Y=4,3832+2,8395 logx	9,86	0,1966	0,42
PBOT35	3,25	1,8411-4,3625	Y=2,4852+4,9163 logx	10,71	0,1518	1,30
PBOT36	2,89	2,0543-3,5772	Y=1,2942+8,0356 logx	93,49	0,0000	2,15
PBOT38	3,47	3,2612-3,6677	Y=2,4727+4,6797 logx	4,58	0,7106	0,27
			Aspergillus flavus			
ABOT01	3,48	2,77 - 4,11	Y=1,7559+5,982 logx	67,59	0,000	1,04

Probit a 5% de probabilidade; $TL_{50:}$ Tempo letal mediano; IC: Intervalo de Confiança; x^2: Qui-quadrado; EP: Erro padrão.

Tabela 3. Comparação dos tempos letais (TL_{50}) em horas, intervalos de confiança (IC) (P <0,005), equação de regressão linear e valores de x^2 obtidos pela análise de Probit para atividade patogênica dos diferentes isolados de *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* e *P. lilacinus* sobre operárias de *Atta sexdens rubropilosa*, experimento II.

Tratamento	TL_{50}	IC	Equação	x^2	p-valor	EP
			Beauveria bassiana			
Controle 1	3,90	3,7108-4,0996	Y=0,9426+6,8537.logx	34,94	0,0000	0,48
Controle 2	2,86	1,9208-4,2677	Y=1,5262+7,6041.logx	197,09	0,0000	3,57
BBOT01	1,99	1,5458-2,392	Y=3,4292+5,2538.logx	14,01	0,0848	0,80
BBOT04	3,78	0,3259-43,9001	Y=0,27+8,1862.logx	125,77	0,0000	26,01
BBOT05	2,35	2,1818-2,5032	Y=2,6945+6,223.logx	6,58	0,3611	0,49
BBOT06	2,57	1,8364-3,6063	Y=1,2117+9,2281.logx	163,69	0,0000	4,49
BBOT07	2,78	2,6426+2,9201	Y=0,886+9,2528.logx	43,37	0,0000	0,80
BBOT10	2,39	2,2381-2,5333	Y=2,1682-2,1682.logx	0,04	1,0000	0,67
BBOT11	2,28	1,2707-3,1095	Y=3,4062+4,459.logx	37,79	0,0000	1,05
BBOT12	2,17	2,0396-2,2963	Y=1,9224+9,1273.logx	0,45	0,9984	1,00
BBOT18	2,82	2,6953-2,9386	Y=-0,7143+12,6935.logx	141,46	0,0000	1,28
			Isaria fumosorosea			
IBOT25	3,81	2,1064-6,891	Y=2,381+4,5085 logx	290,9466	0,0000	2,41
			Paecilomyces lilacinus			
PBOT31	2,85	2,0299-3,5204	Y=1,9155+6,773.logx	47,1323	0,0000	1,57
PBOT33	2,62	1,4489-3,5485	Y=2,9572+4,891.logx	64,2769	0,0247	1,24
PBOT35	2,34	1,9433-2,7007	Y=2,8697+5,7616.logx	12,4019	0,0536	0,76
PBOT36	2,78	1,6076-3,6835	Y=2,3972+5,851.logx	66,3663	0,0000	1,57
PBOT38	3,11	1,2584-4,5506	Y=2,7722+4,5248 logx	95,1302	0,8513	1,39
			Aspergillus flavus			
ABOT01	2,51	1,94 – 2,99	Y=2,3459+6,6292 logx	10,59	0,316	1,16

Probit a 5% de probabilidade; $TL_{50:}$ Tempo letal mediano; IC: Intervalo de Confiança; x^2: Qui-quadrado; EP: Erro padrão.

3.3 Potencial patogênico dos isolados entre os experimentos I e II

O comportamento dos isolados na mortalidade de operárias em função do tempo (horas) de observação, para os dois experimentos, estão representados nas figuras 3 e 4. Para parte dos isolados, o experimento II apresentou maior percentual de mortalidade em algumas horas de observação, sendo isso verificado para BBOT01, BBOT04, BBOT06, BBOT10, BBOT12 e BBOT18 de *B. bassiana*, PBOT35 de *P. lilacinus* e ABOT01 de *A. flavus*. Para estes fungos o re-isolamento favoreceu o potencial patogênico sobre operárias de *A. sexdens rubropilosa*.

O isolado BBOT12 apresentou diferença no tempo 48 h (p=0,0005); BBOT10 no tempo 48 (p=0,0007) e 72 h (p=0,03); BBOT01, apenas diferiu no 72h (p=0,003); para BBOT04 a diferença se deu às 72h (p=0,0025)e 96h (p=0,04), assim como para BBOT06, 72h (p=0,01) e 96h (p=0,0027); para BBOT18 ocorreu às 96h (p=0,0025) e finalmente para ABOT01 a diferença entre os experimentos ocorreu também às 72 e 96 h.

Por outro lado, alguns isolados de *B. bassiana* provocaram mortalidade de operárias superior no experimento I. Foram eles: BBOT07 e BBOT11 (Figura 4F e 4H, respectivamente). Além disso, os isolados IBOT25 de *I. fumosorosea* e PBOT31, PBOT33 e PBOT38 de *P. lilacinus* também apresentaram tal comportamento (Figura 5D, 5E e 5H).

Para o isolado BBOT07 foi revelado diferença na mortalidade no tempo 72h (p=0,025), BBOT11, às 72h (p=0,0002), IBOT25 ocorreu às 72h (p=20,28) e 96h (p<0,0001). Para o isolado PBOT31, apenas às 48h (p=0,009), PBOT33, também apenas às 48h (p=0,0006) e finalmente PBOT38 apresentou maior o percentual de mortalidade às 48h (p=0,0057). O comportamento do isolado PBOT36 de *P. lilacinus* foi semelhante quanto à mortalidade em ambos os ensaios.

De acordo com os resultados apresentados, parte dos isolados utilizados apresentou maior mortalidade de operárias após re-isolamento, em relação aos isolados originais. Resultado semelhante foi verificado por Silva e Diel-Fleig (1988) comparando o efeito de linhagens originais e selecionadas de para isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae* sobre soldados de *Atta sexdens piriventris*.

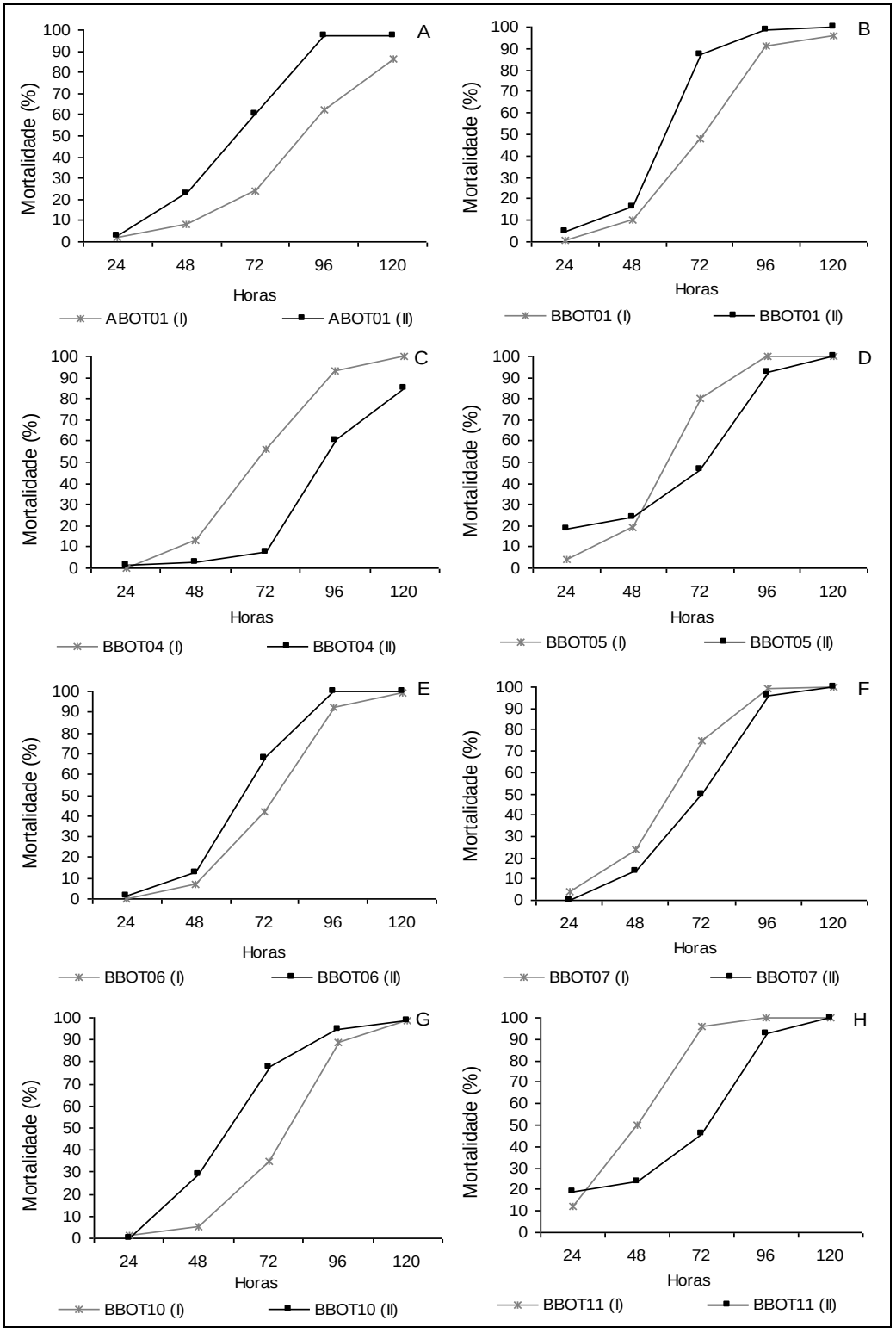

Figura 4. Mortalidade acumulada (%) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* depois de inoculadas com isolados de (A) *Aspergillus flavus* e (B – H) *Beauveria bassiana*, para o experimento I e II.

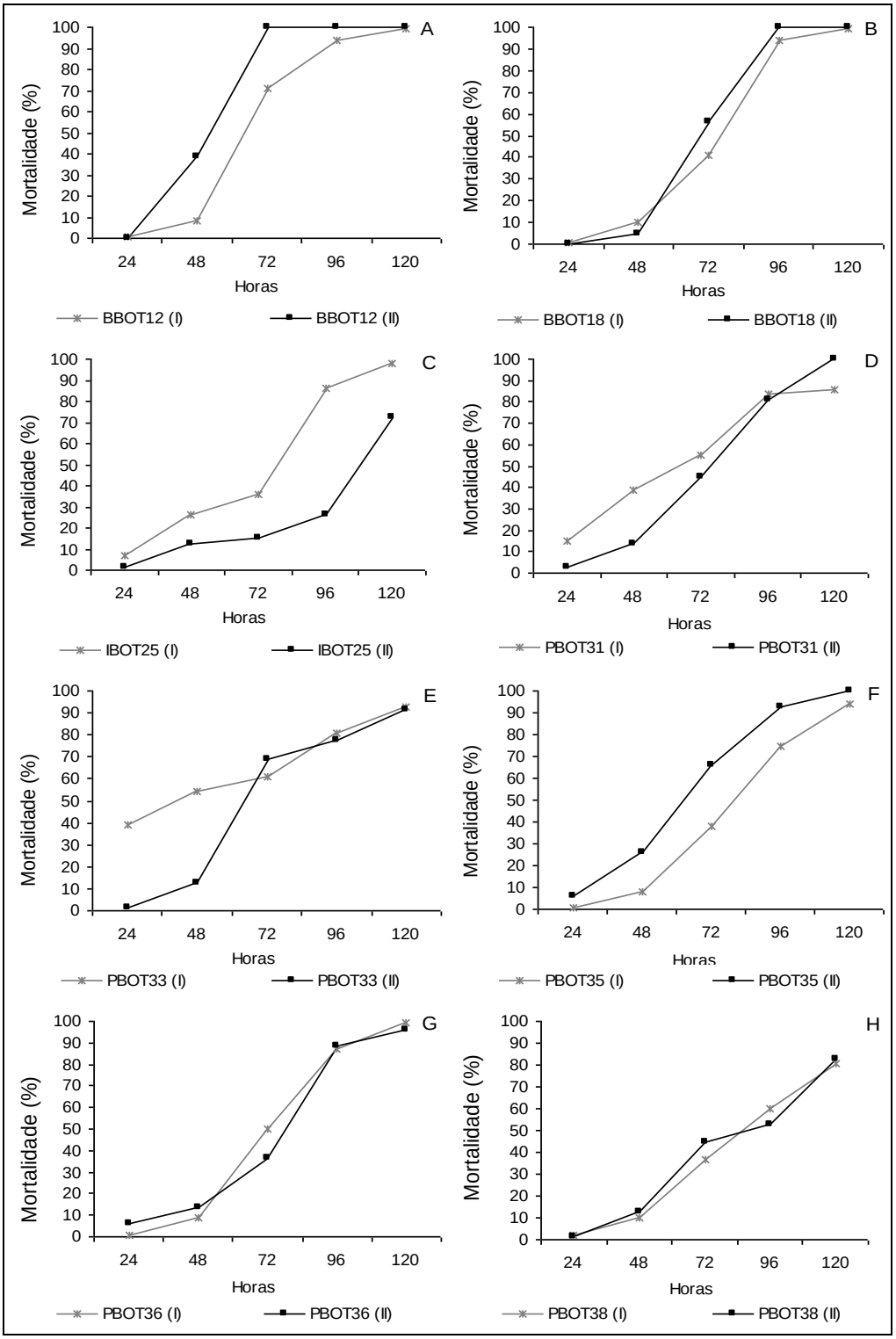

Figura 5. Mortalidade acumulada (%) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* depois de inoculadas com: (A-B) *Beauveria bassiana*; (C) *Isaria fumosorosea*; e (D-H) *Paecilomyces lilacinus*, para o experimento I e II

4. CONCLUSÕES

- Isolados de *B. bassiana*, *I. fumosorosea*, *P. lilacinus* e *A. flavus* foram patogênicos à operárias de *A. sexdens rubropilosa* na concentração $1x10^8$ conídios/mL;

- Os fungos *B. bassiana* e *P. lilacinus* mostraram diferentes capacidades de infecção à operárias de *A. sexdens rubropilosa*, sendo os isolados BBOT11 e BBOT12 de *B. bassiana* e IBOT33 de *P. lilacinus* considerados os mais virulentos.

- Todos os fungos apresentaram capacidade de esporulação sobre cadáveres de formigas, contudo para alguns o potencial foi mais elevado.

Capítulo 5

EFEITO DE ISCAS GRANULADAS FORMULADAS COM FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS EM COLÔNIAS DE *Atta sexdens rubropilosa* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

Resumo

Diversos fungos de ocorrência natural no solo são considerados patogênicos para formigas cortadeiras. Assim, o estudo teve como objetivo testar o carregamento e efeito de iscas formuladas com esporos de *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces lilacinus* e *Isaria fumosorosea* em colônias de *Atta sexdens rubropilosa*. Para isso foram confeccionadas iscas artesanais, tendo como substrato a polpa cítrica e como principio ativo isolado desses fungos na concentração $1x10^8$ conídios/mL para o experimento I e em concentrações mais elevadas no experimento II. As iscas foram testadas em colônias com 1 ano de idade e jardim de fungo com volume aproximado de 500 mL. Além dos tratamentos com fungos foram montados três tratamentos controle: (1) iscas com sulfluramida, (2) iscas sem princípio ativo e (3) discos de folhas de *Acalypha* spp. Assim, foram realizados sete tratamentos e quatro repetições. Como resultado foi verificado que iscas de fungos foram carregadas e normalmente incorporadas ao fungo simbionte em ambos os experimentos, embora para o experimento II tenha verificado confirmação da mortalidade (esporulação em cadáveres de operárias) por fungo em alguns tratamentos, a mortalidade, em ambos os experimentos, não diferiu dos tratamentos somente com isca atóxica e folhas, porém diferiu significativamente do tratamento com sulfluramida, a partir das 72 horas da aplicação ($p=0,035$), sendo que este último levou à morte de 100% das formigas. Comparando os dois experimentos, verificou-se que a regressão linear foi a que melhor se adaptou para a maioria dos tratamentos, sendo F3 (*P. lilacinus*) o que melhor demonstrou correlação da mortalidade de operárias com o aumento na dosagem de conídios. Provavelmente o aumento na concentração, e o uso de outros métodos de inoculação, podem favorecer o potencial patogênico dos fungos em colônias de *A. sexdens rubropilosa*.

Palavras chave: Formiga cortadeira, isca, mortalidade, comportamento de defesa.

Chapter 5

EFFECT OF GRANULATED BAITS FORMULATED WITH ENTOMOPATHOGENIC FUNGI IN *Atta sexdens rubropilosa* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) COLONIES

ABSTRACT

Several naturally occurring fungi in the soil are considered pathogenic for ants. Had the objective to test the loading and the effect bait formulated with spores of *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces lilacinus* and *Isaria fumosorosea,* in colonies de *Atta sexdens rubropilosa*. Baits were prepared for this craft as substrate as citrus pulp and fungi isolated active principle in concentration of $1x10^8$ conidia/mL for the first experiment and higher concentrations in the second experiment. The baits were tested in laboratory colonies so at 1 year of age and the fungus garden with approximate volume of 500 ml. In addition to treatments with fungi were mounted three control treatments: (1) sulfluramid baits, (2) baits without any active ingredients and (3) leaf discs. Thus, we conducted seven treatments and four replications. As a result it was found that fungi were loaded baits and usually incorporated into the symbiotic fungus in both experiments. While for the second experiment confirmation of the mortality has occurred (sporulation in cadavers of workers) by fungus in some treatments, the mortality, in both experiments, the treatments did not differ only with atoxic bait and leaves, but differ significantly from treatment with sulfluramid, from 72 hours of treatment ($p = 0.035$), and the latter led to the death of 100% of workers. Comparing the two experiments, it was found that linear regression was the better adapted to the most treatments, and F3 (*P. lilacinus*), which showed better correlation between the mortality of workers with the increase in dosage of conidia. Probably the increase in the concentration, and the use of other methods of inoculation, may favor the pathogenic potential of fungi in colonies of *A. sexdens rubropilosa*.

Keywords: Leaf-cutting ant, bait, mortality, defense behavior.

1 INTRODUÇÃO

As formigas cortadeiras, gêneros *Atta* (saúvas) e *Acromyrmex* (quenquéns) pertencem à tribo Attini, cultivam fungos, e são insetos dominantes em muitos ecossistemas terrestres (WILSON, 1987). Apresentam ampla distribuição geográfica e forrageiam plantas nativas e exóticas que utilizam como substrato para o cultivo de seu fungo simbionte (WEBER, 1972; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990), sendo consideradas pragas de grande importância para agricultura, pecuária e silvicultura (MARICONI, 1970; FOWLER et al., 1979; BOARETTO; FORTI, 1997).

As empresas de reflorestamentos e agricultores em geral têm empregado o controle químico, sistematicamente através de iscas tóxicas, termonebulização, pó seco e fumigantes, sendo o primeiro considerado o método mais prático, além de efetivo (BOARETO; FORTI, 1997).

A isca granulada atualmente comercializada contém inseticida sintético de ação retardada (mortalidade corrigida de operárias ≤15 % com 24 horas e ≥ 90 % com 21 dias), principalmente sulfluramida, e é altamente eficiente no controle de formigas cortadeiras quando ocorre bom carregamento e dispersão no interior da colônia (FORTI et al. 2003, 2007; NAGAMOTO et al. 2004). Contudo, pode envolver alto custo operacional e tem

demonstrado inconveniências devido à falta de especificidade, contaminação do meio ambiente e toxicidade para o aplicador (JACCOUD, 2000).

Como resposta, a pesquisa científica tem buscado desenvolvimento de alternativas para o controle de formigas cortadeiras, entre elas o controle microbiano por fungos entomopatogênicos. Embora a literatura já tenha revelado e comprovado a patogenicidade de certos fungos às formigas cortadeiras (MACHADO et al. 1988; DIEHL-FLEIG; SILVA, 1992; JACCOUD et al., 1999; LOPEZ; ORDUZ, 2003; HUGHES; BOOMSMA, 2004; HUGHES, et al., 2004; CASTILHO et al., 2010), ainda continua persistindo a produção e comercialização de iscas contendo produtos químicos sintéticos relativamente persistentes como princípio ativo. A legislação ambiental pressiona as empresas na busca de alternativas de produtos com menor impacto ao ambiente (GROSMAN et al., 2002).

Os fungos são considerados importantes agentes de controle de insetos, principalmente devido a sua grande variabilidade genética, e a capacidade de colonizar e/ou infectar o hospedeiro em seus diferentes estágios; consiste nos primeiros micro-organismos estudados no combate a insetos, comportando-se como agentes etiológicos de mais de 80% de doenças (ALVES, 1998).

Contudo, as formigas possuem várias características biológicas e comportamentais que dificultam a ação de agentes de controle microbiano. São insetos eficientes no reconhecimento de material danoso, inclusive micro-organismos entomopatogênicos, realizando a limpeza do ninho através da remoção de material contaminante, inclusive formigas doentes ou mortas (KERMARREC et al., 1986), remoção de fragmentos de esponja fúngica com crescimento de fungos indesejados (“weeding”) (CURRIE; STUART, 2001), limpeza do corpo, secreção de antibióticos, e dispersão das formigas, entre outros comportamentos (OI, 1993). Dessa forma mantêm o fungo simbiôntico sem substancial crescimento de micro-organismos prejudiciais, apesar da contínua exposição a estes organismos, por meio do material vegetal que levam para o jardim de fungo (CURRIE et al., 1999; RODRIGUES et al., 2005).

Em condições de campo, Machado et al. (1988) verificaram que após o terceiro e o décimo dia de inoculação de esporos de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, em colônias de *Acromyrmex*, ocorreu abandono de olheiros e abertura de outros, redução de atividade

externa, remoção de material seco e de formigas para fora da colônia. Para os autores, a possível detecção de agentes prejudiciais está relacionada à capacidade olfativa bastante desenvolvida que permite o reconhecimento, pelas formigas, de substancias liberadas na colônia.

Dentro desse contexto, é importante a busca de métodos alternativos de controle através de novos estudos. Considerando a praticidade e a ampla aceitação da formulação isca, somado ao fato de representar eficiente meio de dispersão de determinado produto dentro de ninhos adultos, o presente estudo teve como objetivo, avaliar o carregamento e o efeito de iscas formuladas à base de fungos entomopatogênicos em colônias de *Atta sexdens rubropilosa*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Insetos Sociais – Praga (LISP) no setor de Defesa Fitossanitária do Departamento de Produção Vegetal, da Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, localizado no município de Botucatu – SP.

O estudo consistiu em dois experimentos (I e II), testando o efeito de iscas com fungos entomopatogênicos, alterando-se a dosagens de conídios de um experimento para o outro.

Para os experimento foram utilizadas colônias de *Atta sexdens rubropilosa* com 1 ano de idade, contendo cerca de 500 ml de esponja fúngica na implantação do experimento.

2.1 Formulação de iscas com fungos

As iscas foram confeccionadas artesanalmente no próprio Laboratório de Insetos Sociais Praga, FCA/UNESP, Botucatu-SP, tendo como substrato atrativo a polpa cítrica e óleo de soja e como ingredientes ativos (IAs) a serem testados os isolados BBOT11 e BBOT12 (*Beauveria . bassiana*) e IBTOT25 (*Isaria. fumosorosea*) PBOT33 (*Paecilomyces. lilacinus*), os quais foram anteriormente isolados de rainhas de *Atta* spp.

A formulação de iscas granuladas foi similar à utilizada por Andrade (2002), com algumas alterações. O processo de formulação consistiu na mistura de polpa cítrica desidratada e moída, 5% do agente aglomerante CMC (carboximetilcelulose) a 5%; de

suspensão de fungos ($1x10^8$ conídios/mL) selecionados em experimentos anteriores (Capítulo 4) (1,0 mL de suspensão/grama do peso final pretendido da isca), óleo de soja refinado a 5% p/p (quantidade média presente nas iscas tóxicas comerciais) e água destilada, até adquirir consistência pastosa (cerca de 1,5 mL/grama do peso final da isca; esta quantia não precisa ser exata pois toda a água adicionada durante a formulação, evapora na posterior fase de desidratação). A polpa cítrica, óleo vegetal, CMC e a água foram esterilizados em autoclave.

A suspensão dos conídios utilizada nos experimentos foi preparada raspando-se micélio de colônias de fungos, adicionando água destilada em tubo de ensaio e agitando em agitador orbital vortex para separação dos conídios. A suspensão foi filtrada em dupla camada de gaze esterilizada e colocada em Becker de 100 mL. A contagem do número de conídios foi realizada em microscópio óptico, utilizando-se câmara de Neubauer. A partir daí padronizou-se as suspensões para a concentração de $1x10^8$ conídios/mL.

Os filetes de iscas foram produzidos através de passagem em seringa descartável de 10,0 mL, sem agulha, com a ponta cortada de forma à abertura ser alargada para 2,0 mm (Ø). Os filetes, acondicionados em placas de petri estéreis grandes (150 x 20 mm), foram desidratados em BOD a 5 ^oC por 48 horas; considerando-se desprezível o peso dos conídios, a concentração final foi de $1x10^8$ conídios/grama de isca. Em seguida estes filetes foram acondicionados em saco plástico estéril e quebrados manualmente em pellets com comprimento aproximado de 0,5 mm, semelhante à das iscas comerciais (LIMA et al., 2003). Finalmente, conservou-se em BOD a 5 ^oC para uso posterior.

Para confirmação da viabilidade dos conídios utilizados nas iscas, alguns pellets de cada isca foram colocados em BDA e preservadas em BOD à 26 ^oC. Após 48 horas foi verificado início da esporulação e às 96 horas as iscas estavam completamente cobertas por micélio de cada fungo corresponde, confirmando o potencial de esporulação dos conídios misturados aos demais componentes da isca.

2.2 Experimento I

Para realização do primeiro experimento, além dos tratamentos com iscas, formulou-se também artesanalmente e em condições estéreis, isca sem tóxico (controle sem ingrediente ativo - IA) e com 0,3% p/p de sulfluramida (fornecido pela Dinagro Agropecuária Ltda), como

tratamento controle com IA. Na isca com sulfluramida IA foi inicialmente misturado com óleo e CMC e solubilizado em um pouco de acetona p.a., com posterior adição da polpa cítrica, homogeneizando-se constantemente com um bastão de vidro conforme a acetona evaporava.

Adicionalmente, para se controlar um possível efeito dos componentes dessas iscas, usou-se discos de folhas novas e frescas de *Acalypha* spp, cortadas com o auxílio de um vazador de 8,0 mm (Ø); com esse diâmetro, um disco possuía um peso similar ao de um pellet das iscas do presente estudo.

Em cada colônia foi aplicado 1 g de isca ou discos de folhas (correspondendo, aproximadamente a 90 unidades). A escolha dessa dose, embora o dobro do padrão deu-se em função de potencializar o efeito das iscas nas colônias. A aplicação foi feita na arena de forrageamento, a qual estava conectada à câmara de fungo e esta à câmara de lixo.

Foi utilizado nos testes delineamento inteiramente casualizado, consistindo de sete tratamentos (Tabela 1) e quatro repetições (28 colônias). As colônias ficaram por 24 horas sem folhas antes da aplicação das iscas e somente 48 horas após a aplicação foi retomado o fornecimento de folhas.

Tabela 1. Tratamentos utilizados no experimento com iscas granuladas. Botucatu (SP), 2010.

Tratamento	Iscas Utilizadas
C1	Controle 1 (isca à base de sulfluramida)
C2	Controle 2 (isca sem princípio ativo)
C3	Controle 3 (discos de folhas de *Acalypha*)
F1	(isca com isolado BBOT11 de *B. bassiana*)
F2	(isca com isolado BBOT12 de *B. bassiana*)
F3	(isca com isolado PBOT33 de *Paecilomyces lilacinus*)
F4	(isca com isolado IBOT25 de *Isaria fumosorosea)*

2.3 Experimento II

Este experimento consistiu de seis tratamentos e quatro repetições (24 colônias) e procedeu-se à aplicação dos mesmos tipos de produtos nas mesmas colônias, diferindo apenas na dosagem dos fungos que foram maiores visando se alcançar um efeito inseticida em soma com a condição de reaplicação. O tratamento C1 (isca com sulfluramida) não foi repetido, em decorrência da mortalidade das colônias.

O processo de formulação das iscas foi similar à do experimento anterior, com diferença apenas na dosagem da suspensão de conídios (maior), na quantidade (maior) de suspensão adicionada por grama de isca, e, por consequência uma menor quantidade de água destilada adicionada. As concentrações finais foram de $6{,}0x10^8$, $8{,}6x10^8$, $5{,}0x10^8$ e $5{,}0x10^8$ (conídios/grama de isca), respectivamente para isolado BBOT11 e BBOT12 de *B. bassiana* (F1 e F2), PBOT33 de *P. lilacinus* e IBOT25 de *I. fumosorosea*.

2.4 Carregamento de iscas

Após aplicação das iscas o carregamento foi avaliado registrando-se primeiramente o tempo de carregamento das iscas em cada colônia até 6 horas. Também foi calculado o percentual de pellets carregados após 6 horas de aplicação e após 24 horas da aplicação.

2.5 Incorporação, devolução e rejeição de iscas

Após a aplicação e carregamento das iscas, foi verificado se as mesmas foram incorporadas, devolvidas ou rejeitadas. Comportamento devolução foi considerado pela deposição dos pellets novamente na câmara de forrageamento, enquanto que o comportamento de rejeição das iscas foi avaliado pela deposição dos pellets para câmara de lixo.

Além do carregamento, incorporação e/ou rejeição, foram registrados demais eventos e sintomas observados nas colônias após aplicação.

2.6 Número de operárias mortas em função do tempo de aplicação

No experimento I, as formigas mortas na câmara de forrageamento e câmara de lixo foram contabilizadas a cada 24 horas a partir da aplicação, até 144 horas. No experimento II, avaliou-se a mortalidade diariamente até 168 horas após aplicação e posterior a esse período, a mortalidade foi acompanhada, semanalmente, até o tempo de 672 horas após a aplicação, correspondendo a 28 dias de avaliação.

2.7 Análises estatísticas.

O tempo de carregamento foi avaliado através de análise descritiva (média, desvio padrão), além do máximo e mínimo tempo de carregamento observado por tratamento. O percentual de pellets carregados e os dados de mortalidade foram avaliados por ANOVA e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Foram realizadas Análises de regressão para ambos os experimentos, avaliando-se o efeito das iscas sobre a mortalidade de formigas em função do tempo de aplicação.

3. RESULTADOS

3.1 Carregamento de iscas

Para o experimento I, inicialmente, todos os tratamentos oferecidos às colônias foram aceitos, pois o início do carregamento ocorreu imediatamente. Embora todos tratamentos tenham mostrado atratividade às operárias, as menores médias de carregamento foram observadas para os tratamentos com fungo F2 (BBOT11 de *B. bassiana*), com 0,52±0,37h e F3 (PBOT33 de *P. lilacinus*), com 0,75±0,26h. O tratamento F1(BBOT12 de *B. bassiana*) apresentou tempo médio de carregamento de 1,19±1,00h e para F4 (IBOT25 de *I. fumosorosea*) foi de 2,19±1,06h (Figura 1).

O menor tempo de carregamento geral para tratamentos com fungo foi de 0,17h e ocorreu em F2 e o maior tempo transcorrido para carregamento de todos os pellets foi de 3,72h, que se deu no tratamento F4.

Para os tratamentos controle, C1-isca com sulfluramida, C2-isca sem I.A. e C3-discos de folhas, com o tempo de 6 horas após aplicação, ainda havia pellets em algumas colônias de cada tratamento. Contudo, o menor tempo de carregamento para tais tratamentos foram 0,50h, 0,40h e 0,57h, respectivamente para C1, C2 e C3. Após 24 horas, com exceção dos tratamentos C1 (sulfluramida), os demais apresentaram carregamento total.

Em relação ao experimento II, novamente F2 e F3 foram os tratamentos que apresentaram menor tempo de carregamento total de pellets, 0,56±0,30h e 0,91±0,53h, respectivamente. Para F1 e F4, o tempo médio foi de 1,89±1,33h e 2,19±0,25h, respectivamente (Figura 1).

C2 e C3 novamente não apresentaram carregamento total dos pellets no tempo determinado de 6 horas após a aplicação. Porém o fizeram dentro do tempo de 24 horas após inicio do experimento. O menor de tempo de carregamento foi de 0,67h e 0,68 h para C2 e C3, respectivamente.

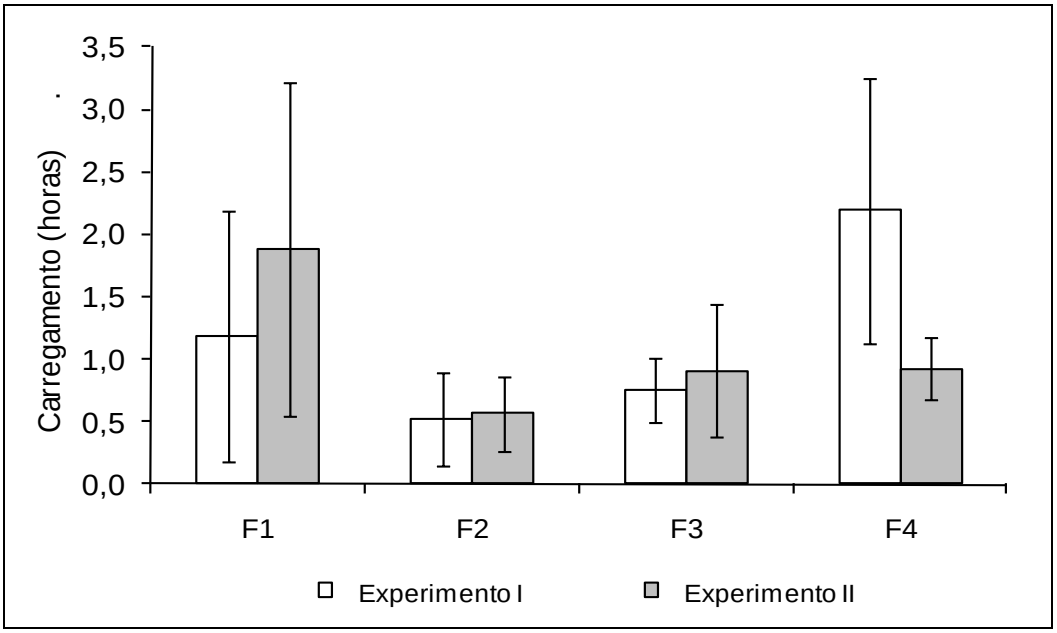

Figura 1. Tempo de carregamento (horas) de iscas pelas operárias de após aplicação de iscas com diferentes tipos de fungos: isolado BBOT11 (F1) e BBOT12 (F2) de *B. bassiana*; PBOT33 de *Paecilomyces lilacinus* (F3) e IBOT25 de *Isaria fumosorosea* (F4), para o experimento I e II.

Em relação ao percentual de carregamento dos pellets, para o primeiro experimento, obteve-se que às 6 horas após a aplicação apenas os tratamentos com fungos apresentaram carregamento de 100% dos pellets. C1, C2, C3 carregaram, respectivamente, 84,61%, 84,61%, e 91,55%. Não houve diferença estatística entre os tratamentos (p=0,6996, C.V%: 18,52, d.m.s: 39,93). No período de 24 horas após a aplicação os percentuais subiram para 89,01% no tratamento C2 e 100% para C3. (Figura 1a). No tratamento controle C1-sulfluramida, 50% das colônias apresentaram carregamento total com média de 58 min. Contudo duas colônias não apresentaram carregamento total das iscas. Colônias tratadas com sulfluramida além de não carregarem todos os pellets ainda apresentaram comportamento de devolução e rejeição.

Para o segundo experimento realizado, os tratamentos C2, C3, F1, F2, F3 e F4 carregaram, respectivamente, até 6 horas após a aplicação, 49,66%, 87,36%, 90,66%, 78,04%, 95,05% e 91,21%. Foi verificado que com o aumento na dosagem de conídios, em todos os tratamentos com fungo ocorreu redução no percentual médio de pellet carregado, exatamente pelo fato de ao menos uma colônia não ter carregado o total dos pellets oferecidos durante o período estabelecido de 6 horas (p=0,1387; CV%: 23,51).

No tempo de 24 horas de aplicação das iscas, o percentual de carregamento subiu para 79,12%, 100%, 96,43%, 95,05%, 100% e 95%, respectivamente para os tratamentos C2, C3, F1, F2, F3 e F4 (p=0,2234; CV%:13,21) (Figura 1b). Após esse período, foi verificado o carregamento dos pellets restantes na câmara de forrageamento, em todos os tratamentos.

O resultado da ANOVA mostrou que não ocorreu diferença entre os tratamentos nos dois experimentos, em ambos os períodos de tempo avaliados, 6 e 24 horas.

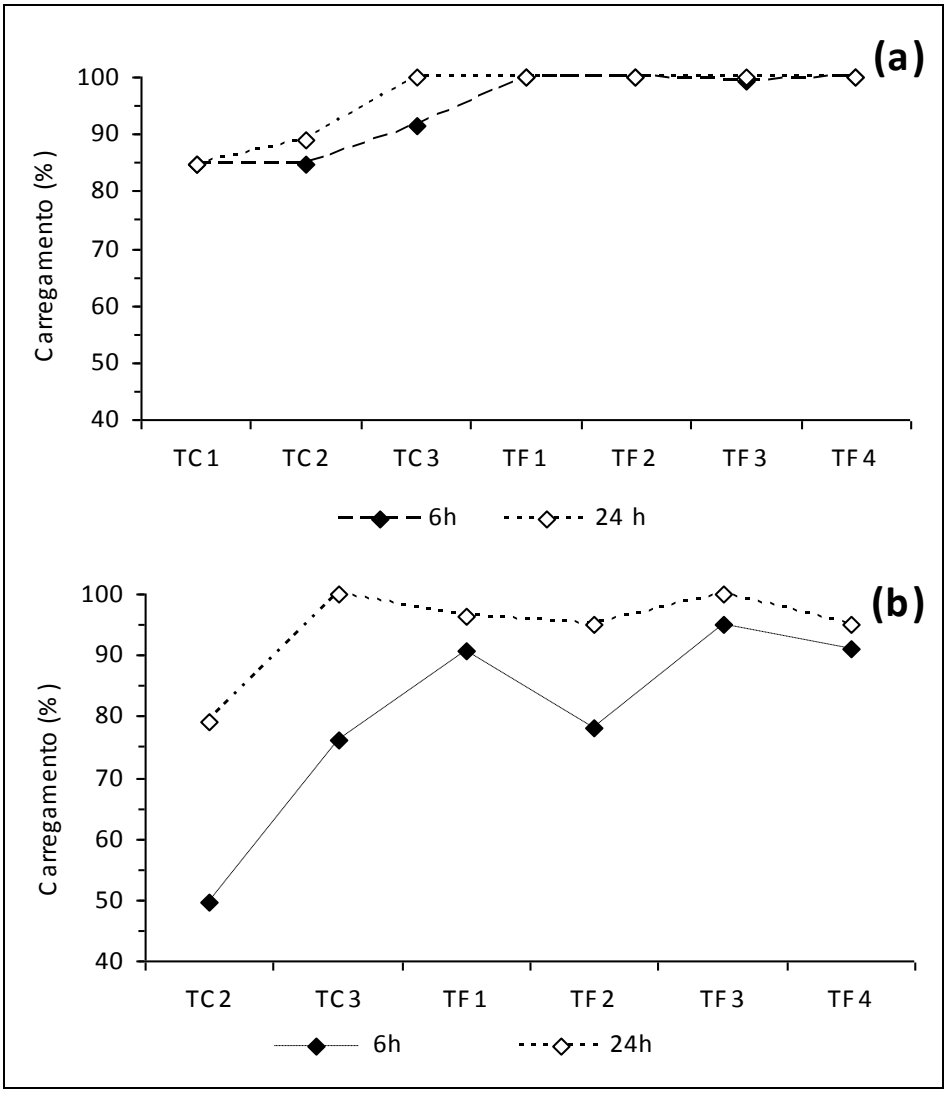

Figura 2. Frequência (%) de iscas carregadas por operárias de *Atta sexdens rubropilosa* por tratamento, após 6 e 24 horas da aplicação, (a) experimento I e (b) experimento II.

3.2 Incorporação, devolução e rejeição de iscas

Em ambos os experimentos, iscas com fungos apresentaram excelente aceitação pelas operárias, que, comportaram-se normalmente em fazer a limpeza, trato da isca e posterior incorporação ao jardim de fungo (Figura 4b-c). Somente para o tratamento F2 (BBOT12 de *B. bassiana*), no experimento II, foi observado comportamento de devolução e rejeição. Assim, em apenas uma colônia (25%) devolveu 14 pellets entre as 24 horas de observação, sendo que

estes foram carregados novamente até às 48 horas da aplicação. Também foi verificado que uma pequena quantidade de pellets foi depositada na câmara de lixo.

Em relação aos tratamentos controle, apenas houve devolução de iscas para câmara de forrageamento e rejeição transporte para câmara de lixo em C1 (Sulfluramida). O comportamento de devolução e rejeição foi observado em 75% das colônias tratadas, sendo a média, respectivamente de 27,75 pellets devolvidos para câmara de forrageamento e 37,36% (34 pellets) para câmara de lixo.

Em ambos os experimentos, em colônias tratadas com fungos, não foi verificado nenhuma alteração evidente na atividade de carregamento. Contudo, o volume de lixo nas devidas câmaras, foi muito maior do que o lixo produzido pelos tratamentos testemunhas, principalmente no caso do segundo experimento, após a segunda semana de avaliação.

Além dos comportamentos acima citado, para colônias tratadas com sulfluramida (C1) foi verificado também: (1) ausência de corte e carregamento de folhas oferecidas 48 horas após aplicação das iscas; (2) saída da rainha para câmara de forrageamento (Figura4d); (3) desenvolvimento de microfungos filamentos em 100% das esponjas fúngicas de todas as colônias, dentre eles *Escovopsis* e representantes do gênero *Fusarium*, dentre outros não identificados (Figura 4e-f).

3.3 Número de operárias mortas em função do tempo de aplicação

O resultado das aplicações de iscas contendo diferentes ingredientes ativos (I.A.) no experimento I, mostrou que a partir das 48 horas o tratamento com sulfluramida (C1) apresentou 24 formigas mortas, diferindo dos demais ($p=0,033$).

Às 72 horas após a aplicação o efeito na mortalidade de operárias apenas diferiu entre o tratamento C1, apresentando 69 formigas mortas e F1 (Isolado BBOT11) com zero de mortalidade.

A partir das 96 horas após a aplicação até as 144 horas, maior mortalidade continuou ocorrendo nas colônias que receberam iscas contendo sulfluramida, diferindo em relação aos demais tratamentos. No período de 120 horas, não havia nenhuma formiga viva na colônia, inclusive a rainha.

Nas colônias tratadas com iscas à base de sulfluramida, foi verificado grande número de formigas mortas na câmara de lixo e também de forrageamento. Ressalta-se que, nestas colônias, e somente nestas, operárias morreram na câmara de fungo e lá ficaram, mas estas não foram contadas, pois não seria possível assim fazer sem desestruturar totalmente a esponja fúngica, o que poderia interferir no tratamento.

Nas colônias tratadas com iscas contendo esporos de fungos, ocorreu mortalidade de formigas, sendo esta confirmada pela extrusão do patógenos em cadáveres presentes na câmara de lixo.

Para o experimento II, a mortalidade de operárias provocada por isolado PBOT33 (*P. lilacinus*) foi maior do que os demais em todos os períodos de avaliação, porém, apenas diferiu no tempo 336 h e 672h. No primeiro caso, diferiu de C3 e F1 (p=0,0281) e no tempo 672h diferiu apenas de C3 (0,0214).

O segundo tratamento com maior número de operárias mortas foi F2 (BBOT12 de *B. bassiana*). Para esse tratamento, foi verificado que os poucos pellets presentes câmara de lixo apresentaram esporulação. Tal acontecimento pode ter contribuído para contaminação e mortalidade das operárias.

A confirmação da mortalidade por fungos inoculados via isca foi comprovada no experimento II, pois em quase todas as câmaras de lixo das colônias tratadas foram encontradas formigas mortas apresentando ocorrência de fungos sobre o tegumento (Figura 34g). Tal situação não foi observada nas colônias tratada apenas com folhas, iscas sem princípio ativo e iscas com sulfluramida, no caso do experimento I.

A capacidade de esporulação dos fungos sobre o corpo do inseto é de grande importância, pois é a prova de que o mesmo tem potencial penetrar e colonizar o inseto (DIEHL-FLEIG et al.,1988) e em insetos sociais também é importante pois pode indicar potencial de causar infecção secundária, contaminando outras formigas dentro da colônia (DIEHL-FLEIG et al.,1988; LOPEZ et al. 1999).

Por meio da análise de regressão em relação à mortalidade de operárias no experimento I e II (Figura 4), foi verificado que ouve interação entre o tempo de aplicação e a mortalidade de operárias, para maioria dos tratamentos com fungo, sendo o modelo de regressão linear o que melhor se adaptou.

Em ambos os experimentos os tratamentos que melhor demonstraram aumento na mortalidade com o tempo de aplicação foram: F3 (*P. lilacinus*) e F4 (*I. fumosorosea*), principalmente no caso do experimento II (F3, r^2=0,9975 e F4, r^2=0,9860) (Figura 4E e 4F, respectivamente), revelando que o aumento na mortalidade pode ter relação direta com o aumento na dosagem de conídios.

Tabela 2. Número de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* mortas após oferecimento de iscas com conídios *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces lilacinus* e *Isaria fumosorosea* na concentração $1x10^8$ conídios/mL, à 25º C – experimento I.

	Tempo de Avaliação (horas)					
	24	**48**	**72**	**96**	**120**	**144**
C1	11,50 a	48,50 a	144,00 a	212,00 a	270,50 a	270,50 a
C2	0,50 a	0,00 b	1,00 b	1,00 b	1,00 b	1,00 b
3	0,50 a	0,50 b	0,50 b	1,5 b	1,50 b	6,50 b
F1	0,00 a	0,00 b	0,00 b	0,00 b	0,50 b	3,00 b
F2	3,00 a	4,00 a	5,50 ab	10,50 b	6,50 b	14,00 b
F3	3,00 a	1,00 ab	1,50 ab	2,50 b	1,50 b	5,00 b
F4	0,00 a	1,00 ab	1,00 b	1,00 b	0,50 b	3,00 b
p	0,061	0,033	0,035	0,029	0,035	0,033

* Médias seguida de mesma letra na vertical não difere entre os tratamentos pelo teste Tukey a 5% de probabilidade

.

Tabela 3. Número de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* mortas após oferecimento de iscas com conídios de *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces lilacinus* e *Isaria fumosorosea*, à 25º C - experimento II.

	Dias da Avaliação (horas)									
Tratamentos	**24**	**48**	**72**	**96**	**120**	**144**	**168**	**336**	**504**	**672**
C2	5,25 a	5,25 a	6,50 a	8,25 a	12,50 a	14,50 a	16,00 a	18,00 ab	58,50 a	71,00 ab
C3	2,50 a	3,25 a	4,75 a	6,75 a	8,75 a	9,75 a	10,00 a	15,00 b	21,75 a	24,50 b
F1 ($6,0x10^8$)	1,50 a	4,50 a	3,25 a	5,75 a	7,25 a	9,25 a	10,00 a	14,50 b	38,50 a	45,50 ab
F2 ($8,6x10^8$)	4,47 a	6,75 a	8,25 a	13,25 a	13,50 a	26,50 a	26,75 a	38,50 ab	90,00 a	125,25 ab
F3 ($5,0\ x10^8$)	13,00 a	21,00 a	30,50 a	36,00 a	46,25 a	55,00 a	62,50 a	97,00 a	117,00 a	133,25 a
F4 ($5,0x10^8$)	4,00 a	5,75 a	9,50 a	14,00 a	16,25 a	19,00 a	22,25 a	23,50 ab	10,25 a	103,25 ab
p	0,3297	0,2982	0,1777	0,1691	0,2111	0,1774	0,1321	0,0281	0,0570	0,0214
C.V%	62,50	51,62	55,59	52,61	57,77	52,40	49,25	41,43	35,82	31,61
d.m.s	17,88	26,66	40,01	47,19	63,92	71,48	76,75	84,05	103,16	120,02

Médias seguida de mesma letra na vertical não difere entre os tratamentos pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

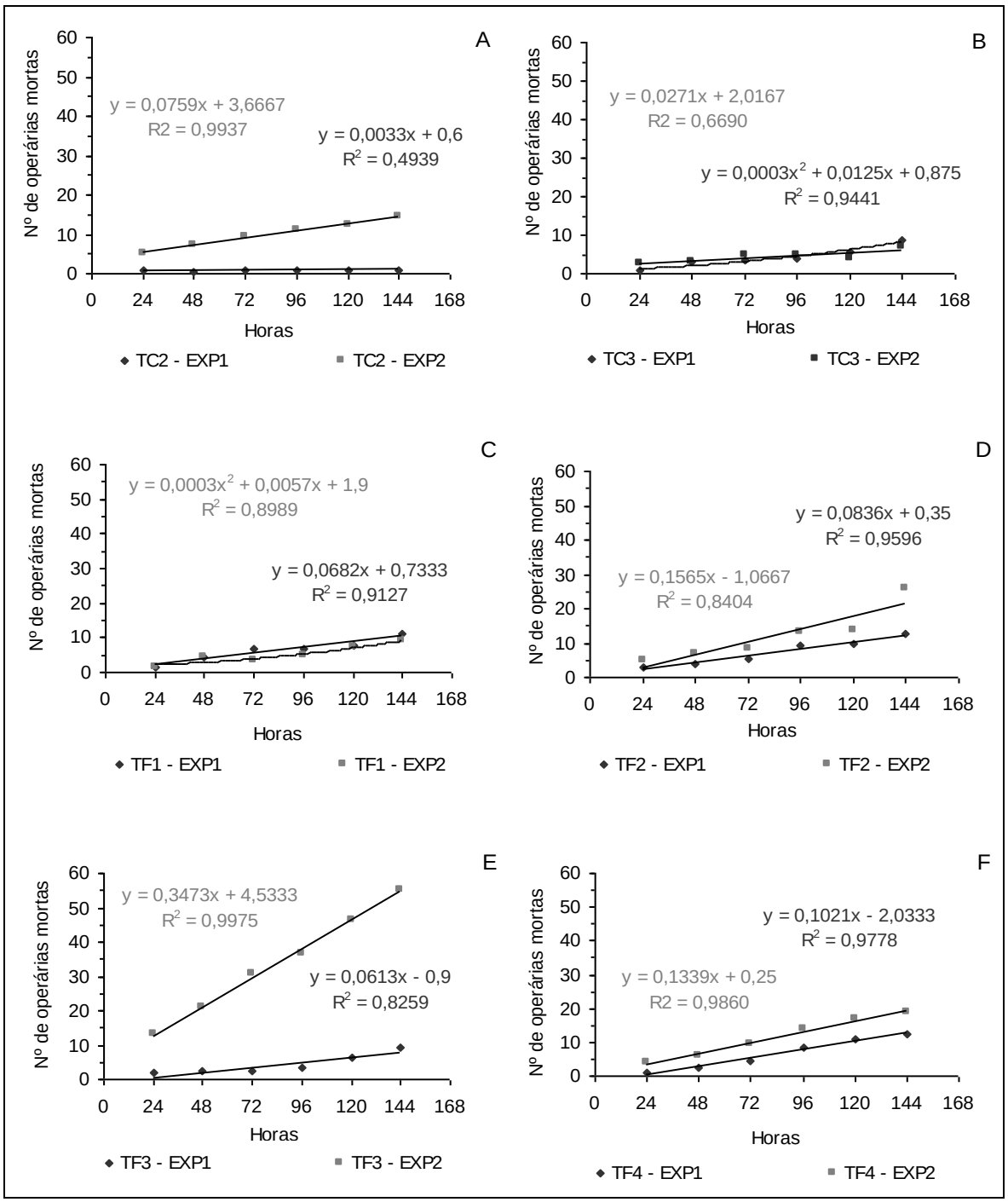

Figura 3. Mortalidade de operárias em colônia de *Atta sexdens rubropilosa* tratada com diferentes iscas (experimento I e II): (A) iscas puras, (B) discos de folhas, (C) iscas com isolado BBOT11 de *Beauveria bassiana*, (D) iscas com isolado BBOT12 de *Beauveria bassiana*, (E) iscas com isolado IBTO25 de *Isaria fumosorosea* (F) iscas com isolado IBTO33 de *Paecilomyces lilacinus.*

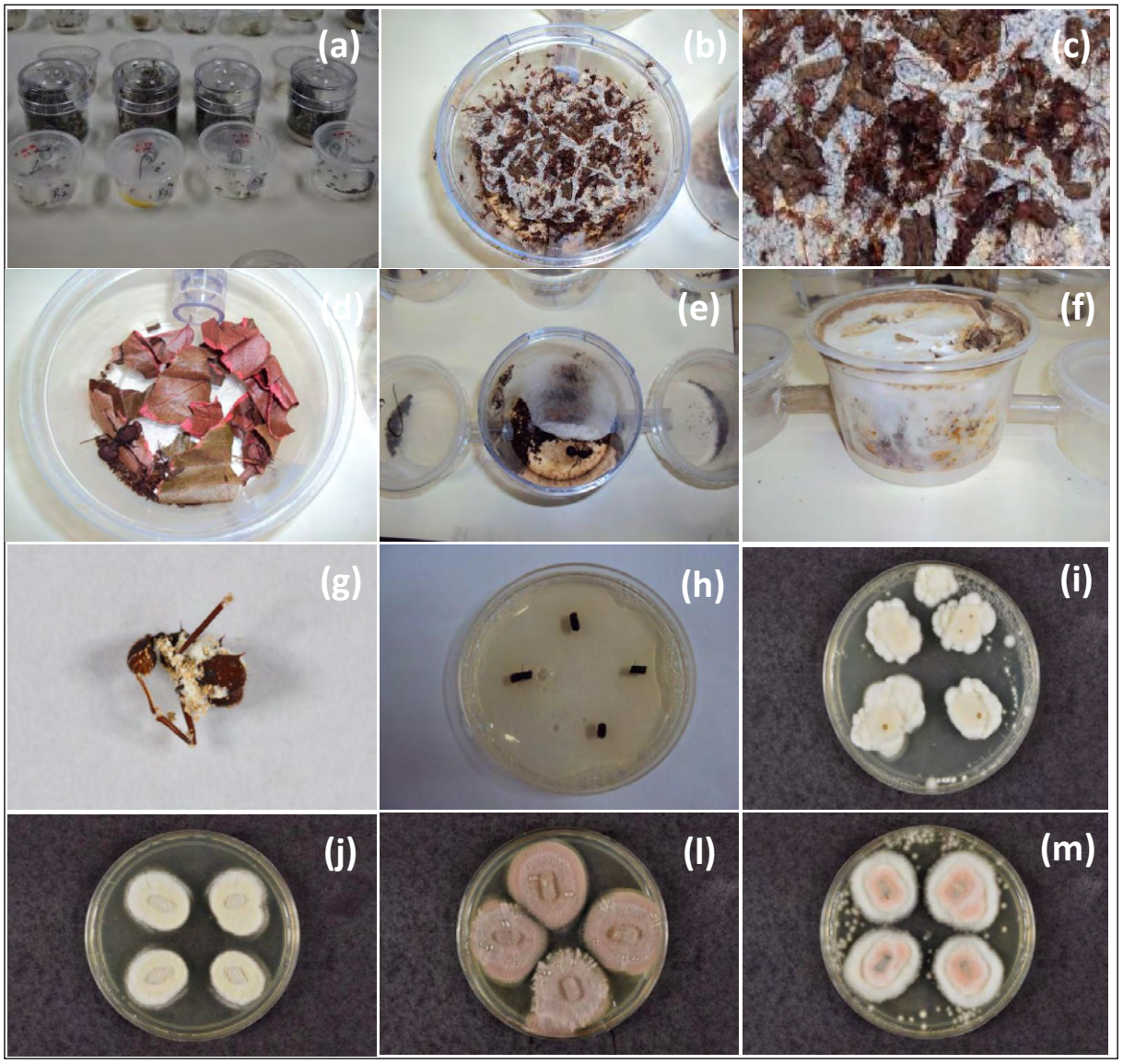

Figura 4. (a) Colônias de *A. sexdens rubropilosa* utilizadas no experimento; (b e c) incorporação de iscas com fungos entomopatogênicos por operárias de *A. sexdens rubropilosa*, (d) rainha na câmara de forrageamento após aplicação de isca com sulfluramida, (e) e (f) fungos filamentosos sobre colônia após aplicação de iscas com sulfluramida, (g) operária morta com extrusão do patógeno *B. bassiana*, (h) isca sem fungo em BDA; (i, j, l e m) crescimento micelial em BDA, de fungos formulados em iscas granuladas: isolado BBOT11 e BBOT12 de *B. bassiana*, PBOT33 de *P. lilacinus* e IBOT25 de *I. fumosorosea*, respectivamente.

4. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados no experimento I e II revelaram que iscas formuladas com fungos entomopatogênicos apresentam excelente atratividade às operárias de *Atta sexdens rubropilosa*, ou seja, a presença dos conídios parece em nada ou muito pouco alterar a atratividade das iscas formuladas com polpa cítrica e óleo vegetal. Contudo, vale ressaltar que em ambos os experimentos, iscas formuladas com esporos do isolado BBOT12 de *B. bassiana* e PBOT33 de *P. lilacinus*, apresentaram menor tempo de carregamento total dos pellets.

O tempo de carregamento é importante, pois em condições de campo, maior rapidez no carregamento de iscas implica em menor exposição das mesmas às condições climáticas adversas, roedores, aves, insetos benéficos e outros animais presentes na área, podendo aumentar a eficiência de controle e evitar possíveis intoxicações de animais silvestres (LIMA et al., 2003.

Lopez e Oduz (2003) também verificaram aceitação e carregamento de iscas formuladas com *M. anisopliae*, *Trichoderma viride* e com a combinação dos dois fungos, por operárias de *A. cephalotes*, em colônias de laboratório.

Specht et al. (1994), testando isca formulada com esporos de *B. bassiana* verificaram carregamento para *Acromyrmex crassispinus* e *Acromyrmex striatus*, porém não verificando tal comportamento para *Acromyrmex. heyeri*.

O fato de tais tratamentos, de modo geral, não apresentarem comportamento de rejeição pode sugerir duas situações: (a) as operárias não perceberam a presença dos conídios misturados aos outros componentes da isca; (2) o mecanismo de limpeza das iscas foi muito eficiente, o que é reforçado, pois nenhuma alteração considerável foi verificada nas colônias tratadas com fungo, cujos pellets foram incorporados à cultura do jardim de fungo. Além disso, a presença de iscas com esporos de fungos na câmara de lixo (no caso do tratamento F2), assim como de formigas mortas parasitadas por fungo reforça a idéia de que os mecanismos de defesa foram acionados.

De acordo com Kermarrec et al. (1986) o reconhecimento pela colônias de material danoso, inclusive micro-organismos entomopatogênicos, é seguido de reações comportamentais eficientes na defesa da colônia, dentre elas: remoção de material contaminante e de formigas doentes ou mortas. Conforme Machado et al. (1988) o

reconhecimento da presença de fungos entomopatogênicos pode está relacionado com a produção e liberação de toxinas pelos mesmos.

Machado et al. (1988) após aplicação de *M. anisopliae* e *B. bassiana* em ninhos de *Acromyrmex* em colônias de campo, observaram abandono dos olheiros e abertura de outros, redução da atividade de forrageamento, remoção de material seco e de formigas para fora da colônia. Silva e Diehl-Fleig (1988) observaram redução total da atividade externa em colônias de campo de *A. sexdens piriventris*, 60 dias após inoculação de suspensão de *B. bassiana* e para colônias tratadas com suspensão de *M. anisopliae*, foi observado forte paralisia das formigas, fechamento dos olheiros inoculados e abertura de outros e além da paralisação da total da atividade externa.

Jaccoud et al. (1999), em condições de laboratório, registraram aumento da mortalidade de formigas, declínio na atividade de forrageamento e na saúde do jardim de fungo morte da colônia, causados por *M. anisopliae* à sub-colônias de *Atta sexdens rubropilosa*. Contudo, para os estudos citados, a inoculação não se deu por isca granulada.

Entretanto, Lopez e Orduz (2003) testaram o efeito de iscas com esporos de *M. anisopliae*, *T. viride* e iscas com a combinação dos dois fungos, em colônias de laboratório e de campo de *A. cephalotes.* Através do experimento verificaram alteração na atividade de forrageamento e paralisação de algumas formigas; após duas semanas, observaram maior atividade de formigas na câmara de lixo, com presença de ovos e larvas, além de maior quantidade de resíduos, comparado ao tratamento controle.

No presente estudo a presença de ovos e larvas na câmara de lixo foram verificadas para alguns tratamentos, assim como volume de lixo muito maior do que os tratamentos controle.

Durante as seis primeiras horas após a aplicação das iscas, observando a atividade das operárias, verificou-se que as mesmas apresentaram comportamento de “lamber os pellets”. O ato de lamber está associado à assepsia devido à presença de enzimas encontradas na saliva de formigas que inibe o crescimento de micro-organismos que podem ser competidores ao fungo simbionte (BOT et al., 2001; POULSEN et al., 2002). De acordo com Pagnocca (1997) para evitar contaminação do fungo simbionte, as formigas lambem a superfície do substrato retendo os micro-organismos na cavidade infrabucal de onde são regurgitados e depositados no lixo. A cavidade infrabucal, portanto, atua como um filtro para impedir a entrada de partículas sólidas,

incluindo os esporos de fungos coletados durante a limpeza das folhas, do ninho e do próprio corpo das operárias (QUINLAN; CHERRETT, 1978b).

Além disso, o comportamento de limpeza (“grooming”) pode prevenir infecção, pois remove partículas da superfície do corpo (esporos de parasitas, hifas de fungos ou ovos e juvenis de nematóides); entretanto, esse mesmo mecanismo pode também permitir a contaminação da colônia a partir do contato entre membros contaminados (OI; PEREIRA, 1993).

As formigas ainda apresentam como mecanismos de defesa a presença de glândulas metapleurais que produzem substâncias com efeito antibiótico, contra infecção microbiana em geral (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; POULSEN et al., 2002; POULSEN et al., 2003; FERNANDEZ-MARÍN et al., 2006). Hernandez-Marín et al. (2006) verificou aumento na taxa de limpeza pela glândula metapleural de formigas, após inoculadas com conídio de *P. lilacinus*. Contudo, de acordo com Dielh e Junqueira (2001) tal glândula não possui atividade fungicida contra *B. bassiana*.

Para o presente estudo, embora as iscas utilizadas tenham sido manuseadas pelas operárias, o contato com os conídios parece não ter sido suficiente para provocar desequilibro perceptível na colônia, pois as atividades de corte e incorporação de folhas ocorreram normalmente. Contudo, foi visível a diferença em número de formigas mortas no segundo experimento, com aumento na dosagem dos fungos, para os tratamentos com *P. lilacinus* e isolado BBOT12 de *B. bassiana*. Além disso, a diferença de mortalidade observada com duas semanas da aplicação das iscas sugere um efeito secundário dos fungos sobre a colônia, que pode ter como potencial de inóculo cadáveres de formigas mortas.

A maioria dos fungos entomopatogênicos é especializada na penetração via tegumento, embora também em certos casos possam atuar por via oral (ALVES, 1998). Contudo, a escolha do método de inoculação através de iscas granuladas, se deve ao fato de ser considerada, possivelmente, a única forma de inoculação de fungos entomopatogênicos e demais princípios ativos em colônias adultas de campo, de forma a atingir a maioria ou totalidade das câmaras. Nas condições do presente estudo, embora não tenha ocorrido mortalidade da colônia, o fato de formigas mortas encontradas na câmara de lixo terem apresentado extrusão do patógeno inoculado via isca granulada, reforça a patogenicidade de

fungos entomopatogênicos para operárias de *A. sexdens rubropilosa* e abre caminho para novos estudos.

5 CONCLUSÕES

- Iscas à base de fungos entomopatogênicos (*Beauveria bassiana*, *Paecilomyces lilacinus* e *Isaria fumosorosea*), na concentração de $1x10^8$ conídios/mL foram atrativas, rapidamente carregadas e incorporadas como substrato ao fungo por operárias de *A. sexdens rubropilosa*;

- Dosagem mais elevada de conídios de fungos em iscas experimentais não comprometeu a atratividade e carregamento e favoreceu o aumento no número de operárias mortas encontradas na câmara de lixo, em colônias de *A. sexdens rubropilosa*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

ALVES, S. B.; SOSA GOMEZ, D. R. Virulência do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. para duas castas de *Atta sexdens rubropilosa* (Forel., 1908). **Poliagro**, Bandeirantes, v. 5, p. 1-9, 1983.

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Fealq, 1998. 1163 p.

AMANTE, E. **Influência de alguns fatores microclimáticos sobre a formiga saúva *Atta laevigata* (F. Smith, 1958), *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908, *Atta bisphaerica* Forel, 1908 e *Atta capiguara* Gonçalves, 1944 (Hymenoptera, Formicidade), em formigueiros localizados no estado de São Paulo**. 1972. 175 p. Tese. (Doutorado em Agronomia)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1972.

ARAÚJO, M. S. et al. Impacto da queima controlada da cana-de-açucar na nidificação e estabelecimento de colônias de *Atta bisphaerica* Forel (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 32, n. 4, p. 685-691, 2003.

ARAÚJO, M. S.; DELLA LUCIA, T. M. C. Comunicação científica caracterização de ninhos de *Acromyrmex laticeps nigrosetosus* Forel, em povoamento de eucalipto em Paraopeba**. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil,** Londrina, v. 26, n. 1, p. 205-207, 1997.

AUTUORI, M. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp. – Hymenoptera – Formicidae) II: o sauveiro inicial (*Atta sexdens rubropilosa*, Forel, 1908). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 13, n. 7, p. 67-86, 1942.

AUTUORI, M. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp. – Hymenoptera – Formicidae) V: número de formas aladas e redução dos sauveiros iniciais. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 19, n. 7, p. 325-331, 1950.

AUTUORI, M. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp.) (Hymenoptera-Formicidae) I: evolução do sauveiro (*Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 12, p. 197-228, 1941.

* Segundo ABNT-NBR 6023:2002

BENTO, J. M. S. et al. Influência da composição química e da população microbiana de diferentes horizontes do solo no estabelecimento de sauveiros iniciais de *Atta laevigata* (Hymenopetera: Formicidae) em laboratório. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 20, n. 2, p. 307-316, 1991.

BOARETTO, M. A. C.; FORTI, L. C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. **Série Técnica**, Piracicaba, v. 11, n. 30, p. 31-46, 1997.

BOLLAZZI, M.; KRONENBITTER, J.; ROCES, F. Soil temperature, digging behaviour, and adaptative value of nest depth in South American species of *Acromyrmex* leaf-cutting ants. **Oecologia**, Berlim, v. 158, p. 165-175, 2008.

BOLLAZZI, M.; ROCES, F. Thermal preference for fungus culturing and brood location by workers of the thatching grass-cutting ant *Acromyrmex heyeri*. **insectes sociaux**, Paris, v. 49, p. 153-157, 2002.

BOT, A. N. M.; CURRIE, C. R.; HART, A. G.; BOOMSMA, J. J. Waste management in leaf-cutting ants. **Ethology, Ecology & Evolution**, Florence, v. 13, n. 3, p. 225-237, 2001.

BRANDÃO, C. R. F.; MAYHÉ-NUNES, A. J. A new fungus-growing ant genus, *Mycetagroicus* gen. n., with the description of three new species and comments on the monophyly of the Attini (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, Chico, v. 38, n. 3B, p. 639-665, 2002.

BROWN, M. J. F.; BONHOEFFER, S. On the evolution of claustral colony founding in ants. **Evolutionary Ecology Research**, Tucson, p. 305-313, 2003.

BUHL, J., et al. Self-organized digging activity in ant colonies. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, Berlim, v. 58, p. 9-17, 2005.

BUSARELLO, G. D. **Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuil e *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin para o controle de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (1908) (Hymenoptera: Formicidae) em condições de laboratório**. 2008. 69 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade)-Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2008.

CADIOLI, M. C. et al. Crescimento micelial e parasitismo de *Paecilomyces lilacinus* sobre ovos de *Meloidogyne paranaensis* em diferentes temperaturas *in vitro*. **Ciência Agrotecnica**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 305-311, 2007.

CALDATO, N. **Biologia de *Acromyrmex balzani* Emery (Hymenoptera, Formicidae)**. 2010. 93 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas)-Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

CAMARGO, R. S. et al. Digging effort in leaf-cutting ant queens (*Atta sexdens rubropilosa*) and its effects on survival and colony growth during the claustral phase. **Insectes Sociaux**, Paris, p. 1-16, 2010.

CARLOS, A. A. **Influência da polpa cítrica, óleos e de fungos filamentosos na atratividade de iscas tóxicas à *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera, Formicidae)**. 2008, 82p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas)- Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

CARRION, G.; QUIROZ, L.; VALENZUELA, J.; Hongos entomopatogênicos de las hormigas arrieras *Atta mexicana* em México. **Revista Mexicana de Micologia**, México, v. 12, p. 41-48, 1996.

CASTILHO, A. M. C. et al. A. Algumas notas sobre o compartimento e outras características da iça e do bitu por ocasião do voo nupcial. **Naturalia**, São Paulo, v. 13, p. 11-13, 1988.

CASTILHO, A. M. C. et al. 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**, Santa Maria, v. 40, n. 6, p. 1243-1249, 2010.

CHERRETT, J.M. History of the leaf-cutting ant problems. In: LOFGREN, C.S. & VANDERMEER, R.K. (eds.). **Fire ants and leaf cutting ants: biology and management**. Boulder, Westview Press. p. 10-17, 1986.

CUNHA, W.H.A. Algumas notas sobre o comportamento e outras características da içá e do bitu por ocasião do vôo nupcial. **Naturalia**, São Paulo, v.13, p. 11-13, 1988.

CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 97, n. 7, p. 7998-8002, 1999.

CURRIE, C. R.; STUART, A. E. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. **Proceedings of the Royal Society B**, London, v. 268, p. 1033-1039, 2001.

DELLA LÚCIA, T. C.; ARAÚJO, T.M.C. Fundação e estabelecimento de formigueiros. In: DELLA LUCIA, T. C. (Ed.). **As formigas cortadeiras**. Viçosa: Sociedade de investigações Florestais, 1993. 262 p.

DELLA LÚCIA, T. C.; BENTO, J. M. S. Voo nupcial ou revoada. In: DELLA LUCIA, T. C. (Ed.). **As formigas cortadeiras**. Viçosa, Editora Folha de Viçosa, 1993, p.55-59.
DELLA LUCIA; FOWLER, 1993

DELLA LUCIA, T. M. C.; FOWLER, H. G. As formigas cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. **As formigas cortadeiras.** Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 1993. p. 1-3.

DELLA LUCIA, T. M. C.; FOWLER, H. G.; MOREIRA, D. D. O. Espécies de formigas cortadeiras no Brasil. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.) **As formigas cortadeiras.** Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 1993a, p. 26-31.

DELLA LUCIA, T. M. C.; MOREIRA, D. D. O.; OLIVEIRA, M. A. Inimigos naturais e organismos associados aos ninhos. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.) **As formigas cortadeiras.** Viçosa: Editora folha de Viçosa, 1993b, p. 131-150.

DIEHL-FLEIG, E.; et al. Efficiency of *Beauveria bassiana* for *Acromyrmex* spp. control (Hymenoptera: Formicidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 22, n. 2, p. 281-285, 1993.

DIEHL, E.; JUNQUEIRA, L. K. Seasonal variations of metapleural secretion in the leaf-cutting ant *Atta sexdens piriventris* Santschi (Myrmicinae: Attini), and lack of fungicide effect on *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 4, p. 517-522, 2001.

DIEHL-FLEIG, E.; ROCHA, E. S. Escolha de Solo por Fêmeas de *Acromyrmex striatus* (Roger) (Hymenoptera: Formicidae) para Construção do Ninho. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil,** Londrina, v. 27, n. 1, p. 41-45, 1998.

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.

DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M. E.; PACHECO, M. R. M. Testes de patogenicidade dos fungos entomopatogêncios *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em *Atta sexdens piriventris* (Santschi, 1919) em diferentes temperaturas. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 40, n. 11, p. 1103-1105, 1988.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T-H. **Compendium of soil fungi.** London: Academic, 1980. 859 p.

EIDMANN, H. Beitrage zur kenntnis der Biologie, insbesondere des Nesbaues der blattschnriderameise *Atta sexdens* L. Z. **Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere**, Berlin, v. 25, p. 154-183, 1932.

EVANS, B. H.; SAMSON, R. A. *Cordyceps* species and their anamorphs pathogenic on ants (Formicidae) in tropical forest ecosystems I. the *cephalotes* (Mirmicinae) complex. **Transactions of the British Mycologycal Society**. Cambridge, v. 79, n. 3, p. 431-453, 1982.

FARGUES, J. et al. Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. **Mycologia**, Bronx, v. 89, p. 383-392, 1997.

FERNANDEZ-MARIN, H. et al. Active use of the metapleural glands by ants in controlling. **Proceedings of the Royal Society B**, London, v. 273, p. 1689-1695, 2006.

FERNANDEZ-MARIN, H.; ZIMMERMAN, J. K.; WCISLO, W. T. Ecological traits and evolutionary sequence of nest establisment in fungus-growing ants (Hymenoptera, Formicidade, Attini). **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 82, p. 39-48, 2004.

FORTI, L. C. **Ecologia da saúva *Atta capiguara* Gonçalves, 1944 (Hymenoptera: Formicidae) em pastagem**. 1985. 85 f. Tese (Doutorado em Entomologia)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1985.

FORTI, L. C. et al. Eficiencia de sulfluramida, fipronil y clorpirifos como sebos en el control de *Atta capiguara* Gonçalves (Hymenoptera:Formicidae). **Pasturas Tropicales**, Cali, v. 25, n. 3, p. 28-35, 2003.

FORTI, L. C. et al. Dispersal of the delayed action insecticide sulfluramid in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, Chico, v. 50, p. 1149-1163, 2007.

FOWLER, H. G. et al. Foraging by *Atta sexdens* (Formicidae: Attini): seasonal patterns, caste and efficiency. **Ecological Entomology**, Oxford, v. 4, p. 239-247, 1979.

FOWLER, H. G. et al. Major ant problems of South America. In: VANDEER MEER, R. K.; JAFFE, K.; CEDENO, A. (ed.) **Applied Myrmecology: A world perspective.** Boulder, San Francisco & Oxford: Westview Press, 1990. p. 3-14.

GONÇALVES, C. R. Distribuição, biologia e ecologia das saúvas. **Divulgação Agronômica**, Rio de Janeiro, n. 1, p. 2-10, 1960.

GROSMAN, D. M. et al. Attractiveness and efficacy of fipronil and sulfluramid baits for control of the Texas leaf cutting ant (*Atta texana* (Buckley) (Hymenoptera; Formicidae). **Southwestern Entomologist**, Dallas, v. 27, n. 3-4, p. 251-256, 2002.

HALLEY, J. D.; BURD, M.; WELLS, P. Excavation and architecture of argentine ant nests. **Insectes Sociaux**, Paris, v. 52, p. 350-356, 2005.

HERNADEZ, J. V.; JAFFÉ, K. Dano econômico causado por população de formigas Atta laevigata (F. Smith) em plantações de *Pinus carabaea* Mor. Elementos para o manejo de praga. **Anais da sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 287-298, 1995.

HERTEL, F.; COLLI, G. R. The use of leaf-cutter ants *Atta laevigata* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae) as a substrate of ovoposition by the bung beetle *Canthon virens* Mannerheim (Coleoptera: Scarabaeidae) in Central Brazil. **The Coleopteristis Bulletim**, Natchez, v. 52, n. 2, p. 105-108, 1998.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants.** Harvard: Harvard University Press, 1990. 732 p.

HUGHES, W. O. H. et al. Density-dependence and within-hosp competition in a semelparous parasite of leaf-cutting ants. **BMC Evolutionary Biology**, New York, v. 4, n. 45, p. 1-12, 2004a.

HUGHES, W. O. H. et al. Diversity of entomopathogenic fingi near leaf-cutting ant nest in a neotropical forest, with particular reference to *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 85, p. 46-53, 2004b.

HUGHES, W. O. H.; BOOMSMA, J. Let your enemy do the work: within-host interactions between two fungal parasites of leaf-cutting ants. **Proceedings of the Royal Society B**, London, v. 271, p. 104-106, 2004.

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

JACCOUD, D. B.; HUGHES, W. O. H.; JACKSON, C. W. The epizootiology of a *Metarhizium* infection in mini-nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* **Entomologia Experimentalis et Applicata,** Dordrecht, v. 93, p. 51 - 61, 1999.

JACOBY, M. Observações e experiências sobre *Atta sexdens rubropilosa* Forel visando facilitar seu combate. **Boletim do Ministério da Agricultura**, Cidade, v. 32, n. 5, p. 1-54, 1943.

JACOBY, M. A arquitetura do ninho: In: _____. (Ed.). **A saúva**: uma inteligência nociva. Rio de Janeiro: Serviço de Informação Agrícola, 1950. p. 21-31.

KLEINEIDAM, C. ; ROCES, F. Carbon dioxide concentrations and nest ventilation in nests of the leaf-cutting ant *Atta vollenweideri*. **Insectes Sociaux**, Paris,v.47, p.241-248, 2000.

JONKMAN, J. C. M. The external and internal structure and growth of nests of the leaf-cutting ant *Atta vollenweideri* Forel, 1893 (Hymenoptera: Formicidae): part I. **Journal of Applied Entomology**, Hamburg, v. 89, n. 1-5, p. 217-246, Jan./Dec. 1980.

KERMARREC, A.; FEBVAY, G.; DECHARME, M. Protection of leaf-cutting ants biohazards is there a future for microbiological control? In: _____. (Eds.). **Fire ants and leaf-cutting ants biology and management**. Boulder: Westview Press, 1986. p. 339-356.

LIMA, C. A. et al. Desenvolvimento de iscas granuladas com atraentes alternativos para *Atta bisphaerica* Forel (Hymenoptera: Formicidae) e sua aceitação pelas operárias. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 32, n. 3, p. 497-501, 2003.

LITLLE, A. E. F. et al. Defending against parasites: fungus-growing ants combine specialized behaviours and microbial symbionts to protect their fungus gardens. **Biology Letters**, London, v. 2, p. 12-16, 2006.

LIU, H. et al. Caracterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 82, p. 139-147, 2003.

LOECK, A. E.; GUSMÃO, L. G. Controle de *Acromyrmex heyeri* Forel, 1899 e *Acromyrmex ambiguus* Emery, 1887 (Hymenoptera:Formicidae) com fluramim na localidade de pelotas, RS. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 4, n. 1, p. 59-63, 1998.

LOPEZ, et al. S. Primer registro de *Metarhizium anisopliae* infectado reinos de Atta cephalotes (Hymenoptera: Formicidae) em Colombia. **Revista Colombiana de Entomologia**, Bogotá, v. 25, n. 1-2, p. 49-56, 1999.

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

LOUREIRO, E. S.; MONTEIRO, A. C. Patogenicidade de três fungos entomopatogênico a soldados de *Atta sexdens* (Linnaeus, 1758) (HYMENOPTERA: FORMICIDAE). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 29, n. 4, p. 553-561, 2005.

LOUREIRO, E. S.; MONTEIRO, A. C. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Paecilomyces farinosos*, patogênicos para operárias de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758) (HYMENOPTERA: FORMICIDAE**)**. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 1, p. 35-40, 2004. Disponível em: <http://www.biológico.sp.gov.br/docs/arq/v 71-1/Loureiro.pdf>. Acesso em: 23 set. 2009.

LUANGSA-ARD, J.J. et al. On the relationships of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, p. 581-589, 2005.

MACHADO, V. et al. Reações observadas em colônias de algumas espécies de *Acromyrmex* (Hymenoptera-Formicidae) quando inoculadas com fungos entomopatogênicos. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 40, n. 11, p. 1106-1108, 1988.

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

MARINHO. C. G. S.; DELLA LÚCIA, T. M. C.; PICANÇO, M. C. Fatores que dificultam o controle de formigas cortadeiras. **Bahia Agrícola**, Salvador, v. 7, n. 2, p. 18-21, 2006.

MARTIN, M.M.; WEBER, N.A. The cellulose utilizando capability of fungus cultured by the Attini ant Atta colombica tonsipes. **Annals of Entomological society of America,** v.62, n.6, p.1386-1387, 1969.

MINTZER, A. Primary polygyny in the ant *Atta texana*: number and weight of females and colony foundation success in the laboratory. **Insectes Sociaux,** Paris, v. 34, n. 2, p. 108-117, 1987.

MONTEIRO, A. C. **Aspectos fisiológicos de isolados de fungos entomopatogênicos obtidos na região amazônica (Manaus).** 1988. 233 p. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais)-Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1988.

MOREIRA, A. A. **Arquitetura das colônias de *Atta laevigata* (F. Smith, 1858) (Hymenoptera: Formicidae) e distribuição de substratos nas câmaras de fungo**. 1996. 96 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas)-Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1996.

MOREIRA, A. A. ***Atta bisphaerica* Forel, 1908 (Hym: Formicidae): arquitetura de ninhos e distribuição de isca nas câmaras**. 2001. 87 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas)-Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

MOREIRA, A. A. et al. Comparação entre parâmetros externos e internos de ninhos de *Atta bisphaerica* Forel, 1908 (Hymenoptera, Formicidae). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 2, p.367 -370, 2002.

MOREIRA, A. A. et al. Nest architecture of *Atta laevigata* (F. Smith, 1858) (Hymenoptera: Formicidae). **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, Lisse, v. 39, n. 2, p. 109-116, 2004.

MOREIRA, S. M. **Morfologia e ontogenia dos ninhos de *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae)**. 2008. 82 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas/Zoologia)-Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

NAGAMOTO, N. S. et al. Method for the evaluation of insecticidal activity over time in *Atta sexdens rubropilosa* workers (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, Chico, v. 44, n. 2, p. 413-431, 2004.

NAGAMOTO, N. S.; FORTI, L. C.; RAETANO, C. G. Evaluation of the adequacy of diXubenzuron and dechlorane in toxic baits for leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) based on formicidal activity. **Journal of Pest Science**, Heidelberg, v. 80, p. 9-13, 2007.

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

PAGNOCCA, F. C. et al. Yeasts and filamentous fungi carried by the gyn**e**s of leaf-cutting ants. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 94, p. 517-526, 2008.

PAGNOCCA, F. C. Microbiota associada aos ninhos de formigas cortadeiras. In: ENCONTRO DE MIRMECOLOGIA, 13., 1997, Ilhéus, BA. **Anais...** Ilhéus: UESC, 1997. p. 24.

PAGNOCCA, F. C. Microbiota associada aos ninhos de formigas cortadeiras. In: INTERNATIONAL PEST ANT SYMPOSIUM, 6.; ENCONTRO DE MIRMECOLOGIA, 13., 1997, Ilhéus. **Anais...** Ilhéus: UESC, 1997. p. 24 -26.

PEREIRA, R.M.; ALVES, S.B.; STIMAC, J.L. Growth of *Beauveria bassiana* in fire ant nest soil with amendments. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.62, n.1, p.9-14, 1993.

PEREIRA-DA-SILVA, V. Contribuição ao estudo das populações de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, e *Atta laevigata* (Fr. Smith) no estado de São Paulo (Hymenoptera: Formicidae). **Studia Entomologica**, Petrópolis, v. 18, p. 201-250, 1975.

PEREIRA-DA-SILVA, V. **Dinâmica populacional, biomassa e estrutura dos ninhos iniciais de *Atta capiguara* Gonçalves, 1944 (Hymenoptera: Formicidae) na região de Botucatu.** 1979. 77p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas/Zoologia)-Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1979.

PEREIRA, R.M.; ALVES, S.B.; STIMAC, J.L. Growth of *Beauveria bassiana* in fire ant nest soil with amendments. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.62, n.1, p.9-14, 1993.

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. **Behavioral Ecology & Sociobiology**, New York, v. 52, n. 2, p. 151-157, 2002.

POULSEN, M.; BOT, A. N. M.; BOOMSMA, J. J. The effect of metapleural gland on the growth of a mutualistic bacterium on the cuticle of leafcutting ants. **Naturwissenschaften**, New York, v. 90, n. 9, p. 406-409, 2003.

POWELL, R.J.; STRADLING, D.J. Factors influencing the growth of *Attamyces bromatificus*, a symbiont of attine ants. **Trans. Brit. Mycol. Soc**., v. 87, p.205 - 213, 1986.

PRETTO, D. R. **Arquitetura dos túneis de forrageamento e do ninho de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera – Formicidae), dispersão de substrato e dinâmica do inseticida na colônia**. 1996. 110 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas)-Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1996.

QUINLAN, R. J.; CHERRETT, J. M. Studies on the role of the infrabuccal pocket of the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hym., Formicidae). **Insectes Sociaux**, Paris, v. 25, n. 3, p. 237-245, 1978b.

RASSE, P. H.; DENEUBOURG, J. L. Dynamics of nest excavation and nest size regulation of *Lasius niger* (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Insect Behavior**, Kansas, v. 14, n. 4, p. 433-449. , 2001.

RIBEIRO, F. L. A escavação do solo pela fêmea da saúva (*Atta sexdens rubropilosa*). **Revista de Psicologia da USP**, São Paulo, v. 6, n. 1, p. 75-93, 1995.

RIBEIRO, F. L. **Um estudo sobre a contribuição da fêmea durante a fundação da colônia em *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera – Formicidae).** 1972. 135 p. Tese (Doutorado em Psicologia)-Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1972.

RIBEIRO, G. T.; WOESNNER, R. A. Estudos sobre a biologia de sauveiros inicias de Atta sexdens sexdens (Linnaeus, 1758), (Hymenoptera, Formicidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil,** Londrina, v. 11, n. 1, p. 49-56, 1982.

ROCES, F.; KLEINEIDAM, C. Humidity preference for fungus culturing by workers of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Insectes Sociaux**, Paris, v. 47, p. 348-350, 2000.

RODRIGUES A. **Ocorrência de fungos filamentosos em ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) submetidos a tratamentos com iscas tóxicas**. 2004. 84 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia)-Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2004.

RODRIGUES, A. et al. Assessment of microfungi in fungus gardens free of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera : Formicidae). **Sociobiology**, Chico, v. 46, n. 2, p. 329-334, 2005.

RODRIGUES, A. et al. Filamentous fungi found on foundress queens of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlim, v. 134, n. 4, p. 342-345, 2010.

RODRIGUES, A. et al. Microfungal “weeds” in the leafcutter ant symbiosis. **Microbial Ecology**, Washington, DC, v. 56, n. 4, p. 604-614, 2008.

RODRIGUES, A. et al. Variability of non-mutualistic fungi associated with *Atta sexdens rubropilosa* nests. **Folia Microbiologica**, Prague, v. 50, n. 5, p. 421-425, 2005.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C. **Introduction to food-airborne fungi.** 6th ed. Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000. 389 p.

SANTIAGO, D. C. et al. Seleção de isolados de *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson para o controle de *Meloidogne paranaensis* em tomateiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1054-1064, 2006.

SANTOS, A. V.; 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**, Dordrecht, v. 163, p. 233-240, 2007.

SCHULTZ, T. R.; MEIER, R. A phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. **Systematic Entomology,** Oxford, v. 20, n. 4, p. 337-370, 1995.

SMITH, S.; ONIONS, A. H. S. **The preservation and maintenance of living fungi**. Slough: Commonwealthy Mycological Institute, 1983.

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

SPECHT, A.; DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M. E. Atratividade de iscas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. a formigas do gênero *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 23, p. 99-104, 1994.

STEENBERG, T.; HUMBER, R. A. Entomopathogenic potential of Verticillium and Acremonium species (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 73, p. 309-314, 1999.

STEIN, C.; XAVIER, G. F. Does substrate density affect the nest depth of female *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908) (Hymenoptera: Formicidae)? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 17, n. 3-4, p. 297-300, 1984.

SUDD, J H. Ants: foraging, nesting, brood behavior and polyethism. In: **Social Insects.** H. R. Hermann. Academic Press, New York, 1982, p.108-155.

SUNG G-H, HYWEL-JONES, N. L. et al. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. **Studies in Mycology**, Baarn, v. 57, p. 5-59, 2007.

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

TSCHINKEL, W. R. Colony growth and the ontogeny of worker polymorphism in the fire ant, Solenopsis invicta. **Behav. Ecol. Sociobiol**. v.22, p.103-115, 1988.

TSCHINKEL, W. R. Methods for casting subterranean ant nests. **Journal of Insect Science**, Wallingford, v. 10, n. 88, p.1-17, 2010.

TSCHINKEL, W. R. The nest architecture of the Florida harvester ant, *Pogonomyrmex badius*. **Journal of Insect Science,** Wallingford, v. 4, p. 21, 2004.

VERZA, S. S. et al. Nests arquitecture of the cutting ant *Acromyrmex rugosus rugosus*. **Insectes Sociaux**, Paris, p. 1-7, 2007.

VIEIRA NETO, E. H. M.; VASCONCELOS, H. L. Developemental chances in factors limiting colony survival and growth of the leaf-cutter ant *Atta laevigata*. **Ecography**, Copenhagen, v. 33, p. 538-544, 2010.

WEBER, N. A. Fungus-growing ants. **Science**, Washington, v. 153, n. 3763, p. 587- 604, 1966.

WEBER, N. A. The Attines. The fungus-culturing ants. **American Scientist**, New Haven, v. 60, n. 4, p. 448 - 456, 1972.

WETTERER, J. K. Ontogenetic changes in forager polymorphism and foraging ecology in the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. **Oecologia**, Berlim, v. 98, p. 235 -238,1994.

WILSON, E. O. Causes of ecological success the case of ants. **Journal Animal Ecology**, London, v. 56, p. 1-9, 1987.

WILSON, E. O. **The insect societies**. Cambridge: Harvard University Press, 1971. 548 p.

ZANETTI, R. et al. Eficiência de iscas granuladas (sulfluramida 0,3%) no controle de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae). **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 28, n. 4, p. 878-882, 2004.

ZANUCIO, J. C.; COUTO, L.; SANTOS, G. P. Eficiência da isca granulada Mirex-S, à base de sulfluramida no controle da formiga cortadeira *Atta laevigata* (Smith, 1858) (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 16, n. 3, p. 357-361, 1992.

ZANUCIO, J. C.; CRUZ, A. P.; SANTOS, G. P. Eficiência da isca granulada Mirex-S (sulfluramida 0,3%) no controle de *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae) em três dosagens. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 26, n. 1/2, p. 115-120, 1996.

ZANUNCIO, J. C. et al. Eficiência da isca granulada Mirex-S (sulfluramida 0,3%) no controle da formiga-cortadeira *Atta bisphaerica* FOREL (HYMENOPTERA: FORMICIDAE). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 17, n. 1, p. 85-90, 1993.

ZANUNCIO, J. C. et al. Influência das iscas formicidas Mirex-S e Blitz na paralisação de corte e no controle de *Atta sexdens rubropilosa* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 26, n. 2, p. 237-242, 2002.