

UTILIZAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E
MICOPATOGÊNICOS COMO ALTERNATIVA DE CONTROLE
BIOLÓGICO DE FORMIGAS CORTADEIRAS

THAIS BERÇOT PONTES TEODORO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MARÇO DE 2021

UTILIZAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E
MICOPATOGÊNICOS COMO ALTERNATIVA DE CONTROLE
BIOLÓGICO DE FORMIGAS CORTADEIRAS

THAIS BERÇOT PONTES TEODORO

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Produção Vegetal”

Orientador: Prof. Richard Ian Samuels

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

MARÇO – 2021

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

T314

Teodoro, Thais Berçot Pontes.

Utilização de fungos entomopatogênicos e micoparasitas como alternativa de controle biológico de formigas cortadeiras / Thais Berçot Pontes Teodoro. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2021.

117 f.

Inclui bibliografia.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2021.

Orientador: Richard Ian Samuels.

1. Attini. 2. Iscas biológicas. 3. *Escovopsis*. 4. Controle alternativo. 5. Entomopatógenos. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

UTILIZAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E
MICOPATOGÊNICOS COMO ALTERNATIVA DE CONTROLE
BIOLÓGICO DE FORMIGAS CORTADEIRAS

THAIS BERÇOT PONTES TEODORO

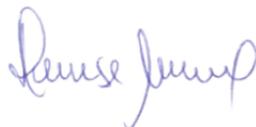
“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Produção Vegetal”

Aprovada em 19 de março de 2021

Comissão Examinadora:



Dr^a Aline Teixeira Carolino (D.Sc. Produção Vegetal) - UENF



Dr^a Denise Dolores Oliveira Moreira (D.Sc. Produção Vegetal) - UENF



Dr. Milton Erthal Junior (D.Sc. Produção Vegetal) – IFF-Guarus



Dr. Richard Ian Samuels (Ph.D. Zoologia) - UENF
Orientador

Freedom of thought is best promoted by the gradual illumination of men's
minds, which follows from the advance of science.

Charles R. Darwin (1809-1882)

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Vanda Berçot, por ter me dado a vida, por estar sempre ao meu lado me apoiando e incentivando. Meu grande exemplo de como viver a vida;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pela bolsa de estudos e pela oportunidade de me qualificar e crescer profissionalmente e pessoalmente; convivendo com pessoas tão incríveis, desde a graduação em Ciências Biológicas, ao mestrado em Ecologia e o doutorado em Produção Vegetal. Tenho grande apreço por essa Instituição!

Ao longo da minha caminhada na UENF, tive o privilégio de ter professores que muito me ensinavam e inspiravam. Agradeço, em especial, aos professores Magali Hoffmann, Gilberto Albuquerque, Richard Samuels, Gerson Adriano, Maria Cristina Gaglianone, Marina Suzuki, Cristal (*in memoriam*) e Paulo Pedrosa;

Ao Professor Richard, por abrir as portas do seu laboratório para mim. Por todos os ensinamentos, orientação, confiança, suporte e apoio, essenciais para que eu possa desenvolver as pesquisas e atividades acadêmicas. Obrigada Professor!

A Aline, por toda ajuda, brilhantismo, incentivos, conselhos, ombros para eu chorar, trocas de ideias, puxões de orelha, diversões e parceria. A pessoa que

me apresentou ao mundo da microbiologia e me fez me encantar pelos fungos!
Como eu aprendo com você!

Ao Prof. Gerson pelas trocas de ideias, sempre valiosas, e por toda ajuda, principalmente nas análises dos resultados. Muito Obrigada!

A Denise, a formiga rainha da nossa UENF! A pessoa que me ensinou tudo sobre formigas cortadeiras. Como eu aprendo com você! Obrigada por todos os ensinamentos, amizade e bate-papos!

Agradeço todo o pessoal do LEF e do Grupo de Patologia de Insetos da UENF, em especial Aline, Arli, Carol, Denise, Patrícia, Raymyson, Simone, Thalles e Will. Valeu galerinha, vocês são incríveis!

Agradeço a Thalles Mattoso, pela amizade, por tanto me ensinar sobre formigas cortadeiras e pelas parcerias nessa vida! Valeu!

Agradeço ao Prof. Milton Erthal por participar da banca e por toda parceria, bons momentos e trocas de ideias tão valiosas! Meu muito obrigada!

Não posso deixar de agradecer todo o pessoal do Sítio São José, onde eram feitas periódicas coletas de formigueiros, em especial Dona Geralda, Ana Paula e Milton; e ao Noco, que ajudava ativamente na caça aos formigueiros;

Por fim, mas jamais por último, agradeço à minha família de sangue, em especial, minha mãe, meu irmão e minhas tias; e à família que a vida me deu, em especial, Aline e toda a sua família linda, Pipi, Bia, Tia Eliane e Tio Luiz, Leo, Jajá, Nat, Carol, Gi e Mariana, por sempre torcerem por mim.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
<i>As formigas cortadeiras e seu fungo simbiote.....</i>	4
<i>Importância agrícola, florestal e econômica das formigas.....</i>	5
<i>Métodos de controle das formigas cortadeiras.....</i>	6
<i>Controle químico</i>	6
<i>Controle Biológico.....</i>	7
3. TRABALHOS.....	10
3.1. INFECÇÃO DE FORMIGAS CORTADEIRAS COM CONÍDIOS E BLASTOSPOROS DE FUNGOS ENTOMOPATÓGENOS APLICADOS USANDO DIFERENTES FORMULAÇÕES.....	10
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
INTRODUÇÃO	12
MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
<i>Produção e preparo da suspensão de conídios dos isolados de fungos entomopatogênicos.....</i>	15

<i>Produção e preparo da suspensão de blastosporos dos isolados de fungos.....</i>	15
<i>Ensaio de virulência dos isolados fúngicos em Acromyrmex subterraneus subterraneus e Atta sexdens rubropilosa.....</i>	16
<i>Análise dos dados.....</i>	17
RESULTADOS.....	18
<i>Virulência de Beauveria bassiana</i>	18
<i>Virulência de Metarhizium anisopliae.....</i>	20
<i>Comparações entre os propágulos e suas formulações.....</i>	22
<i>Conídios.....</i>	22
<i>Blastosporos em água (BA).....</i>	23
<i>Blastosporos em emulsão.....</i>	24
DISCUSSÃO.....	25
CONCLUSÕES	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
3.2. PRODUÇÃO DE MICROESCLERÓCIOS DE Escovopsis weberi E SEUS EFEITOS EM JARDIM DE FUNGOS DE ACROMYRMEX SUBTERRANEUS SUBTERRANEUS: NOVAS PERSPECTIVAS DE CONTROLE BIOLÓGICO DE FORMIGAS CORTADEIRAS.....	35
RESUMO.....	35
ABSTRACT.....	36
INTRODUÇÃO.....	37
MATERIAL E MÉTODOS	39
<i>Obtenção das colônias de formigas no campo, manutenção e estabelecimento das minicolônias em laboratório.....</i>	39
<i>Obtenção, identificação e produção de conídios de Escovopsis weberi.....</i>	40
<i>Produção de microesclerócios de Escovopsis em cultura líquida.....</i>	41
<i>Avaliação do peso seco e da produtividade de microesclerócios.....</i>	41
<i>Produção de isca.....</i>	42
<i>Bioensaios em minicolônia.....</i>	42
<i>Análises estatísticas.....</i>	43
RESULTADOS.....	44

<i>Produtividade de microesclerócios de Escovopsis weberi em cultura líquida</i>	44
<i>Bioensaios em minicolônias</i>	44
<i>Oferta de isca</i>	44
<i>Atividade de forrageamento</i>	47
<i>Taxa de descarte de lixo e perda da biomassa do jardim de fungos</i>	47
DISCUSSÃO.....	49
CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
3.3 EFEITO DE OFERTAS CONSECUTIVAS DE ISCAS BIOLÓGICAS PARA AS FORMIGAS CORTADEIRAS <i>Acromyrmex subterraneus subterraneus</i> E <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	61
RESUMO.....	61
ABSTRACT.....	62
INTRODUÇÃO	63
MATERIAIS E MÉTODOS.....	65
<i>Manutenção das colônias oriundas do campo e estabelecimento das minicolônias em laboratório</i>	65
<i>Produção de microesclerócios de Escovopsis</i>	65
<i>Confecção dos pellets de isca</i>	66
<i>Bioensaios em minicolônia</i>	66
<i>Análise estatística</i>	68
RESULTADOS	69
<i>Carregamento das iscas</i>	69
<i>Taxas de corte de folhas</i>	72
<i>Descarte de lixo</i>	74
<i>Efeitos das ofertas das iscas na biomassa dos jardins de fungos</i>	75
DISCUSSÃO	77
CONCLUSÃO.....	81
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
4. RESUMOS E CONCLUSÕES.....	87
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

RESUMO

TEODORO, Thais Berçot Pontes. D.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2021. Utilização de fungos entomopatogênicos e micopatogênicos como alternativa de controle biológico de formigas cortadeiras. Orientador: Richard Ian Samuels.

O controle de insetos-praga utilizando métodos alternativos ao uso de produtos químicos é uma necessidade em nível global. Na região Neotropical, as formigas cortadeiras do gênero *Atta* e *Acromyrmex* provocam severos prejuízos econômicos a diversas culturas ao cortar e carrear para os ninhos, material vegetal fresco para cultivar seu fungo simbiote. Devido à essa característica, as formigas cortadeiras são consideradas pragas agrícolas, florestais e pastoris. Nesta tese, foram desenvolvidos três trabalhos referentes ao controle biológico das formigas cortadeiras. O primeiro trabalho compara a virulência de conidiosporos e blastosporos dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em diferentes formulações contra operárias de *Atta sexdens rubropilosa* e *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. Ambas as espécies de fungos e tipos de propágulos foram virulentos para as duas espécies de formigas estudadas. Contudo, a apropriada formulação do fungo foi crucial para o sucesso à infecção, uma vez que tratamentos com conídios e blastosporos formulados em emulsão reduziram significativamente as taxas de sobrevivência dos insetos. No tratamento com blastosporos em água, operárias de *Atta* foram mais susceptíveis a infecção fúngica do que operárias de *Acromyrmex*. O segundo trabalho investiga a produção

de microesclerócios de *Escovopsis weberi*. Esclerócios são estruturas de resistência fúngica amplamente encontrados na natureza, mas nunca antes induzido em laboratório para este fungo. O efeito de microesclerócios de *E. weberi* em minicolônias de *A. subterraneus subterraneus* foi avaliado e comparado com conídios do mesmo fungo, oferecidos para as formigas na forma de iscas granuladas atrativas a base de laranja. Ambos os propágulos apresentaram efeito negativo nas minicolônias, como diminuição do corte de folhas, aumento do descarte de lixo e queda da biomassa do jardim de fungos. Iscas com microesclerócios foram mais atrativas para as operárias do que iscas com conídios. Uma vez que as operárias possuem alto grau de seletividade e organização social a fim de evitar a entrada de patógenos nas colônias, a utilização de um propágulo que se apresenta mais atrativo para as formigas e com efeito negativo no jardim de fungos abre novas possibilidades para o controle biológico de formigas cortadeiras. O terceiro trabalho investigou a oferta subsequente de iscas biológicas contendo microesclerócios de *E. weberi* com duas bases atrativas diferentes, farinha de laranja e extrato de soja. A taxa de aceitação e o efeito nas minicolônias de *A. sexdens rubropilosa* e *A. subterraneus subterraneus* foram avaliados. Ambas as espécies de formigas apresentaram alta aceitação das iscas na primeira oferta. Porém, na segunda oferta, as operárias de *Acromyrmex* demonstraram baixa aceitação das iscas. Já as operárias de *Atta* apresentaram baixa aceitação de isca com farinha de laranja, mas a taxa de aceitação das iscas com extrato de soja se manteve similar à da primeira oferta. Esses resultados podem ser relevantes no estabelecimento das estratégias de controle biológico das duas espécies de formigas estudadas.

Palavras-chave: Attini, iscas biológicas, *Escovopsis*, controle alternativo, entomopatógenos.

ABSTRACT

TEODORO, Thais Berçot Pontes. D.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. March, 2021. Application of entomopathogenic and myco-parasitic fungi for the biological control of leaf-cutting ants. Advisor: Richard Ian Samuels.

Insect pest control using alternative methods to chemicals is a global need. In the Neotropics, leaf-cutting ants of the genus *Atta* and *Acromyrmex* cause severe economic losses to several crops by cutting and carrying to their nests leaves, shoots and flowers of plants to cultivate their symbiont fungus. Due to this characteristic, leaf-cutting ants are considered agricultural, forestry and pasture pests especially in Brazil. In this thesis, three studies on the biological control of leaf-cutting ants were developed. The first study compared the virulence of conidiospores and blastospores of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in different formulations against *Atta sexdens rubropilosa* and *Acromyrmex subterraneus subterraneus* workers. The results indicated that both species of fungi and both types of propagules were virulent. However, the appropriate formulation of the fungal suspension was crucial for infection success, since treatments with conidia and blastospores formulated in emulsion significantly reduced survival rates. When treated with blastospores in water, *Atta* workers were more susceptible to fungal infection than *Acromyrmex* workers. The second study investigated the production of microsclerotia of

Escovopsis weberi. Sclerotia are fungal resistance structures widely found in nature, but never before induced in the laboratory for this fungus. The effect of *E. weberi* microsclerotia on *A. subterraneus subterraneus* mini colonies was evaluated and compared with conidia of the same fungus, offered to the ants in the form of attractive orange-based granulated baits. Both types of propagules showed negative effects on the mini colonies, such as decreased leaf cutting, increased litter disposal, and decreased biomass of the fungus garden. However, baits with microsclerotia were more attractive to the workers than baits with conidia. Since workers have a high degree of selectivity and social organization to prevent pathogens from entering colonies, using a propagule that is more attractive to ants and has a negative effect on the fungus garden opens new possibilities for biological control of leaf-cutting ants. The third study investigated the subsequent offering of baits containing *E. weberi* microsclerotia with two different attractants, orange powder and soybean extract. The acceptance rate and the effect on the mini colonies of *A. sexdens rubropilosa* and *A. subterraneus subterraneus* were evaluated. Both ant species showed high acceptance of the baits during the first offering. However, during the second offer, *Acromyrmex* workers showed low bait acceptance for baits with either orange or soybean extract. *Atta* workers showed low acceptance of orange baits during the second offer, but the acceptance rate of baits with soybean extract was similar to that of the first offer. These results are important for the establishment of biological control strategies.

Keywords: Attini, biological baits, *Escovopsis*, alternative pest management, entomopathogens.

1. INTRODUÇÃO

As formigas cortadeiras do gênero *Atta* e *Acromyrmex*, pertencem à tribo Attini (Weber, 1972). Elas possuem uma simbiose com o fungo do gênero *Leucoagaricus* (Basidiomycota: Agaricales), que se iniciou entre 45 e 65 milhões de anos atrás (Mueller & Wcislo, 2001). Nesta simbiose, as formigas provêm recurso alimentar e proteção ao fungo. Por outro lado, o fungo fornece alimento para os indivíduos da colônia. As formigas cortadeiras devastam plantações inteiras em sistemas agrícolas, pastagens, áreas florestais de pinus e eucalipto a fim de carrear folhas, galhos, flores e brotos para dentro do ninho e alimentar o fungo simbiote. Devido a essa característica, as formigas cortadeiras são consideradas pragas de grande importância econômica (Cherrett, 1986; Montoya-Lerma et al., 2012, Zanetti et al., 2014).

Os esforços de controle se concentram principalmente no uso de defensivos químicos, o que são eficazes e práticos. Porém, os malefícios dos pesticidas vêm de encontro com as vantagens econômicas. Há a preocupação quanto às consequências do uso extensivo e abusivo dos pesticidas para o meio ambiente e a saúde humana (Carson, 1962; Flury, 1996; Cocco, 2002; Laabs et al., 2002). Desde meados do século passado, o desenvolvimento de tecnologias alternativas ao uso de pesticidas para o controle de insetos vem crescendo e tendo apelo da sociedade, cada vez mais ciente dos malefícios causados por eles (Huffaker & Messenger, 1976; Bellows & Fisher, 1999).

O controle biológico de pragas é uma alternativa que possui vantagens que vão ao encontro com as expectativas de segurança ambiental e saúde humana e engloba formas não evasivas de controle populacional das espécies de pragas. Para tal, utiliza os denominados inimigos naturais dos insetos: predadores, parasitoides e patógenos (DeBach & Rosen, 1991). O controle biológico de pragas muitas vezes é sincronizado com outras formas de controle, como o controle cultural, controle mecânico e o próprio controle químico, caracterizando o manejo integrado de pragas (Kogan, 1998; Prokopy & Kogan, 2009).

Uma das vertentes do controle biológico é o controle microbiano, que utiliza agentes biológicos como vírus, bactérias, fungos, nematoides e protozoários (Alves, 1998). Para o controle microbiano de formigas cortadeiras, há dois gêneros de fungos entomopatogênicos mais estudados: *Metarhizium* e *Beauveria*. Ambos os gêneros possuem espécies e variedades com eficiência comprovada em reduzir a população desses insetos (Alves & Gómez, 1983; Machado et al., 1988; Diehl-Fleig & Lucchese, 1991; Silva et al., 1993; Jaccoud et al., 1999).

O uso de fungos micopatogênicos no controle de colônias de formigas cortadeiras é uma outra possibilidade de controle microbiano do formigueiro. O fungo *Escovopsis* spp. (Ascomycota: Hypocreales) é um parasita especialista do fungo simbionte das formigas e é comumente encontrado parasitando os jardins de fungos (Currie et al., 1999; Folgaraiti et al., 2011; Haifig et al., 2017). A fim de evitar contaminações de microrganismos patogênicos, as operárias apresentam uma série de comportamentos de manutenção e limpeza da colônia (Cremer et al., 2007). Porém, este parasita pode se estabelecer dentro da colônia, suprimir o hospedeiro e colapsar o formigueiro (Reynolds & Currie, 2004).

No campo, a forma de aplicação dos agentes de controle é uma área de pesquisa que permanece em constante aprimoramento. Em relação às formigas cortadeiras, devido às suas características comportamentais, a aplicação na forma de iscas é atualmente a estratégia mais promissora. Contudo, as formigas precisam identificar as iscas como recurso alimentar, carregá-las para dentro do ninho e não as descartar no lixo. As iscas devem ser atrativas o suficiente para evitar a rejeição por parte das operárias. Comercialmente, a base atrativa mais usada em iscas é a polpa cítrica, apesar de outras bases já terem sido estudadas (Boaretto & Forti, 1997; Lima et al., 2003; Teixeira & Santos, 2008; Carlos et al., 2009; Nagamoto et al., 2011; Zanetti et al., 2014). Os desafios para o desenvolvimento de métodos

sustentáveis com uso de biológicos para controle de formigas cortadeiras são grandes.

A partir das informações no que concerne à problemática e importância referente às formigas cortadeiras, o objetivo deste trabalho é desenvolver novas alternativas de controle desses insetos, a partir da utilização de fungos entomopatogênicos e micopatogênicos formulados em iscas atrativas para as formigas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

As formigas cortadeiras e seu fungo simbiote

As formigas cultivadoras de fungos pertencem à tribo Attini, subfamília Myrmicinae e ocorrem somente na região neotropical (Weber, 1972). Pertencem a essa tribo os gêneros *Myrmicocrypta*, *Mycocepurus*, *Apterostigma*, *Mycetarotes*, *Mycetosoritis*, *Cyphomyrmex* e *Mycetophylax*, que utilizam cadáveres e fezes de insetos como substrato e possuem colônias de tamanho pequeno a médio. Os gêneros *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex* utilizam material vegetal fresco e morto como substrato e suas colônias são de tamanho médio (Currie, 2001a; Schultz & Brady, 2008). Os dois gêneros mais derivados desta tribo são *Atta* e *Acromyrmex*. Possuem colônias consideravelmente maiores e são as únicas formigas deste grupo que utilizam exclusivamente material vegetal fresco e, portanto, comumente são chamadas de formigas cortadeiras (Della Lucia et al, 2014).

As formigas da tribo Attini coevoluiram com fungos simbiotes da tribo Leucocoprineae (Basidiomycota: Agaricales) em um processo que se iniciou entre 45 e 65 milhões de anos atrás (Wilson, 1971; Mueller & Wcislo, 2001). Nesta relação mutualística, as formigas cultivam o fungo, o provendo de alimento e proteção. O fungo, por sua vez, produz estruturas ricas em lipídios e carboidratos, chamadas de gongilídias. As secreções dessas estruturas são as únicas fontes de

alimento das rainhas e das larvas e suplementam a alimentação das operárias (Martin & Martin, 1970; Quinlan & Cherrett, 1979; Shik et al., 2018).

As formigas cortadeiras são insetos eussociais e apresentam grande sucesso evolutivo. A eussociedade presente nas colônias de formigas cortadeiras faz com que elas possuam uma estrutura social complexa e hierárquica (Della Lucia et al., 2014). A divisão de castas existente nas colônias é de suma importância para a manutenção e sucesso da colônia. As rainhas fundam os ninhos e se mantêm reprodutivas por toda vida, gerando todos os indivíduos da colônia. A casta das operárias, que são estéreis, mantêm as atividades de cuidado com o fungo simbiote, com os indivíduos imaturos e com as rainhas; realizam as atividades de forrageamento, patrulhamento e defesa (Della Lucia, 1993). A comunicação química, eficiente entre todos os indivíduos, os comportamentos de limpeza como “*allogrooming*”, “*selfgrooming*”, a higiene do ninho e a remoção de indivíduos mortos também são comportamentos de grande importância para a integridade da colônia (Diehl-Fleig, 1995).

Importância agrícola, florestal e econômica

As atividades desenvolvidas por todos os indivíduos do formigueiro fazem com que enxergue as colônias de formigas como um superorganismo, fato que dificulta o controle de suas populações, quando se faz necessário. As formigas cortadeiras são pragas importantes em vários sistemas agrícolas, pastoris e florestais, pois devastam grandes áreas em um curto período de tempo e provocam perdas que podem chegar a bilhões de dólares (Hölldobler & Wilson, 1990; Della Lucia, 2003; Montoya-Lerma et al., 2012). Quatro espécies de *Atta* (*A. capiguara*, *A. cephalotes*, *A. laevigata* e *A. sexdens*) e seis espécies de *Acromyrmex* (*A. balzani*, *A. octospinosus*, *A. rugosus*, *A. subterraneus brunneus*, *A. subterraneus molestans* e *A. subterraneus subterraneus*) são consideradas pragas importantes (Della Lucia et al., 2014).

É importante considerar que insetos-praga são espécies que sempre existiram em equilíbrio na natureza. O fato de se tornarem praga é uma consequência de uma série de fatores presentes nos sistemas agrícolas, como presença de recurso alimentar em abundância e ausência de fatores deletérios

como competição e predadores, que favorecem o crescimento populacional descontrolado desses indivíduos, (Gullan & Cranston, 2010).

Além de causar problemas em áreas rurais, as formigas cortadeiras também causam grandes prejuízos em áreas urbanas. A fundação de ninhos nas cidades implica em uma outra problemática, uma vez que podem comprometer a infraestrutura de construções, provocando rachaduras e até mesmo desabamentos. De acordo com Juruena (1980), já foram encontrados formigueiros de saúvas com mais de 400 m². Uma colônia *Atta* de aproximadamente 200 m² pode abrigar aproximadamente seis milhões de indivíduos (Mariconi, 1970).

Métodos de controle de formigas cortadeiras

Controle químico

O método mais utilizado para controle das formigas cortadeiras é o controle químico. Este se baseia na utilização de iscas atrativas, pó seco e termonebulização contendo como princípio ativo compostos como fipronil, diflubenzuron e sulfluramida (Boaretto & Forti, 1997; Delabie et al., 2010). Dentre estas, a estratégia de controle mais eficiente, prática e de baixa demanda técnica para o uso é a utilização de iscas atrativas. Comercialmente, as iscas formicidas se apresentam na forma de granulados secos com polpa cítrica como base atrativa para as operárias. As iscas são postas no ambiente externo da colônia, próximo às trilhas de forrageamento. As operárias carregam os pellets para dentro da colônia, os incorporam no jardim de fungos e dispersam as toxinas por trofalaxia, disseminando os inseticidas por todo formigueiro (Moreira et al 2006; Catalani et al., 2020). A correta aplicação da isca é importante, pois caso a dispersão do inseticida dentro da colônia não afete a formiga rainha, esta irá sobreviver. Nesses casos, apesar de muitas operárias morrerem no processo, a colônia resistirá, pois a rainha continuará ativamente a postura dos ovos, reestabelecendo a colônia.

Porém, apesar dos efeitos imediatos dos pesticidas, é preciso considerar alguns aspectos negativos de seu uso. O uso indiscriminado de produtos químicos pode provocar diminuição da biodiversidade, resistência genética das pragas, queda na população de insetos polinizadores, intoxicação, contaminação de solos, rios e lençóis freáticos, persistência e desequilíbrio ambiental e diversos prejuízos

à saúde das pessoas, incluindo câncer e outras doenças (Moreira et al., 2002; Ribas & Matsumura, 2009; Soares, 2010).

Controle biológico

O controle biológico é uma alternativa ao uso dos agrotóxicos. Baseia-se no uso de inimigos naturais a fim de reduzir a população dos insetos-praga (Murdoch et al., 1985). Os inimigos naturais possuem alta especificidade, ocorrem naturalmente nos ambientes, podem ter sinergismo com outros inimigos naturais, não possuem efeitos danosos para o meio ambiente e podem persistir por gerações (Lacey et al., 2001).

Dentro do controle biológico, o controle microbiano de insetos utiliza como estratégia a aplicação de microrganismos que sejam patógenos dos insetos-praga, como bactérias, nematoides, vírus, protozoários e fungos (Lacey et al., 2001). Dos microrganismos patogênicos, os fungos são os mais utilizados em programas de controle microbiano. Os conídios dos fungos precisam apenas do contato com o tegumento do inseto para iniciar o processo de infecção (Alves, 1998). Os fungos entomopatogênicos possuem três tipos de propágulos com potencial de serem utilizados no controle de insetos: conídios, blastosporos e microesclerócios. Conídios são propágulos que podem ser produzidos em meio de cultura sólido (conídios aéreos) ou líquido (conídios submersos) e são os propágulos mais comumente utilizados como micoinseticidas no controle biológico de insetos (Faria & Wraight, 2007). Blastosporos são propágulos naturalmente presentes na hemocele de insetos infectados por fungos entomopatogênicos. Mas, em condições de laboratório, em meio líquido, é possível induzir o fungo a produzir essas estruturas (Jackson et al., 1997). Sua estrutura semelhante a leveduras permite maior acesso aos nutrientes presentes no inseto (Tartar et al., 2005). Esclerócios são estruturas fúngicas de resistência. São naturalmente encontrados, principalmente no solo, quando as condições ambientais não são favoráveis ao desenvolvimento do fungo (Smith et al. 2014). Em laboratório, é possível induzir a formação dessas estruturas em meio líquido, sendo bastante comum a indução de esclerócios de tamanhos menores que 600 µm, caracterizando os microesclerócios (Jackson & Jaronski, 2009).

Duas espécies de fungos entomopatogênicos, principalmente, têm potencial no controle de *Atta* e *Acromyrmex*: *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* (Meyling & Eilenberg, 2007; Zanetti et al., 2014). Após infectadas, as formigas adoecem e têm seu comportamento alterado. A locomoção e a alimentação ficam comprometidas e aumentam a vulnerabilidade do inseto, que podem vir a morrer em decorrência da patogenicidade do fungo. Após causar a morte do inseto, há a ocorrência da conidiogênese, que é o processo de produção de conídios na superfície dos cadáveres. (Shah & Pell, 2003; Neves & Alves, 2004;). Dessa forma, os esporos são dispersados pelo ambiente, podendo contaminar outros insetos, aumentando a chance de infecções secundárias.

Além da utilização de fungos entomopatogênicos, outro viés promissor do controle microbiano de formigas cortadeiras é a utilização de fungos parasitas (Currie, 2001a, Reynolds & Currie, 2004, Folgarait et al., 2011). O fungo simbiote cultivado pelas formigas cortadeiras é frequentemente parasitado por fungos do gênero *Escovopsis* (Ascomycota: Hypocreales), parasitas especialistas que coevoluiram com a associação formiga-fungo desde a sua origem (Folgarait et al., 2011, Marfetan et al., 2015).

As formigas cortadeiras, como insetos eussociais, possuem estratégias para combater e controlar a presença de microrganismos patogênicos, como, por exemplo, alterações no comportamento de forrageamento (Cremer et al., 2007; Goes et al., 2020), produção de antibióticos secretados pelas glândulas metapleurais (Fernandez-Marín et al., 2006), atividades de manutenção e limpeza da colônia como *fungus grooming* e *weeding*, e associação com a bactéria simbiótica *Pseudonocardia* presente em seu exoesqueleto, que produz antibióticos a fim de suprimir a presença de microrganismos patógenos (Folgarait et al., 2011; Samuels et al., 2013). Porém, mesmo com todos os aparatos de defesa, a presença de *Escovopsis* é fato recorrente nas colônias, tanto de ambientes naturais quanto em colônias mantidas em laboratório (Currie, 2001a). Sua presença no interior dos ninhos ameaça a integridade da colônia. Ao parasitar o fungo simbiote, *Escovopsis* reduz consideravelmente o volume do jardim de fungos, diminuindo progressivamente o recurso alimentar principal de toda colônia até exaurir totalmente o jardim de fungos (Silva et al., 2006; Taerum et al., 2007; Marfetan et al., 2015). A utilização de *Escovopsis* para controle de formigas cortadeiras é uma alternativa bastante interessante e promissora, uma vez que

apesar dos mecanismos de defesa das colônias, este fungo frequentemente consegue se estabelecer e suprimir as mesmas.

3. TRABALHOS

3.1. INFECÇÃO DE FORMIGAS CORTADEIRAS COM CONÍDIOS E BLASTOSPOROS DE FUNGOS ENTOMOPATÓGENOS APLICADOS EM DIFERENTES FORMULAÇÕES

RESUMO

As formigas cortadeiras são consideradas um dos principais herbívoros do Neotrópico, causando severos prejuízos econômicos para a agricultura. Fato este devido aos efeitos de suas atividades de desfoliação de plantas, carreando para o interior de seus ninhos o recurso vegetal fresco necessário para o cultivo do seu fungo simbiote. Alternativas sustentáveis são constantemente investigadas como medida de controle desta praga. Nesse estudo, os fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* mostraram grande potencial de controle de operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e *Atta sexdens rubropilosa*. Nos ensaios, os fungos foram utilizados na forma de conídios e blastosporos. Conídios foram suspensos em Tween 80 (0,03%) e blastosporos

foram formulados em emulsão, com 5% de óleo de soja, ou suspensos em água. Foram observadas maiores taxas de sobrevivência de operárias de *Acromyrmex* nos tratamentos com blastosporos em água (BA) expostas à *B. bassiana* (27,7%) e à *M. anisopliae* (41%). Já operárias de *Atta* nestas mesmas condições apresentaram baixa taxa de sobrevivência, sendo 3,3% no tratamento com *B. bassiana* e 2,2% com *M. anisopliae*. Nos tratamentos com blastosporos em emulsão (BE) e com conídios, ambas as espécies de fungo foram eficientes, causando alta taxa de mortalidade das operárias de *Atta* e *Acromyrmex* no final dos dez dias de avaliação. O tratamento com conídios de *B. bassiana* apresentou 100% de mortalidade de operárias de *Acromyrmex* e apenas 1,1% de sobrevivência nas operárias de *Atta*. Formigas expostas a conídios de *M. anisopliae* apresentaram sobrevivência de 4,54 % para *Acromyrmex* e 4,44 % para *Atta*. Os resultados desse estudo mostraram que conídios e blastosporos em emulsão foram os mais virulentos para as duas espécies de formigas. Ademais, todas as formulações dos propágulos se apresentaram eficientes contra operárias de *Atta*, mostrando potencial para uso em manejo de formigas cortadeiras.

Palavras-chave: Controle biológico, Attini, *Beauveria*, *Metarhizium*

ABSTRACT

Leaf-cutting ants are considered one of the main herbivores of the Neotropics, causing severe economic losses in agriculture. This is due to the effects of their plant defoliation activities, carrying the leaves to the interior of their nests, the fresh plant material is used to cultivate their symbiont fungus. Sustainable alternatives are being investigated as control measures for this pest. In this study, the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* showed potential for the control of *Acromyrmex subterraneus subterraneus* and *Atta sexdens rubropilosa* workers. In the bioassays, these fungi were used in the form of conidia and blastospores. Conidia were suspended in Tween 80 (0,03%) and

blastospores were formulated in emulsion using 5% vegetable oil, and suspended in water. Higher survival rates of *Acromyrmex* workers were observed in the treatments with blastospores in water (BA) exposed to *B. bassiana* (27.7% survival) and *M. anisopliae* (41% survival). On the other hand, *Atta* workers under the same conditions showed low survival rates, 3.3% in the treatment with *B. bassiana* and 2.2% when exposed to *M. anisopliae*. In the treatments with blastospores in emulsion (BE) and conidia, both species of fungi were efficient, causing high mortality of *Atta* and *Acromyrmex* workers over 10 days. The treatment with *B. bassiana* conidia showed 100% mortality of *Acromyrmex* workers and only 1.1% survival of *Atta* workers. Ants exposed to *M. anisopliae* conidia showed 4.54 % survival in *Acromyrmex* and 4.44 % in *Atta*. The results of this study indicate that conidia and blastospores in emulsion were the most virulent against both ant species. Furthermore, all propagule formulations were efficient against *Atta* workers, showing their potential for use in leaf-cutting ant management.

Keywords: Biological control, Attini, *Beauveria*, *Metarhizium*

INTRODUÇÃO

As formigas dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* são insetos sociais que cultivam um fungo simbiote da espécie *Leucoagaricus gongylophorus*. Nesta associação, as operárias alimentam e protegem o jardim de fungos, enquanto o fungo se apresenta como principal recurso alimentar para formas imaturas e a rainha (Shik et al., 2018). O tamanho das colônias dessas formigas pode variar de acordo com o gênero e a espécie e isso influencia o nível de dificuldade de controle. Espécies de *Atta* possuem ninhos mais profundos e volumosos no subsolo, enquanto colônias de *Acromyrmex* possuem ninhos menores e mais superficiais (Lopes et al., 2011; Della Lucia et al., 2014). Como as formigas cortadeiras são insetos de grande importância agrícola e florestal devido aos danos econômicos que causam às diversas culturas no Neotrópico, o desenvolvimento de medidas de

controle desses insetos é de grande relevância (Della Lucia et al., 2014, Zanetti et al., 2014). O emprego de formicidas químicos sintéticos é a principal forma de controle, sendo o mais disseminado devido ao seu rápido efeito, praticidade e facilidade de acesso. Em contrapartida, o controle químico é sabidamente danoso para o meio ambiente e para a saúde humana. A busca por alternativas de controle é uma preocupação crescente, uma vez que apesar dos incentivos governamentais e corporativos para o uso de inseticidas químicos sintéticos, a sociedade civil tem demandado soluções para o consumo de alimentos orgânicos e sustentáveis (Soares & Porto, 2009).

O controle biológico de insetos é uma estratégia sustentável que traz benefícios ambientais não apresentados pelos inseticidas químicos, além de não promover resistência dos insetos (Lacey et al., 2001). A utilização de fungos entomopatogênicos para o controle de insetos é bastante promissora. Com seu mecanismo especializado de infecção por meio da penetração ativa do tegumento do hospedeiro, esses fungos possuem uma vantagem sobre outros agentes de controle biológico como bactérias, protozoários e vírus, pois o contato direto dos conídios com a cutícula do hospedeiro já é o suficiente para iniciar o processo de infecção (Charnley, 2003; Samuels et al., 2016). Estes microrganismos são eficientes contra todos os estágios do ciclo de desenvolvimento dos insetos, desde o ovo até o inseto adulto, enquanto outros microrganismos patogênicos somente infectam estágios específicos (Charnley, 2003).

O potencial do uso de fungos no controle de formigas cortadeiras é promissor, considerando que espécies entomopatogênicas foram encontradas em formigas operárias nas proximidades ou dentro dos ninhos das formigas (Hughes et al., 2004; Angelone & Bidochka, 2018). Dentro da colônia, as formigas estão em contato constante com uma série de microrganismos, já que o interior da colônia representa um ecossistema em si que inclui outros fungos, leveduras e bactérias com potencial patogênico para as formigas e seu simbionte (Ribeiro et al., 2012). Entretanto, as formigas desenvolveram ao longo de sua evolução aparatos que as mantêm protegidas contra esses parasitas. Utilizando comportamentos como o *selfgrooming* e *allogrooming*, além da secreção de substância antimicrobiana através de glândula metapleurais, e dos benefícios obtidos pela associação simbiótica com a bactéria *Pseudonocardia*, as formigas conseguem minimizar a

atividade de patógenos mantendo a colônia sob controle de infecções (Cremer et al., 2007, Mattoso et al., 2011)

Dos microrganismos patogênicos de insetos, *Beauveria* e *Metarhizium* são os gêneros mais estudados, os quais foram avaliadas a sua patogenicidade para formigas de várias espécies, como *Acromyrmex ambiguus*, *Acromyrmex crassispinus* e *Acromyrmex lundii* (Folgarait et al., 2020) *Atta sexdens rubropilosa* (Loureiro & Monteiro, 2005) e *Solenopsis invicta* (Qiu et al., 2019). Além de fungos dos gêneros *Beauveria* e *Metarhizium*, outros fungos mostram potencial para controle das formigas, como o fungo *Purpureocillium lilacinum*, que ocasionalmente é encontrado em insetos e foi considerado um agente a ser potencialmente utilizado em programas do manejo de formigas (Goffre & Folgarait, 2015).

Conídios são propágulos bastante utilizados como agentes de controle de insetos, e quando inserido em cultura líquida e em condições especializadas, é possível induzir a produção de blastosporos, um outro tipo de propágulo potencialmente eficaz como agente de controle (Jackson et al., 1997). Blastosporos são células fúngicas, leveduriformes, que são encontradas na hemocele dos insetos durante o processo natural de infecção por fungos. São células liberadas através das hifas terminais durante o processo de colonização do hospedeiro. Essas células possuem porções hidrofílicas e, desta forma, em ambiente aquoso, são capazes de dispersar enquanto sua porção hidrofóbica interage com o tegumento e partes internas dos insetos (Miranpuri e Khachatourians, 1990; Alkhaibari et al., 2016).

Devido ao fato de as formigas cortadeiras viverem dentro de ninhos com alta umidade e temperatura amena, o uso de fungos entomopatogênicos é sugerido como um método sustentável de controle (Ribeiro et al., 2012). Entretanto, como os fungos em sua diversidade apresentam diferentes características físicas, e sensibilidade aos fatores abióticos, se faz de caráter importante a seleção de isolados mais virulentos, e formulações que favoreçam a infecção do hospedeiro alvo e verificar a susceptibilidade dos insetos ao fungo a priori, é de caráter importante para desenvolvimento de métodos para o manejo da praga.

O objetivo deste estudo foi avaliar a virulência dos propágulos conídios e blastosporos dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*, aplicados em diferentes formulações contra *Acromyrmex subterraneus*

subterraneus e *Atta sexdens rubropilosa*, a fim de desenvolver estratégias de controle biológico.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Entomologia e Fitopatologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense. As colônias de *A. subterraneus subterraneus* foram coletadas em Bom Jardim, RJ e as colônias de *A. sexdens rubropilosa* foram coletadas em eucaliptal em São Francisco do Itabapoana, RJ. As colônias foram mantidas no setor de Mirmecologia, com temperatura e umidade relativa controladas ($\pm 27^{\circ}\text{C}$ e $\pm 70\%$), fotoperíodo e oferta diária de folhas de *Acalypha wilkesiana* e esporadicamente rosas e flocos de cereais (Della Lucia, 1993).

Produção e preparo da suspensão de conídios dos isolados de fungos entomopatogênicos

O isolado de *Metarhizium anisopliae* (denominado M2) e o isolado de *Beauveria bassiana* (denominado LPP139) foram cultivados em meio de cultivo BDA (sumo de batata inglesa, dextrose e ágar) e mantidos em câmara climatizada do tipo BOD pelo período de 10 dias a 27°C , 70% de UR e fotoperíodo de 12L/12E. Após o crescimento do fungo, os conídios eram removidos do meio de cultivo com auxílio de uma espátula para preparação de suspensão, utilizando o espalhante adesivo Tween 80 (0,03%). A suspensão foi ajustada para uma concentração final de 1×10^7 conídios/mL. O grupo controle foi feito utilizando apenas Tween a 0,03%.

Produção e preparo da suspensão de blastosporos dos isolados de fungos

Os blastosporos foram produzidos em meio de cultura líquida contendo 3% de água de maceração de milho (corn steep liquor), 4% de extrato de levedura e

4% de glucose, elaborado de acordo com Carolino e colaboradores (2019). Um volume de 1 mL de suspensão de conídios (1×10^7 /mL) de cada isolado de fungo foi adicionado ao meio líquido (50 mL) em frascos Erlenmeyer de 250 mL e incubado a 27°C, com fotoperíodo 12L/12E, em Shaker Orbital a 150 rpm. Três dias após a inoculação, os blastosporos foram filtrados utilizando filtro *Miracloth* e separados dos fragmentos de hifas presentes na cultura, lavados três vezes com água destilada estéril por meio de centrifugação e contados em câmara de Neubauer. A suspensão foi ajustada para uma concentração final de 1×10^7 conídios/mL.

Os blastosporos, por terem uma porção hidrofílica em sua parede celular, as suspensões foram preparadas de duas formas: (1) blastosporos + água destilada e (2) em uma emulsão (blastosporos + água + Tween a 0,03% + óleo de soja a 5%), para auxiliar na adesão do propágulo ao tegumento hidrofóbico do inseto. Os tratamentos dos grupos controle foram formulados como acima, porém sem o fungo: (1) água destilada e (2) emulsão (água + Tween a 0,03% + óleo vegetal a 5%).

Ensaio de virulência dos isolados fúngicos em Acromyrmex subterraneus subterraneus e Atta sexdens rubropilosa

Foram realizados bioensaios para avaliar a virulência dos fungos em três diferentes formulações em operárias de duas espécies de formigas cortadeiras, *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e *Atta sexdens rubropilosa*. Para cada espécie de formiga, foram estabelecidos três tratamentos, para cada isolado de fungo (*M. anisopliae* e *B. bassiana*), totalizando 6 tratamentos: conídios; blastosporos em água; e blastosporos em emulsão (Figura 1). Ademais, foram realizados 3 tratamentos controle para cada espécie de formiga.

Cada tratamento consistiu em 6 parcelas (6 placas de Petri) contendo cinco formigas em cada parcela, que totalizaram 30 indivíduos por tratamento/repetição. Para cada tratamento, 1 mL de suspensão foi aplicado em discos de papel filtro estéreis que forravam o fundo de placas de Petri (90 x 15 mm). Em seguida, cinco formigas operárias médias foram transferidas para cada placa. Cada tratamento do bioensaio foi repetido três vezes.

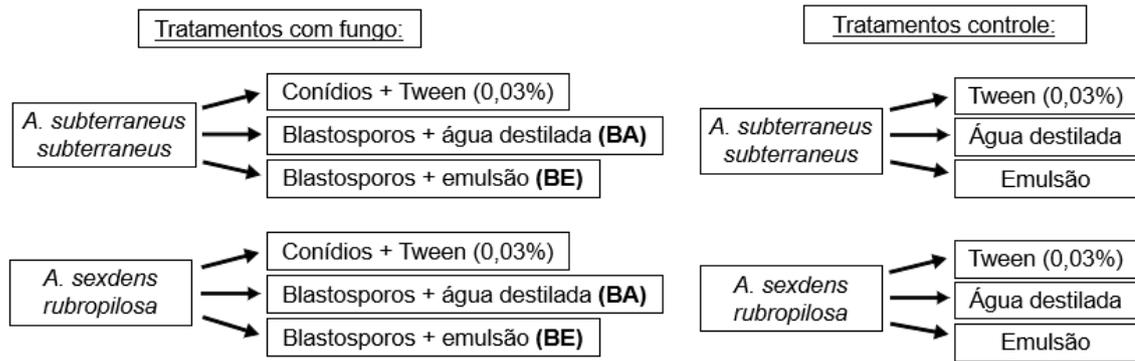


Figura 1. Tratamentos realizados nos bioensaios utilizando os isolados dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e *Atta sexdens rubropilosa*.

As placas de Petri com as formigas foram acondicionadas por 24 horas em câmaras úmidas em temperatura ambiente. Durante este período, as formigas puderam caminhar sobre o papel impregnado. Após esse período, os insetos foram transferidos para novas placas de Petri estéreis e acondicionadas em BOD a 27°C, 70 % UR e fotoperíodo de 12L/12D. A avaliação da sobrevivência foi realizada diariamente durante o período de 10 dias. Foi ofertado às formigas, solução de sacarose a 10% embebida em algodão, oferecidas *ad libitum* durante todo o período de avaliação e o algodão foi trocado a cada 2 dias.

Análise dos dados

As curvas de sobrevivência foram analisadas pelo teste de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de Log-Rank em nível de 5% de probabilidade de erro, utilizando o programa GraphPad Prism version 8.0 for Windows.

RESULTADOS

As análises de sobrevivência das operárias de *Atta sexdens rubropilosa* e *Acromyrmex subterraneus subterraneus* deste estudo revelaram diferenças entre os isolados dos fungos, os tipos de propágulos e as formulações utilizadas nos bioensaios ($P < 0,05$). Foi possível observar que ao final dos ensaios, todos os propágulos se mostraram eficientes pois influenciaram negativamente na sobrevivência das formigas. O menor valor de S_{50} , de três dias, foi observado quando ambas *Acromyrmex* e *Atta* foram expostas a blastosporos de *M. anisopliae* em emulsão; e o maior valor ($S_{50} = 9$) foi observado quando operárias de *Acromyrmex* foram expostas a blastosporos do mesmo fungo, porém formulado em água. As comparações dos valores de S_{50} e porcentagem de sobrevivência de todos os tratamentos podem ser observadas na Tabela 1.

Virulência de Beauveria bassiana

As curvas de sobrevivência de *Acromyrmex* apresentadas na Figura 2, mostraram que os grupos tratados com o fungo *B. bassiana*, foram significativamente diferentes dos controle ($\chi^2 = 438,4$; $df = 5$; $P < 0,0001$). Entre os tratamentos também houve diferença estatística ($\chi^2 = 56,49$; $df = 2$; $P < 0,0001$). Operárias de *Acromyrmex* quando expostas a conídios de *B. bassiana*, apresentaram mortalidade de 100% (S_{50} de 5 dias) (Figura 2). Já nos tratamentos com blastosporos do mesmo fungo, a formulação foi fundamental para a eficiência da infecção. Blastosporos em emulsão foram mais eficientes em causar a infecção das formigas do que blastosporos formulados em água (sobrevivência de 7,77% e 27,7% e S_{50} de 7 e 8 dias, respectivamente).

Tabela 1. Comparações de valores S_{50} e proporção de sobrevivência dos indivíduos de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e *Atta sexdens rubropilosa* nos tratamentos com conídios, blastosporos em água (BA) e blastosporos emulsão (BE) dos isolados de *Beauveria bassiana* e de *Metarhizium anisopliae*

		Conídios			Blastosporos em água (BA)			Blastosporos emulsão (BE)		
		<i>B. bassiana</i>	<i>M. anisopliae</i>	Controle	<i>B. bassiana</i>	<i>M. anisopliae</i>	Controle	<i>B. bassiana</i>	<i>M. anisopliae</i>	Controle
<i>Acromyrmex</i>	Valor de S_{50}	5	4	nd	8	9	nd	7	3	nd
	% sobrevivência	0%	4,54%	91,11%	27,77%	41,08%	93,18%	7,77	6,66%	80,95
<i>Atta</i>	Valor de S_{50}	5	4	nd	5	3,5	nd	5	3	nd
	% sobrevivência	1,12%	4,44%	88%	3,33%	2,22%	91,1%	3,37%	0%	72,2%

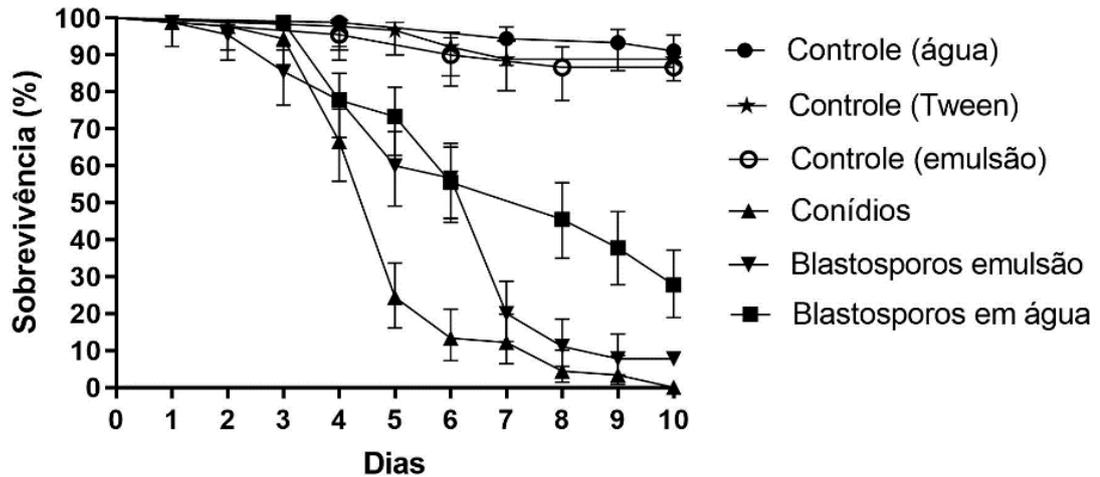


Figura 2. Sobrevivência de operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* expostas a conídios, blastosporos em água e blastosporos em emulsão do fungo *Beauveria bassiana*.

Ainda em relação à virulência de *B. bassiana*, os resultados dos tratamentos em *Atta* são ilustrados na Figura 3. As comparações das curvas demonstraram que os grupos tratados com fungo foram significativamente diferentes dos controles ($\chi^2= 495$; $df = 5$; $P < 0,0001$). Entre os tratamentos, também houveram diferenças estatísticas ($\chi^2= 23,31$; $df= 2$; $P < 0,0001$). As operárias de *Atta* expostas a conídios apresentaram sobrevivência de 1,12% e S_{50} de 5 dias ao final dos 10 dias de avaliação (Tabela 1). Blastosporos também foram eficientes, porém quando formulado em água, as formigas apresentaram sobrevivência de 3,33% e S_{50} de 5 dias. Já na formulação em emulsão, a sobrevivência foi de 3,37% e S_{50} de 5 dias.

Virulência de *Metarhizium anisopliae*

O fungo *Metarhizium anisopliae* também foi eficiente em reduzir a sobrevivência de operárias de *Acromyrmex* (Figura 4). As comparações das curvas demonstraram que os grupos tratados foram significativamente diferentes dos controle ($\chi^2= 493,1$; $df = 5$; $P < 0,0001$). Diferenças também foram observadas entre os tratamentos ($\chi^2= 80, 42$; $df= 2$; $P < 0,0001$). Blastosporos em água (BA) apresentaram a maior taxa de sobrevivência e S_{50} observada em todo o bioensaio (41,08%, S_{50} de 9 dias). Os dois outros tratamentos foram bem mais eficientes.

Formigas expostas a conídios apresentaram S_{50} de 4 dias e 4,54% de sobrevivência. Já no tratamento com BE, a presença do óleo favoreceu a velocidade da infecção fúngica, pois o valor de S_{50} decaiu para 3 dias, com sobrevivência de 6,66% das operárias.

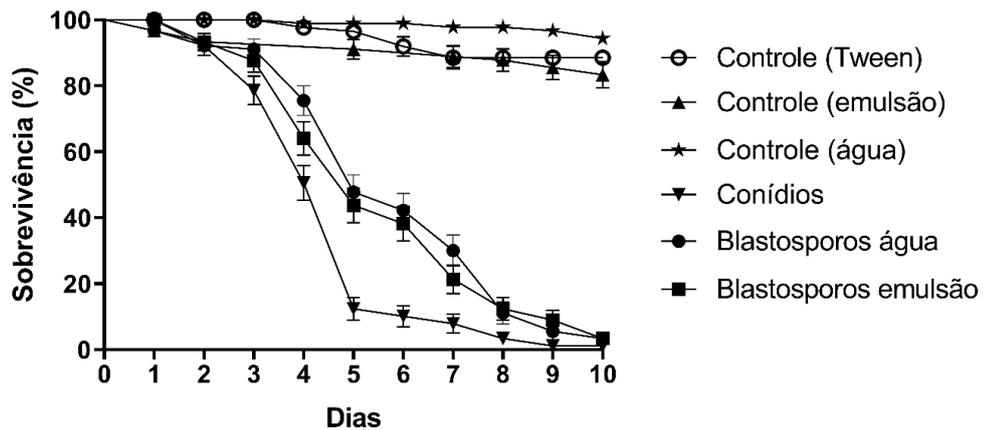


Figura 3. Sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* expostas a conídios, blastosporos em água e blastosporos em emulsão do fungo *Beauveria bassiana*.

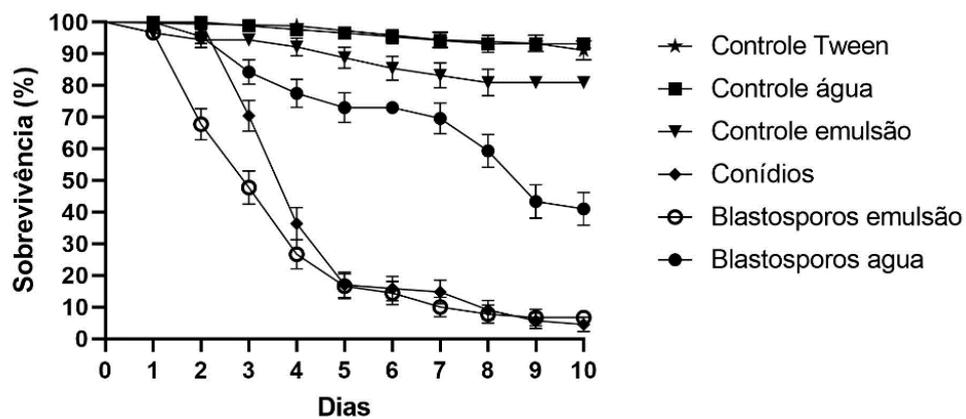


Figura 4. Sobrevivência de operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* expostas a conídios, blastosporos em água e blastosporos em emulsão do fungo *Metarhizium anisopliae*.

Quando operárias de *Atta* foram expostas a *M. anisopliae* houve maior efeito sobre a mortalidade de operárias do que o observado em *Acromyrmex* (Figura 5). As comparações das curvas demonstraram que os grupos tratados foram significativamente diferentes dos controle ($\chi^2= 493,0$; $df = 5$; $P <0,0001$). Os tratamentos com fungo tiveram similaridade na capacidade de reduzir a sobrevivência, entretanto, mostraram diferenças entre si ($\chi^2= 8, 618$; $df= 2$; $P= 0,0134$). Os três propágulos, conídios, BA e BE apresentaram S_{50} de 4, 3,5 e 3 dias e sobrevivência de 4,44%, 2,22% e 0%, respectivamente.

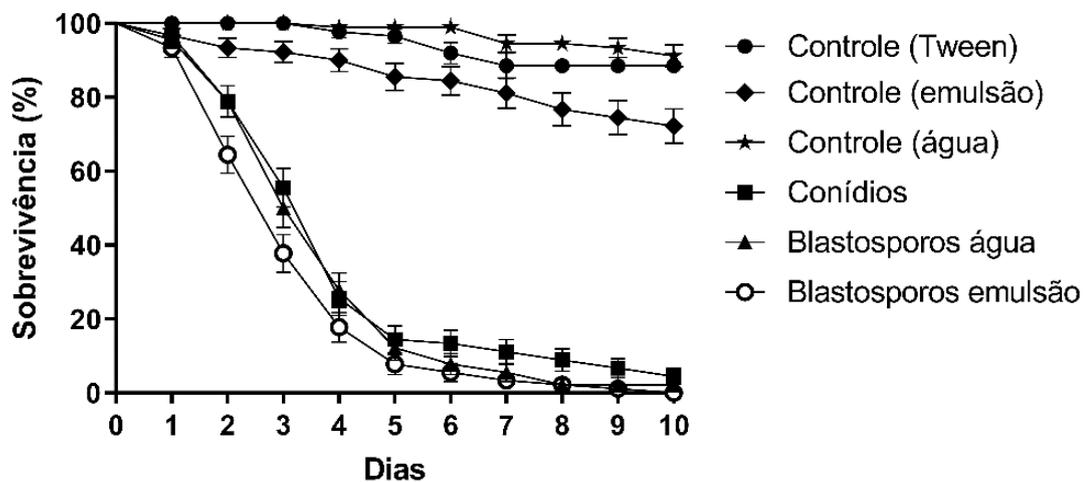


Figura 5. Sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* expostas a conídios, blastosporos em água e blastosporos em emulsão do fungo *Metarhizium anisopliae*.

Comparações entre os propágulos e suas formulações

Conídios

Quando comparado a infecção de operárias por conídios de ambos os fungos nas duas espécies de formigas cortadeiras, observa-se que em todos os tratamentos, os conídios apresentaram considerável efeito negativo na sobrevivência dos indivíduos (Figura 6). As comparações das curvas de sobrevivência demonstraram que os tratamentos foram significativamente diferentes dos controles ($\chi^2= 408,0$ ($df = 5$; $P <0,0001$)). No tratamento com conídios

de *B. bassiana*, todas as operárias de *Acromyrmex* morreram ao longo dos 10 dias de avaliação, com S_{50} de 5 dias. Já no tratamento de *Atta* com o mesmo isolado, 1,12% das operárias sobreviveram, também com S_{50} de 5 dias. Nos tratamentos com *M. anisopliae*, a sobrevivência para *Acromyrmex* foi de 4,54%, com S_{50} de 4 dias. Valores estes próximos dos observados para indivíduos de *Atta* (4,44% e S_{50} de 5 dias).

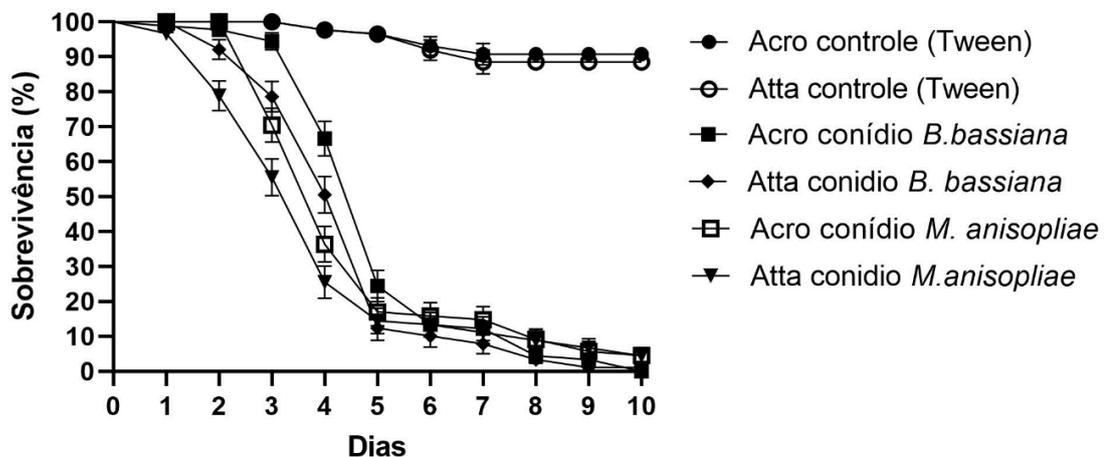


Figura 6. Sobrevivência de operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e *Atta sexdens rubropilosa* expostas a conídios de *Beauveria bassiana* e de *Metarhizium anisopliae*.

Blastosporos em água (BA)

A comparação dos tratamentos com blastosporos formulados em água (BA) de ambos os fungos demonstrou resultados bastante distintos para as duas espécies de formigas estudadas (Figura 7). As comparações das curvas de sobrevivência demonstraram que os grupos tratados foram significativamente diferentes dos controle ($\chi^2 = 445,6$; $df = 5$; $P < 0,0001$), e diferenças também foram observadas quando comparando somente os tratamentos fúngicos ($\chi^2 = 154,4$; $df = 3$; $P < 0,0001$). Para operárias de *Acromyrmex* do tratamento BA de *B. bassiana*, a sobrevivência foi de 27,77%, com S_{50} de 8 dias. Operárias de *Atta* tratadas com o mesmo fungo e formulação apresentaram sobrevivência consideravelmente menor, de 3,33% (S_{50} de 5 dias).

Assim como para *B. bassiana*, nos tratamentos com BA realizados com *M. anisopliae* a mortalidade de *Atta* também foi consideravelmente maior do que de *Acromyrmex*. Operárias de *Acromyrmex* tratadas com BA de *M. anisopliae*, tiveram sobrevivência de 41,08%, enquanto operárias de *Atta* no mesmo tratamento tiveram sobrevivência de 2,22%, com S_{50} de 9 e 3,5 dias, respectivamente.

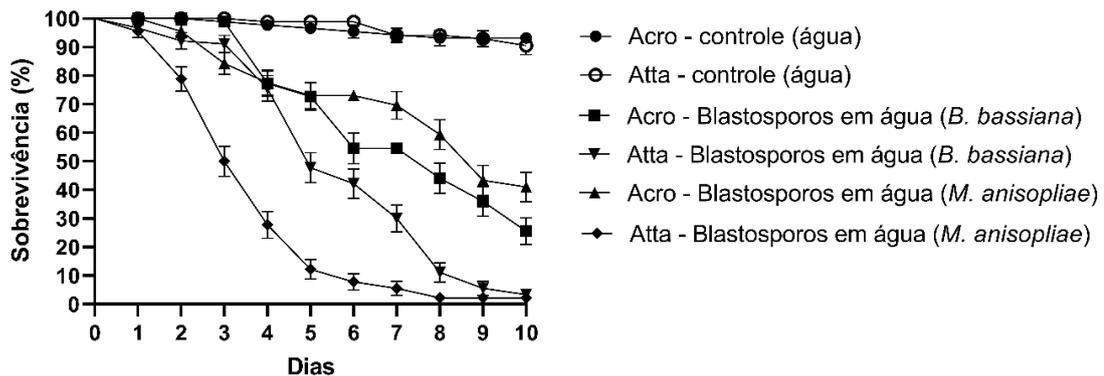


Figura 7. Sobrevivência de operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e *Atta sexdens rubropilosa* expostas a blastosporos em água (BA) dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*.

Blastosporos em emulsão

A comparação dos tratamentos de ambas as espécies de formigas com a formulação de blastosporos em emulsão (BE) de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, apresentou resultados distintos dos observados nos tratamentos com blastosporos formulados em água (Figura 8). As comparações das curvas de sobrevivência demonstraram que os grupos tratados foram significativamente diferentes dos controle ($\chi^2= 410,1$ (df = 5; $P < 0,0001$) e o teste de Log-Rank mostrou diferenças entre os tratamentos com fungo ($\chi^2= 70,78$; df= 3; $P < 0,0001$). Foi possível observar que blastosporos de *B. bassiana* e *M. anisopliae* foram mais virulentos para *Atta* (sobrevivência de 3,37% e 0% respectivamente), do que para *Acromyrmex* (*B. bassiana* = 7,77%; *M. anisopliae* = 6,66%).

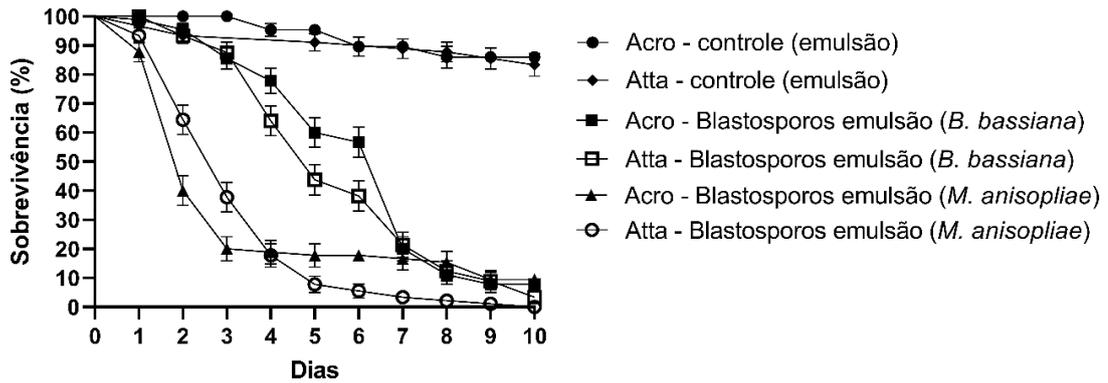


Figura 8. Sobrevivência de operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e *Atta sexdens rubropilosa* expostas a blastosporos em emulsão dos fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*.

DISCUSSÃO

Esse estudo mostra pela primeira vez a comparação da susceptibilidade de formigas cortadeiras *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e *Atta sexdens rubropilosa* a conídios e blastosporos de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*. Os resultados mostram que o tipo de formulação para blastosporos tem caráter importante na sua utilização no controle microbiano de formigas cortadeiras. Blastosporos têm despertado grande interesse em escala industrial, principalmente pela rápida produção em cultura líquida (Jackson et al., 2010), diferente de conídios que apesar de sua eficiência cientificamente comprovada, precisam de um período em torno de 10 a 14 dias para produzir uma quantidade suficiente de conídio em substrato sólido e semissólido (Mascarin et al., 2018).

Historicamente, o potencial de fungos entomopatogênicos no controle biológico, teve seus estudos iniciados no século XIX com Agostino Bassi, que direcionou seu trabalho na formulação e aplicação do entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Mazzarello et al., 2013). Desde então, fungos se apresentam como uma das alternativas mais vantajosas no controle biológico de pragas, já que são

capazes de infectar quase todas as ordens, como Hemiptera, Diptera, Coleoptera, Lepidoptera, Orthoptera e Hymenoptera (Maina et al., 2018).

As formigas cortadeiras são insetos de difícil controle devido às suas características biológicas e ecológicas. O fato das formigas cortadeiras constituírem uma eussociedade e ter mecanismos de defesa bastante elaborados e diversificados demanda que os agentes de controle sejam comprovadamente eficientes para causar efeito negativo na colônia.

Os fungos também utilizam estratégias que favoreçam o seu processo infectivo. Após a germinação do conídio no tegumento dos insetos e colonização do hospedeiro, os fungos liberam na hemolinfa uma outra estrutura celular chamada de blastosporos. Essas células apresentam característica leveduriforme e é possível ser induzida em ambiente artificial, usando cultura líquida e condições adequadas (Jackson et al., 1997; Tartar et al., 2005; Carolino et al., 2019). Com característica hidrofílica, a eficiência dos blastosporos pode depender de métodos de aplicação que favoreçam a interação com o tegumento do inseto.

No presente estudo, pela primeira vez, foi verificado que a formulação teve influência na patogenicidade de blastosporos contra as formigas. A maior taxa de sobrevivência de todos os bioensaios foi obtida quando operárias de *Acromyrmex* foram tratadas com blastosporos formulados em água. Já operárias de *Atta* nestas mesmas condições apresentaram resultados opostos, com sobrevivência próxima a 0%. As diferenças observadas nestes tratamentos para as duas espécies de formigas sugerem que a presença do biofilme bacteriano de *Pseudonocardia* no tegumento das operárias de *Acromyrmex*, desempenhou papel fundamental na susceptibilidade à infecção fúngica. A ausência ou redução do biofilme visível em *Atta* (Fernandez-Marin, et al 2009) pode ter favorecido a colonização dos fungos, provocando a mortalidade. Mattoso e colaboradores (2011) mostraram que a remoção do biofilme bacteriano em *A. subterraneus subterraneus* tornou as operárias mais suscetíveis ao fungo *M. anisopliae*, indicando que a bactéria representa papel fundamental de proteção a patógenos.

Os resultados discutidos acima, com os blastosporos formulados em água (BA), foram diferentes dos resultados obtidos quando blastosporos foram usados em emulsão (BE). Todos os tratamentos com BE foram bastante eficientes. Entretanto, o fungo *M. anisopliae* se apresentou mais eficiente em causar a mortalidade das formigas do que *B. bassiana*, uma vez que tanto para *Acromyrmex*

quanto *Atta*, os valores de S_{50} foram menores nos tratamentos com *M. anisopliae* do que nos tratamentos com *B. bassiana*. Já foi reportado que blastosporos de *Metarhizium* produzem uma grande quantidade de mucilagem, um composto que pode ser derivado da degradação do beta-glucano insolúvel e que tem função de auxiliar na adesão, facilitando a fixação do entomopatógeno no tegumento de insetos (Boucias & Pendland, 1991; Alkhaibari et al., 2016). A produção de mucilagem ainda não foi verificada em *Beauveria*. Este fato precisa ser melhor estudado para elucidar as razões da formulação oleosa favorecer mais blastosporos de *Metarhizium* do que *Beauveria* no processo de infecção de formigas.

As diferenças na sobrevivência de *Acromyrmex* observadas nos tratamentos com blastosporos em água e em emulsão indicam que a formulação teve papel chave na capacidade infectiva do propágulo, *i.e.*, mesmo com a presença do biofilme de *Pseudonocardia*, a emulsão pode ter favorecido a interação dos blastosporos com a cutícula do inseto. Para alguns insetos, blastosporos foram considerados ter maior capacidade infectiva do que conídios (Alkhaibari et al., 2016; Bernardo et al., 2018; Carolino et al., 2019). A alta capacidade de virulência está associada ao fato de blastosporos germinar mais rápido e possuir parede celular fina (Alkhaibari et al., 2016). Neste trabalho, a parede celular mais fina dos blastosporos pode ter permitido que as substâncias liberadas pela *Pseudonocardia* tenham reduzido a capacidade da infecção fúngica de blastosporos em *Acromyrmex*, quando formulados em água. A presença do óleo na formulação da emulsão pode ter desempenhado papel protetor contra as substâncias da *Pseudonocardia*.

Conídios naturalmente diferem em características dos blastosporos, pois apresentam camada externa mais espessa e forte ligação com superfícies hidrofóbicas, o que facilita a interação com o tegumento de insetos (Boucias & Pendland, 1991; Holder & Keyhani, 2005; Holder et al., 2007). Outra vantagem dos conídios quanto à utilização no campo, é que são capazes de tolerar condições ambientais adversas, pois produzem metabólitos capazes de suportar os estresses ambientais (Boucias & Pendland, 1991), fato não observado em blastosporos (Kim et al., 2013).

Neste trabalho, os tratamentos com conídios apresentaram grande eficiência na mortalidade dos insetos. Nos tratamentos com ambos os fungos há

maior taxa de sobrevivência <5% das operárias de *Acromyrmex* e *Atta*. Outros estudos também mostraram a virulência de conídios de fungos entomopatogênicos para operárias de *Atta cephalotes* (Lopez & Orduz, 2003), *Atta sexdens rubropilosa* (Loureiro & Monteiro, 2005; Dornelas et al., 2017), *Acromyrmex ambiguus*, *Acromyrmex crassispinus* e *Acromyrmex lundii* (Goffre et al., 2018; Folgarait et al., 2020). As formigas foram imersas na suspensão fúngica ou tiveram o seu tegumento pulverizado/aplicado diretamente com a suspensão fúngica como foi realizado por Castrillo e colaboradores (2010). Diferentemente, neste trabalho, as formigas tiveram o contato indireto com papel impregnado com fungo, mostrando que as formulações obtidas aqui são promissoras, pois a metodologia foi menos evasiva do que nos trabalhos citados, mas ainda assim apresentando altos índices de mortalidade das formigas.

As opções para controle de colônia de formigas cortadeiras são limitadas. O método mais utilizado é a oferta de iscas químicas (Britto et al., 2016). O controle biológico segue os mesmos princípios de metodologia, entretanto, utilizando inseticidas biológicos no lugar de inseticidas químicos. Iscas biológicas utilizando laranja como atrativo e os fungos *M. anisopliae* e *Trichoderma viride* como agentes infectivos foram capazes de reduzir a atividade de forrageamento no campo de *Atta cephalotes* por pelo menos 2 meses após a aplicação (Lopes & Orduz, 2003). Ensaio com outros gêneros de formiga, por exemplo *Solenopsis invicta*, mostraram que a encapsulação de *Metarhizium* em isca gelatinosa foi promissora, já que sua aplicação no laboratório foi capaz de infectar mais de 80% das operárias (Qiu et al., 2019). Todos esses estudos utilizaram conídios ou propágulos com estruturas resistentes em sua formulação, pois em situação de campo é importante pensar na capacidade do microrganismo em se manter viável em ambientes hostis para causar a infecção em seus alvos (Holder et al., 2007).

Frente à ameaça de patógenos, as linhas de defesa das formigas cortadeiras podem variar entre os gêneros. Espécies do gênero *Atta* não apresentam o biofilme protetor de *Pseudonocardia* tão desenvolvido como observado no gênero *Acromyrmex*; contudo, espécies de *Atta* possuem glândulas metapleurais bem desenvolvidas que produzem compostos antifúngicos (Fernandez-Marin et al., 2009). *Acromyrmex* apresenta relação inversa do observado para *Atta*, com menor desenvolvimento de glândulas metapleurais. A glândula metapleural produz secreções antimicrobianas que protegem contra

diversos microrganismos patógenos, inclusive *Metarhizium* e *Beauveria* (Bot et al.,2002; Guarda & Lutinski, 2020). Apesar da comprovada função destes compostos em inibir microrganismos maléficos para a colônia, em todos os tratamentos com *Atta* realizados neste trabalho, os propágulos (conídios ou blastosporos) foram bastante eficientes em causar elevada mortalidade dos indivíduos. Porém, em *Acromyrmex* a sobrevivência foi maior quando expostos a blastosporos em água de *B. bassiana*.

CONCLUSÕES

Este é o primeiro registro de utilização de blastosporos de fungos entomopatogênicos contra formigas cortadeiras. Foi possível observar que a formulação e o tipo de propágulo tiveram papéis fundamentais para o sucesso da infecção. Ao final dos dez dias de avaliação, conídios e blastosporos em emulsão foram bastante eficazes em reduzir a sobrevivência das duas espécies de formigas. Porém, quando os blastosporos foram formulados em água, foi observado considerável sobrevivência de *Acromyrmex*. O inverso sendo observado para *Atta*, que apresentou alta mortalidade.

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que ambos os fungos, *B. bassiana* e *M. anisopliae* demonstraram elevado potencial infectivo para ambas as espécies de formigas cortadeiras utilizadas. Este trabalho mostrou que as espécies de *Atta* e *Acromyrmex* apresentam singularidades quanto à infecção fúngica. A ausência do biofilme bacteriano de *Pseudonocardia* nas operárias de *Atta* pode ter propiciado maior susceptibilidade à infecção fúngica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alkhaibari, A.M., Carolino, A.T., Yavasoglu, S.I., Maffei, T., Mattoso, T.C., Bull, J.C., Samuels, R.I., Butt, T.M. (2016) *Metarhizium brunneum* blastospore pathogenesis in *Aedes aegypti* larvae: attack on several fronts accelerates mortality. *Plos Pathog.* 12(7):1-19.
- Angelone, S., Bidochka, M.J. (2018) Diversity and abundance of entomopathogenic fungi at ant colonies. *J Invertebr Pathol.* 156:73-76. DOI:10.1016/j.jip.2018.07.009
- Bot, A.N.M., Ortius-Lechner, D., Finster, K., Maile, R., Boomsma, J.J. (2002) Variable sensitivity of fungi and bacteria to compounds produced by the metapleural glands of leaf-cutting ants. *Insectes Soc.* 49:363–370. DOI: 10.1007/PL00012660.
- Boucias, D., Pedland, J. (1991) Attachment of mycopathogens to cuticle. The initial events of mycoses in arthropod hosts. In: Cole G., Hoch H., (org) *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plant and Animals*. 1. ed. Boston, MA, USA: Springer, p.101–127.
- Britto, J.S., Forti, L.C., Oliveira, M.A., Zanetti, R., Wilcken, C.F., Zanuncio, J.C., Loeck, A.E., Caldato, N., Nagamoto, N.S., Lemes, P.G., Camargo, R.S., (2016) Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. *Int. J. Res. Environ. Stud.* 3:11-92.
- Carolino, A.T., Gomes, S.A., Teodoro, T.B.P., Mattoso, T.C., Samuels, R.I. (2019) *Aedes aegypti* pupae are highly susceptible to infection by *Metarhizium anisopliae* blastospores. *J Pure Appl Microbiol.* 13:1629-1634.
- Castilho, A., Conteiro, M., Fraga, M.E., Aguiar-Menezes, E.L., Rosa, C.A.R. (2010) Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* patogênicos a soldados de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa* em condições de laboratório. *Cienc. Rural.* 40(6):1243-1249. DOI:10.1590/S0103-84782010005000100.
- Charnley, A. (2003) Fungal pathogens of insects: cuticle degrading enzymes and toxins. *Adv Bot Res.* 40:241-321. DOI:10.1016/S0065-2296(05)40006-3.

- Cremer, S., Armitage, S.A.O., Schmid-Hempel, P. (2007) Social immunity. *Curr Biol.* 17:693–702.
- Della Lucia, T.M.C. (1993) *As formigas cortadeiras*. 1. Ed. Editora Folha de Viçosa, Viçosa: 262p.
- Della Lucia, T.M.C., Gandra, L.C., Guedes, R.N.C. (2014) Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. *Pest Manag Sci.* 70:14–23. DOI:10.1002/ps.3660.
- Dornelas, A.S.P., Sarmiento, R.A., Pedro-Neto, M., Silva, D.G., Santos, G.R., Nascimento, M.O., Oliveira, C.A., Souza, D.J. (2017) Susceptibility of *Atta sexdens* worker ants treated with the immunosuppressant Sandimmun Neoral to *Metarhizium anisopliae*. *Pesqui Agropecu Bras.* 52(2):133-136. DOI:10.1590/s0100-204x2017000200008.
- Fernández-Marín, H., Zimmerman, J.K., Nash, D., Boomsma, J., Wcislo, W. (2009) Reduced biological control and enhanced chemical pest management in the evolution of fungus farming ants. *Proc Biol Sci.* 276:2263-2269. 10.1098/rspb.2009.0184.
- Folgarait, P.J., Goffré, D., Osorio, A.G. (2020) *Beauveria bassiana* for the control of leafcutter ants: strain and host differences. *Biocontrol Sci Technol.* 30:(9):996-1005. DOI: 10.1080/09583157.2020.1772199
- Goffré, D., Folgarait, P.J. (2015) *Purpureocillium lilacinum*, potential agent for biological control of the leaf-cutting ant *Acromyrmex lundii*. *J Invertebr Pathol.* 130:107–115. DOI:10.1016/j.jip.2015.07.008.
- Goffré, D., Cavallo, E.C., Cavalitto, S.F., Folgarait, P.J. (2018) Selection and yield optimisation of a *Beauveria bassiana* isolate for the biological control of leaf cutter ants. *Biocontrol Sci Technol.* 28(7):672-687. DOI:10.1080/09583157.2018.1479730.
- Guarda, C., Lutinski, J. (2020) Glandular secretions of ants (Hymenoptera: Formicidae): A review on extraction, chemical characterization and antibiotic potential. *Sociobiology.* 67(1):13-25. DOI:10.13102/sociobiology.v67i1.4277.
- Holder, D.J., Keyhani, N.O. (2005) Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria* (Cordyceps) *bassiana* to substrata. *Appl Environ Microbiol.* 71(9):5260-5266. DOI: 10.1128/AEM.71.9.5260-5266.2005.

- Holder, D.J., Kirkland, B.H., Lewis, M.W., Keyhani, N.O. (2007) Surface characteristics of the entomopathogenic fungus *Beauveria* (Cordyceps) *bassiana*. *Microbiology*. 153:3448-3457. DOI:10.1099/mic.0.2007/008524-0.
- Hughes, W.O.H., Thomsen, L., Eilenberg, J., Boomsma, J.J. (2004) Diversity of entomopathogenic fungi near leaf-cutting ant nests in a neotropical forest, with particular reference to *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *J Invertebr Pathol*. 85(1):46-53. DOI:10.1016/j.jip.2003.12.005.
- Jackson, M.A., Dunlap, C.A., Jaronski, S.T. (2010) Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *BioControl*. 55:129–145. DOI:10.1007/s10526-009-9240-y.
- Jackson, M.A., McGuire, M.R., Lacey, L.A., Wraight, S.P. (1997) Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycol Res*. 101(1):35-41 DOI:10.1017/S0953756296002067.
- Kim, J.S., Je, Y.H., Skinner, M., Parker, B.L. (2013) An oil-based formulation of *Isaria fumosorosea* blastospores for management of greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). *Pest Manag Sci*. 69(5):576-81. DOI: 10.1002/ps.3497.
- Lacey, L.A., Frutos, R., Kaya, H.K., Vails, P. (2001) Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? *Biol Control*. 21:230–248.
- Lopes, J.F.S., Ribeiro, L.F., Brugger, M.S., Camargo, R.S., Caldato, N., Forti, L.C. (2011) Internal architecture and population size of *Acromyrmex subterraneus molestans* (Hymenoptera, Formicidae) nests: Comparison between a rural and an urban area. *Sociobiology*. 58(3):593-605.
- Lopez, E., Orduz, S. (2003) *Metarhizium anisopliae* and *Trichoderma viride* for control of nests of the fungus-growing ant, *Atta cephalotes*. *Biol Control*. 27(2):194-200. DOI:10.1016/S1049-9644(03)00005-7.
- Loureiro, E., Monteiro, A. (2005) Pathogenicity of isolates of three entomopathogenic fungi against soldiers of *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera : Formicidae). *Revista Árvore*. 29:553-561.
- Maina, U.M., Galadima, I.B., Gambo, F.M., Zakaria, D. (2018) A review on the use of entomopathogenic fungi in the management of insect pests of field crops. *J Entomol Zool Stud*. 6(1):27-32.

- Mascarin, G.M., Lopes, R.B., Delalibera Í.Jr., Fernandes, E.K.K., Luz, C., Faria, M. (2018) Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. *J Invertebr Pathol.* 165:46-53. DOI: 10.1016/j.jip.2018.01.001.
- Mattoso, T.C., Moreira, D.D.O., Samuels, R.I. (2011) Symbiotic bacteria on the cuticle of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* protect workers from attack by entomopathogenic fungi. *Biol Lett.* 8:461-474. DOI:10.1098/rsbl.2011.0963.
- Mazzarello, P., Garbarino, C., Cani, V. (2013) *Bassi, Agostino*. John Wiley & Sons. 2013:1-6. DOI:10.1002/9780470015902.a0025074.
- Miranpuri, G.S., Khachatourians, G.G. (1990) Larvicidal activity of blastospores and conidiospores of *Beauveria bassiana* (strain GK 2016) against age groups of *Aedes aegypti*. *Vet Parasitol.* 37(2):155-162
- Qiu, H-L., Fox, E.G.P., Qin, C-S., Zhao, D-Y., Yang, H., Xu, J-Z. (2019) Microcapsuled entomopathogenic fungus against fire ants, *Solenopsis invicta*. *Biol Control.* 134:141-149. DOI:10.1016/j.biocontrol.2019.03.018.
- Ribeiro, M.M.R., Amaral, K.D., Seide, V.E., Souza, B.M.R., Della Lucia, T.M.C., Kasuya, M.C.M., Souza, D.J. (2012) Diversity of fungi associated with *Atta bisphaerica* (Hymenoptera: Formicidae): The activity of *Aspergillus ochraceus* and *Beauveria bassiana*. *Psyche*. Volume 2012. Article ID 389806. DOI:10.1155/2012/389806.
- Samuels, R.I., Paula, A., Carolino, A., Gomes, S., Paula, C., Cypriano, M., Silva, L., Ribeiro, A., Bastos, J., Peres, C. (2016) Entomopathogenic organisms: conceptual advances and real-world applications for mosquito biological control. *Open access insect physiol.* 6:25-31 DOI:10.2147/OAIP.S68850.
- Shik, J.Z., Rytter, W., Arnan, X., Michelsen, A. (2018) Disentangling nutritional pathways linking leafcutter ants and their co-evolved fungal symbionts using stable isotopes. *Ecology.* 99(9):1999–2009. DOI:10.1002/ecy.2431
- Soares, W.L., Porto, M.F.S. (2009) Estimating the social cost of pesticide use: An assessment from acute poisoning in Brazil. *Ecol. Econ.* 68:2721–2728. DOI:10.1016/j.ecolecon.2009.05.008.
- Tartar, A., Shapiro, A.M., Scharf, D.W., Boucias, D.G. (2005) Differential expression of chitin synthase (CHS) and glucan synthase (FKS) genes correlates with the

formation of a modified, thinner cell wall in in vivo-produced *Beauveria bassiana* cells. *Mycopathologia*. 160:303–314.

Zanetti, R., Zanuncio, J.C., Santos, J.C., Silva, W.L.P., Ribeiro, G.T., Lemes, P.G. (2014) An overview of integrated management of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in brazilian forest plantations. *Forests*. 5:439-454. DOI:10.3390/f5030439

3.2. PRODUÇÃO DE MICROESCLERÓCIOS DE *Escovopsis weberi* E SEUS EFEITOS EM *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

RESUMO

Formigas cortadeiras são pragas de diversas culturas agrícolas e florestais. Formas alternativas de controle desses insetos necessitam ser desenvolvidas devido á problemática envolvendo a utilização de inseticidas químicos sintéticos. Nas colônias dessas formigas, a manutenção da simbiose entre os insetos e seu fungo mutualístico, *Leucoagaricus gongylophorus*, é vital para a sobrevivência de ambos os organismos. Porém, o fungo parasita especialista do gênero *Escovopsis* é uma ameaça a esta simbiose e pode causar danos severos ao jardim de fungos. Esclerócios são estruturas fúngicas resistentes, frequentemente encontradas na natureza. Essas estruturas têm sido estudadas para uso no controle biológico de pragas, mas a produção de esclerócios ainda não havia sido documentada para *Escovopsis*. O objetivo deste estudo foi induzir *Escovopsis weberi* a produzir microesclerócios em cultura líquida. Além disso, foi avaliada a aceitação e eficácia de microesclerócios e conídios de *E. weberi*, contra minicolônias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* na forma de iscas. Iscas com microesclerócios ou com

conídios apresentaram diferentes taxas de aceitação pelas operárias. Iscas com microesclerócios foram mais atrativas para as operárias do que as iscas com conídios. Todas as iscas contendo *Escovopsis* afetaram a atividade de forrageamento, mas apenas os tratamentos com ambos os propágulos viáveis aumentaram a quantidade de descarte de lixo, com um impacto negativo significativo na biomassa do jardim de fungos. Os resultados forneceram informações adicionais sobre o reconhecimento de *Escovopsis* por operárias e diferenças entre a dinâmica de aplicação de iscas com conídios ou microesclerócios em colônias de formigas cortadeiras, com novas perspectivas para o controle biológico dessas importantes pragas.

Palavras-chave: Cultura líquida, Micoparasita, Controle microbiano, Isca atrativa, Formicidae, Hypocreales

ABSTRACT

Leaf-cutting ants are pests of several agricultural crops and are important forestry pests. Alternative control methods for these insects need to be developed due to the problems involving the use of synthetic chemical insecticides. In the colonies of these ants, the maintenance of the symbiosis between the insects and their mutualistic fungus, *Leucoagaricus gongylophorus*, is vital for the survival of both organisms. However, the specialist parasitic fungus of the genus *Escovopsis* is a threat to this symbiosis and can cause severe damage to the fungus garden. Sclerotia are resistant fungal structures often found in nature. These structures have been studied for use in biological pest control, but sclerotia production had not yet been documented for *Escovopsis*. The objective of this study was to induce *Escovopsis weberi* to produce microsclerotia in liquid culture and then test the acceptability and efficacy of *E. weberi* microsclerotia and conidia against mini colonies of *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. Baits with microsclerotia or conidia showed different acceptance rates by the workers. Baits with microsclerotia

were more attractive to the workers than baits with conidia. All baits containing *Escovopsis* affected foraging activity, but only treatments with both viable propagules increased the amount of litter disposed, with a significant negative impact on the biomass of the fungus garden. The results provided additional information on the recognition of *Escovopsis* by workers and differences between the dynamics of applying baits with conidia or microsclerotia to leafcutter ant colonies, with new perspectives on the biological control of these important pests.

Keywords: liquid culture, mycoparasite, pest control, baits, Formicidae, Hypocreales

INTRODUÇÃO

As formigas cortadeiras (Attini: Formicidae) são importantes pragas em muitos agrossistemas na região Neotropical (Montoya-Lerma et al., 2012). Elas causam sérios danos aos sistemas agrícolas, florestais e pastoris devido à grande quantidade de folhas frescas que cortam e carregam para o ninho a fim de cultivar o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* (Möller) Singer (Agaricales: Basidiomycota). Nessa simbiose, as formigas fornecem abrigo aos fungos, recursos alimentares e proteção contra parasitas. Em troca, *L. gongylophorus* fornece estruturas hifais especializadas, chamadas gongilídias, que estocam nutrientes e é o principal recurso alimentar para formas imaturas e rainha e suplementar para operárias (Quinlan & Cherrett, 1979; Shik et al., 2018). Além disso, as gongilídias fornecem às formigas enzimas úteis para degradar o material vegetal (Erthal et al. 2009; Viguera et al., 2017; Shik et al., 2018).

Isclas químicas continuam sendo o método de controle mais comumente usado contra formigas cortadeiras (Zanetti et al., 2014). No entanto, tais métodos causam impactos negativos na saúde humana e no ambiente (Soares & Porto, 2009). Além disso, o uso de inseticidas químicos pode promover a resistência dos

insetos e afetar organismos não-alvos (Flury, 1996; Cocco, 2002; Laabs et al., 2002).

O uso de agentes biológicos é uma alternativa promissora e um método ambientalmente seguro para o controle de formigas cortadeiras (Zanetti et al., 2014). *Escovopsis* spp. (Ascomycota: Hypocreales) é um fungo parasita específico de *L. gongylophorus*, com potencial de ser empregado em programas de controle biológico de formigas cortadeiras (Currie et al., 1999; Folgarait et al., 2011; Haifig et al., 2017). Nesse parasitismo, a degradação do *L. gongylophorus* é causada pelo contato direto das hifas de *Escovopsis*, que com o auxílio de protuberâncias hifais em forma de gancho, consomem nutrientes das células vivas de *L. gongylophorus*, levando à morte do hospedeiro e conseqüentemente o colapso da colônia, se as operárias não conseguirem controlar o parasitismo (Silva et al., 2006; Taerum et al., 2007; Marfetan et al., 2015; Varanda-Haifig et al., 2017).

Devido às ameaças de microrganismos, as formigas desenvolveram estratégias para prevenir infecções na colônia. Elas possuem glândulas metapleurais que produzem secreções antimicrobianas (Bot et al., 2002; Fernandez-Marín et al., 2006;). Além disso, elas constantemente realizam atividades de limpeza do jardim de fungos chamadas de *weeding* (Bot et al., 2001; Currie e Stuart 2001). *Pseudonocardia*, uma bactéria simbiote presente no tegumento de algumas espécies de formigas operárias, produz antibióticos que reduzem as chances de infecção (Folgarait et al. 2011; Mattoso et al., 2011; Samuels et al., 2013). Mesmo assim, apesar de toda a estratégia adotada para preservar a saúde do formigueiro, a presença de *Escovopsis* ainda é frequente em colônias de formigas cortadeiras (Currie, 2001a).

Em ambiente natural, diversos fungos podem produzir estruturas chamadas esclerócios, a fim de sobreviver a condições adversas (Smith et al., 2014). Esclerócios são agregados densos de hifas, resistentes a condições desfavoráveis, como ausência do hospedeiro ou dessecação. Essas estruturas são viáveis por um período maior de tempo quando comparadas aos conídios e germinam quando as condições ambientais são favoráveis (Coley-Smith & Cooke, 1971). Na natureza, os esclerócios são comumente encontrados especialmente no solo (Song, 2018). Em condições de laboratório, é possível induzir um fungo a produzir microesclerócios (ME), que são caracterizados por apresentar tamanhos

menores que 600 µm (Jackson & Jaronski, 2009; Kobori et al., 2015; Huarte-Bonnet et al., 2019).

Para *Escovopsis*, nunca havia sido documentada a produção de tais estruturas. A possível utilização de ME de *Escovopsis* para controlar formigas cortadeiras pode ser uma nova alternativa ao uso de produtos químicos. As hifas de *Escovopsis*, ao contrário dos conídios, não são suscetíveis às secreções das glândulas metapleurais, responsáveis por produzir compostos com atividade antimicrobiana contra uma variedade de patógenos (Bot et al., 2002). Uma das vantagens da utilização de ME é que o propágulo não apenas armazena grande quantidade de nutrientes em sua estrutura (Coley-Smith & Cooke, 1971), o que pode promover um desenvolvimento mais rápido do parasita contra jardins de formigas cortadeiras, mas também apresenta uma alta estabilidade de tempo de prateleira (Song et al., 2014; Song, 2018).

A fim de desenvolver uma nova estratégia para o controle de formigas cortadeiras, o objetivo deste estudo foi (1) investigar metodologias para produzir ME de *Escovopsis weberi*, (2) estudar a aceitação de ambos os propágulos, viáveis ou mortos, quando oferecidos às formigas na forma de iscas e; (3) avaliar o efeito das iscas com ME de *E. weberi* em minicolônias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* quando comparadas às iscas contendo conídios.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das colônias de formigas no campo, manutenção e estabelecimento das minicolônias em laboratório

As colônias de *A. subterraneus subterraneus* foram coletadas em Bom Jardim, RJ (22°13'16.37"S, 42°15'14.74"O, 709 m de altitude), uma região de Mata Atlântica caracterizada como floresta ombrófila densa, com presença de área urbana e agrícola. As colônias foram coletadas após cuidadosamente cavar o solo. Os jardins de fungos foram transferidos para recipientes limpos com o maior

número possível de formigas. As colônias foram mantidas na Unidade de Mirmecologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). A identificação das espécies de *Acromyrmex* seguiu a chave de Fowler et al. (1993). As colônias receberam folhas frescas de *Acalypha wilkesiana* diariamente e eventualmente rosas e flocos de cereais e foram mantidas em temperatura ambiente e umidade relativa de $\pm 70\%$. Para os bioensaios, minicolônias sem rainha foram estabelecidas a partir dessas colônias. Cada minicolônia era composta por formigas das 4 castas, 350 mL de jardim de fungo acondicionado em potes plásticos transparentes, no escuro. As minicolônias eram dispostas em bandeja de plástico (40 cm x 30 cm x 10 cm), que serviam como área de forrageamento.

Obtenção, identificação e produção de conídios de Escovopsis

O isolado de *Escovopsis* (denominado AT-02) foi obtido de uma colônia de *Atta sexdens rubropilosa* coletada em um plantio de eucalipto em São Francisco de Itabapoana, RJ e mantida no Departamento de Entomologia e Fitopatologia - UENF. De acordo com a descrição das espécies de *Escovopsis* proposta por Augustin et al. (2013), o isolado AT-02 é morfologicamente semelhante a *Escovopsis weberi*, com a coloração marrom, conidióforos cilíndricos e conídios com 3-4 μm . A fim de estabelecer uma cultura pura deste isolado, uma cultura monospórica foi realizada conforme descrito por Choi et al. (1999). Após a cultura monospórica, o fungo foi inoculado em meio de cultura de batata, dextrose e ágar (BDA) em placas de Petri e mantido no escuro a 27°C e 70% de UR. Após 5 dias, os esporos foram removidos com o auxílio de uma espátula e suspensos em Tween 80 (0,03% em água destilada estéril). A concentração de conídios foi estimada usando a câmara de Neubauer. Uma suspensão de 1×10^7 conídios/mL foi usada após diluição em série. Esta concentração foi utilizada para produção de microesclerócios; e para confecção de iscas contendo conídios para uso em bioensaios.

Produção de microesclerócios de Escovopsis weberi em cultura líquida

Os microesclerócios foram produzidos em cultura líquida, seguindo um protocolo desenvolvido por Carolino et al. (*in prep*). O meio consistiu de farinha de grão de bico (3%), extrato de levedura (4%) e dextrose (4%) em água destilada. O procedimento foi realizado da seguinte forma: a farinha de grão de bico e a água destilada foram autoclavadas por 20 minutos a 121°C. Em seguida, extrato de levedura e dextrose foram adicionados. A cultura líquida foi então autoclavada mais uma vez. Quarenta e nove mL de meio de cultura líquido estéril foram adicionados a frascos Erlenmeyer estéreis de 250 mL mais 1 mL de suspensão de conídios (1×10^7 conídios/mL). Os frascos foram mantidos em incubadora shaker rotativo (Solab® modelo SL-223 / F) no escuro, a 27°C e 230 rpm por quatro dias. Após 24h, 48h, 72h e 96h, um mL foi retirado do meio de cultura para avaliar o desenvolvimento e morfologia dos ME. Após quatro dias, os ME foram lavados cinco vezes com água destilada estéril e centrifugados a 3.000 rpm por 5 min (Nova Técnica® modelo NT 810). Os ME frescos foram armazenados a 4°C até a utilização nos ensaios. Para determinar o diâmetro dos ME foram feitas medições (20 repetições) usando um microscópio Nikon Eclipse 80i, com software de imagens NIS Elements v. 3.22.

Avaliação do peso seco e da produtividade de microesclerócios

Para avaliação do peso seco da biomassa de ME produzida, 1 mL de biomassa fresca foi retirada do armazenamento em geladeira, acondicionado em placas de Petri e secos em câmara de secagem (Nova Ética® modelo 411d) a 25°C por 2 dias. Este ensaio foi repetido seis vezes. O peso seco foi calculado como mg/mL.

A produtividade de ME foi avaliada mensalmente pelo período de 12 meses. A biomassa de ME fresco foi armazenada em tubos do tipo eppendorf em temperatura de 4°C até a utilização nos ensaios. A cada 30 dias foi inoculado em placa de Petri com meio de cultura BDA um volume de 500 microlitros do estoque de biomassa de ME, espalhadas uniformemente com o auxílio de espátula Drigalski e incubadas a 27°C (10 repetições) no escuro. Após, os conídios resultantes do desenvolvimento do ME foram removidos das placas de Petri com o auxílio de uma

espátula. Para remoção total dos conídios remanescentes, as placas eram lavadas com 10 mL de Tween 80 0,03%. A concentração de conídios foi determinada usando a câmara de Neubauer.

Produção de isca

As iscas foram produzidas manualmente usando farinha de laranja Bahia como base atrativa. As laranjas foram descascadas e secas em câmara de secagem (Nova Ética® modelo 411d) a 28°C por 48 horas e posteriormente trituradas em liquidificador. Uma peneira de aço inoxidável com 1 mm de abertura foi usada para estabelecimento de uma farinha homogênea. As iscas foram compostas por farinha de laranja (90%), carboximetilcelulose (5%) e óleo de soja (5%). Todo o material foi autoclavado por 20 minutos a 121°C. Após esterilizar a base seca da isca, 500 µL de ME fresco em 10 mL de Tween 80 (0,03%) ou uma suspensão de 10 mL de 1×10^7 conídios/mL foram adicionados a cada porção (3 gramas) de base seca da isca. Após a mistura de todos os componentes, os pellets de isca foram moldados com o auxílio de uma seringa descartável estéril de 20 mL e secos por 4 horas a 27°C em câmara de secagem para remover toda a água remanescente. As iscas controle foram produzidas da mesma forma, mas sem a adição do fungo.

Bioensaios em minicolônia

As iscas foram oferecidas para as minicolônias a fim de verificar a aceitação de iscas dos propágulos viáveis e mortos de *E. weberi* pelas operárias de *Acromyrmex* e avaliar o efeito nas minicolônias das iscas incorporadas no jardim de fungos. Cinco tratamentos foram estabelecidos, com cinco repetições cada. Cada minicolônia representava uma repetição. (1) ME viáveis; (2) Conídios viáveis; (3) ME mortos; (4) conídios mortos; (5) Controle. Nos tratamentos 3 e 4, os fungos foram autoclavados a 121°C por 20 minutos antes da produção da isca. As iscas do tratamento controle continham apenas água destilada estéril + Tween 80 (0,03%), sem fungo.

Durante o período do bioensaio, folhas frescas de *A. wilkesiana* foram oferecidas diariamente às minicolônias, exceto no oitavo dia, quando 3 gramas de

pellets de isca foram colocados na área de forrageamento de cada minicolônia. Vinte e quatro horas depois (dia 9), todas as iscas restantes foram removidas para estabelecer a taxa de aceitação. Após a oferta das iscas, o bioensaio continuou por mais 15 dias. A atividade de forrageamento das operárias em *A. wilkesiana* foi registrada diariamente através de medição da área foliar (cm²) cortada, estabelecida a partir da diferença entre a área foliar oferecida no dia e a área foliar restante no dia seguinte, utilizando um medidor portátil de área foliar CI - 202 (CID Bio-Science Inc., Camas, WA, EUA).

O lixo foi retirado diariamente da bandeja plástica das minicolônias com o auxílio de uma espátula para aferição do descarte de lixo, medido em gramas. Para esta análise, os bioensaios foram divididos em 3 períodos: do dia 1 ao dia 7 (Tempo 1 – Controle, anterior à oferta de isca), do dia 8 ao dia 15 (Tempo 2), do dia 16 ao dia 23 (Tempo 3).

O peso do jardim do fungo foi determinado a cada três dias. Para isso, os potes plásticos contendo o jardim de fungos e as operárias foram selados temporariamente para evitar a fuga das operárias e pesados com auxílio de balança analítica (Bel®).

Análise estatística

Para comparar todos os cinco tratamentos, os valores das médias de peso do descarte de lixo (g) foram submetidos a two-way ANOVA seguida pelo teste post hoc de Tukey ($\alpha = 0,05$). As médias da taxa de aceitação da isca, peso do jardim de fungo, atividade de forrageamento e produtividade de ME foram submetidos a one-way ANOVA, seguido pelo teste post hoc de Tukey ($\alpha = 0,05$). Todas as análises foram realizadas usando Sigma-Plot v. 12.5.

RESULTADOS

Produtividade de microesclerócios de Escovopsis weberi em cultura líquida

Após quatro dias, os conídios de *E. weberi* (Figura 1A) inoculados em meio líquido produziram ME com tamanhos variáveis (57,47 a 685,86 μm de diâmetro), com média de 280,82 μm (SEM \pm 35,69). O início do desenvolvimento fúngico pôde ser observado 48h após a inoculação dos conídios (Figura 1B-C). A cultura líquida com farinha de grão de bico, extrato de levedura e dextrose produziu ME com uma forte estrutura compacta (figura 1D), mas melanização não foi observada. Cada mL de biomassa ME teve um peso seco médio de 0,411 mg / mL (SEM \pm 0,05). Os ME apresentaram alta capacidade de produção de conídios. Os ensaios de produtividade mostraram que cada 500 μL de biomassa de ME fresca colocada em placas de Petri e incubadas por 5 dias produziu uma média de 1×10^9 conídios/mL (SEM \pm 8×10^7).

Os ME avaliados mensalmente mostraram que a produtividade apresentou diferenças estatísticas ao longo do tempo ($F_{11,119} = 9,968$; $p < 0,001$) (Tabela 1). A produtividade manteve-se estatisticamente igual durante os primeiros nove meses, com variação de $1,5 \times 10^9$ a $9,7 \times 10^8$ conídios/mL. No entanto, a partir do décimo mês houve uma queda na produtividade.

Bioensaios em minicolônias

Oferta de iscas

Iscas (3g) contendo *E. weberi* oferecidas no 8º dia do bioensaio às minicolônias de *A. subterraneus subterraneus* apresentaram diferentes padrões de aceitação. Os tratamentos contendo iscas sem fungo ou com fungo morto foram os mais aceitos pelas formigas. Em ordem decrescente, iscas controle (média de 2,9 g) foram as mais aceitas, seguidas de iscas com conídios mortos (média de 2,7 g) e iscas com ME mortos (média de 2,6 g). Esses três tratamentos não apresentaram diferenças estatísticas entre si ($p > 0,001$). Dos tratamentos contendo fungos viáveis, as iscas com ME viáveis foram mais aceitas (média de 1,8 g), do que iscas com

conídios viáveis (média de 1,0 g). Esses dois tratamentos foram estatisticamente diferentes entre si ($F_{4,20} = 36,964$; $p < 0,001$) (Figura 2).

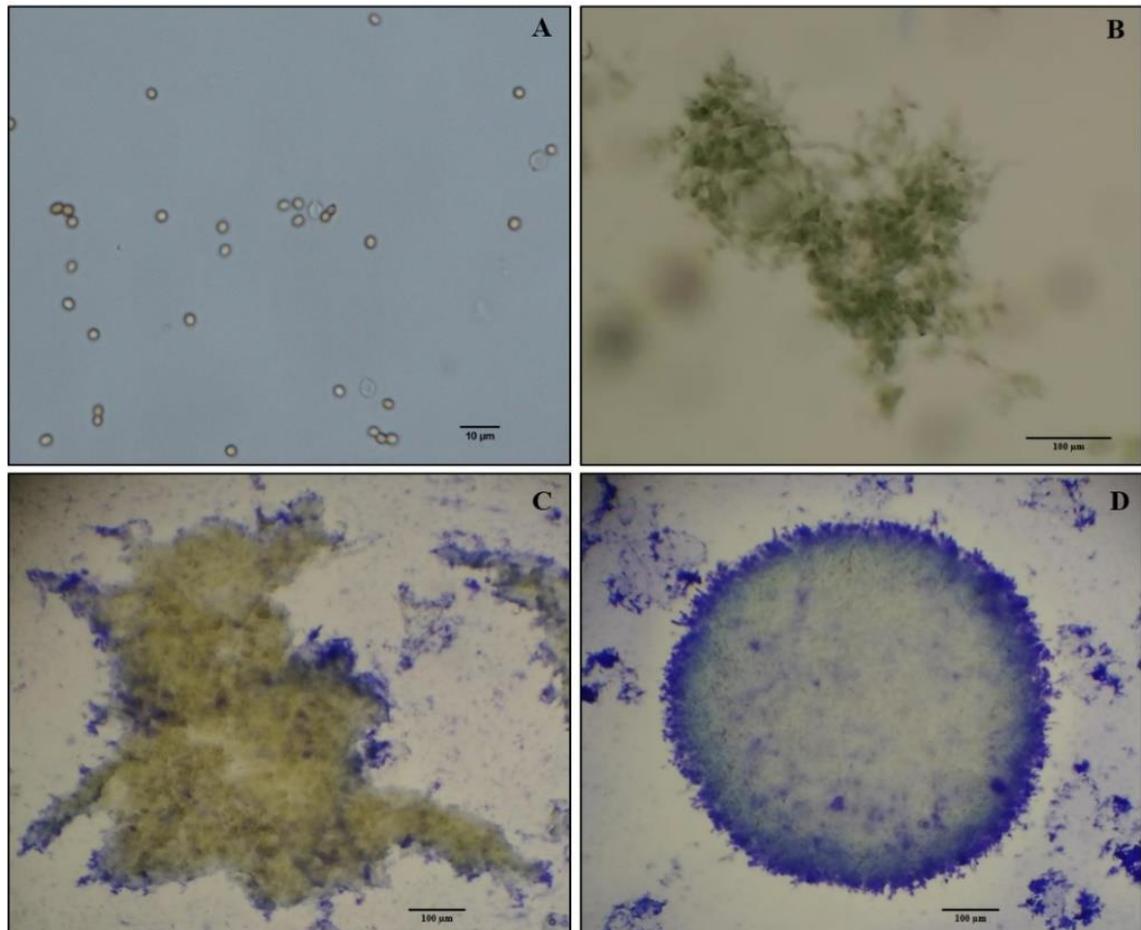


Figura 1. Desenvolvimento de microesclerócios de *Escovopsis weberi*. (A) Inoculação dos conídios em cultura líquida; (B) Hifas iniciando a compactação após 48h; (C) ME em formação após 72h; (D) formação completa de ME após 96h. A: barra de escala= 10 μm; B-D: barra de escala= 100 μm.

Tabela 1. Média de produtividade ao longo de 12 meses de conídios/mL oriundos de microesclerócios e erro padrão da média (EPM). As médias seguidas por letras diferentes são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$)

Período de avaliação (meses)	Média ($\times 10^8$)	\pm EPM ($\times 10^7$)
1	12,21 a	8,47
2	12,64 a	12,76
3	13,66 a	14,84
4	15,79 a	23,34
5	14,32 a	21,62
6	9,75 ab	8,64
7	11,71 a	13,79
8	10,97 ab	14,72
9	10,54 ab	9,60
10	2,52 b	8,69
11	3,35 b	7,73
12	4,77 b	10,32

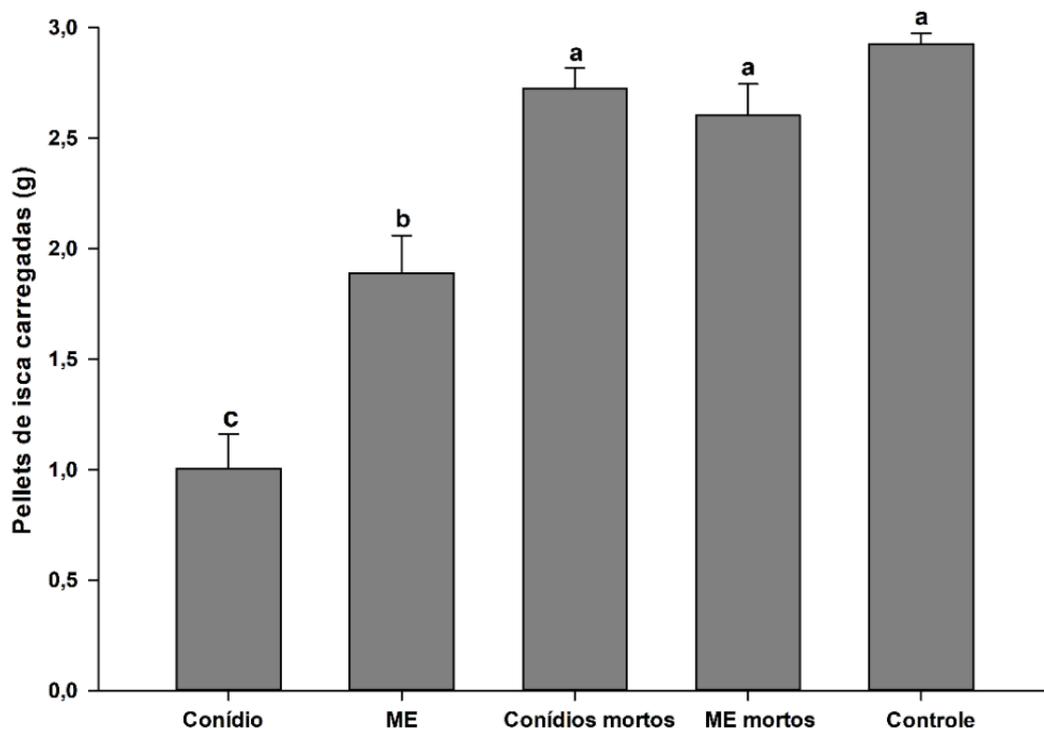


Figura 2. Peso médio das iscas transportadas pelas operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* durante 24 horas. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Atividade de forrageamento

Embora a atividade diária de forrageamento tenha apresentado diferenças entre os tratamentos contendo fungos ($F_{4,20} = 14,622$; $p < 0,001$), essas diferenças não foram tão abruptas (Figura 3). O tratamento controle apresentou maior taxa de forrageamento ($p < 0,001$). O tratamento com ME viáveis apresentou diferença significativa em relação ao tratamento com conídios mortos. Os tratamentos com conídios viáveis e com ME mortos não foram estatisticamente diferentes entre si. (Figura 3).

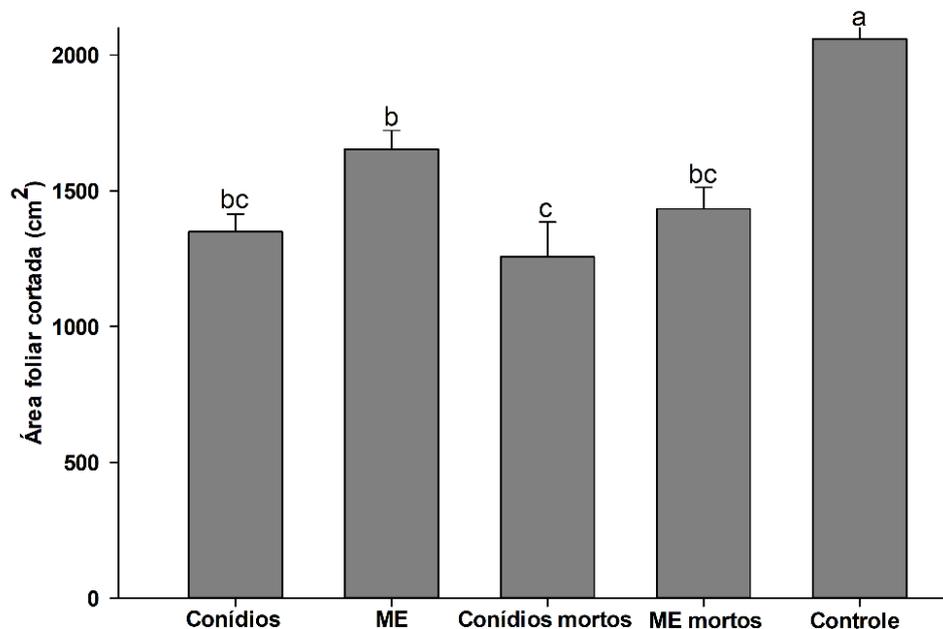


Figura 3. Atividade de forrageamento diário acumulada, medida em área foliar cortada (cm²), de operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* em *Acalypha wilkesiana* durante o período de bioensaio. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Taxa de descarte de lixo e perda da biomassa do jardim de fungos

Antes de oferecer as iscas (Tempo 1), todos os tratamentos apresentaram taxas de descarte de lixo estatisticamente semelhantes ($F_{4,60} = 57,467$; $p < 0,001$)

(Tabela 2). As taxas de descarte de lixo após a oferta das iscas (Tempo 2 e 3) nos tratamentos com iscas contendo conídios mortos, ME mortos e o tratamento controle permaneceram estatisticamente semelhantes aos anteriores ao oferecimento das iscas (Tempo 1). No entanto, para os tratamentos com conídios viáveis e ME viáveis, houve aumento significativo nas taxas de descarte de lixo nos tempos 2 e 3 ($F_{2,60} = 17,302$; $p < 0,001$).

Em colônias tratadas com conídios ou ME viáveis, foram observados níveis elevados de descarte de lixo. A perda na biomassa do jardim de fungos também pôde ser observada para esses dois tratamentos. Do dia 1 até o final do bioensaio, as minicolônias tratadas com conídios viáveis e com ME viáveis perderam 60,2% e 52,53% da biomassa do jardim de fungo, respectivamente ($F_{4,20} = 86,615$; $p < 0,001$) (Figura 4). Por outro lado, a perda de biomassa do jardim de fungo quando as colônias foram expostas a conídios mortos, ME mortos ou tratamento controle foi muito baixa e não apresentou diferenças estatísticas entre si. A perda foi de 7,23%, 7,33% e 3,44% da biomassa total ($p > 0,001$) nos três tratamentos, respectivamente (Figura 4).

Tabela 2. Taxa média (\pm EPM) de descarte de lixo (peso em gramas) durante os 23 dias do bioensaio. Dia 1 ao dia 7 (Tempo 1), dia 8 ao dia 15 (Tempo 2), dia 16 ao dia 23 (Tempo 3). Médias seguidas de letras diferentes foram estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Tratamentos	Período de tempo		
	1	2	3
Conídios viáveis	0,20 \pm 0,057 Ba	0,58 \pm 0,053 Aa	0,51 \pm 0,034 Aa
ME viáveis	0,21 \pm 0,050 Ba	0,56 \pm 0,050 Aa	0,47 \pm 0,026 Aa
Conídios mortos	0,15 \pm 0,161 Aa	0,17 \pm 0,020 Ab	0,16 \pm 0,018 Ab
ME mortos	0,21 \pm 0,022 Aa	0,20 \pm 0,015 Ab	0,20 \pm 0,025 Ab
Controle	0,16 \pm 0,024 Aa	0,19 \pm 0,029 Ab	0,17 \pm 0,026 Ab

Letras maiúsculas: comparações entre períodos de tempo (linha); letras minúsculas: comparações entre tratamentos (coluna).

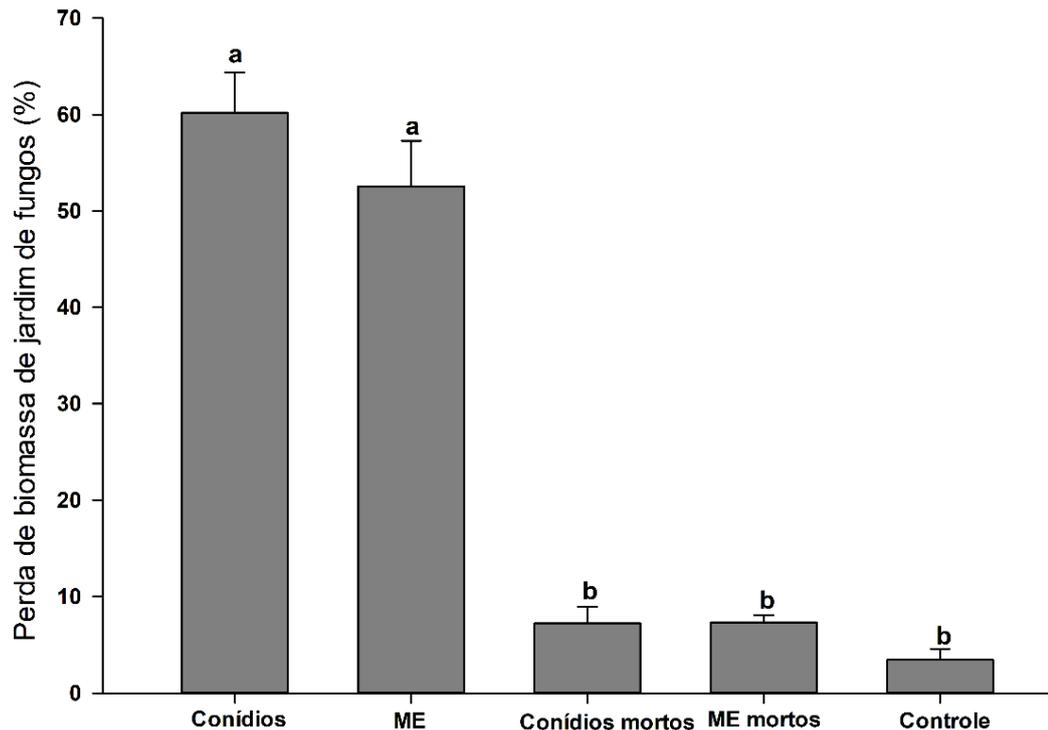


Figura 4. Porcentagem de perda de biomassa de jardim de fungo de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* após 23 dias de ensaio. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

DISCUSSÃO

Relatamos pela primeira vez que *E. weberi* quando cultivado em meio líquido, desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, produziu agregações de hifas denominadas microesclerócios. Essas estruturas são produzidas naturalmente por alguns fungos como estratégia de sobrevivência em condições estressantes, como falta de hospedeiros, dessecação e baixas temperaturas (Smith et al. 2014). Em condições de laboratório, é possível estimular a produção de tais propágulos por certos fungos (Jackson & Schisler, 1995; Shearer & Jackson, 2006; Boyette et al., 2014; Villamizar et al., 2018). A formulação do meio de cultura usada aqui é uma descoberta recente de nosso grupo, originalmente usada para estimular a produção

de blastosporos por *Metarhizium anisopliae* (Carolino et al. *em prep*). Neste estudo adaptamos o protocolo para produzir microesclerócios de *E. weberi*.

Escovopsis weberi cultivado em meio líquido produziu ME de tamanhos variáveis, semelhantes aos observados em outros estudos de ME de fungos entomopatogênicos, induzidos em cultura líquida (Jackson & Jaronski, 2009; Villamizar et al., 2018; Huarte-Bonnet et al., 2019). Os ME de *E. weberi* apresentaram germinação mais rápida em meio de cultura sólida do que conídios (observação pessoal). A germinação mais rápida em condições favoráveis pode ser devido ao alto número de mitocôndrias e altos níveis de polissacarídeos e lipídios no citoplasma comumente encontrados nessas estruturas (Chet et al., 1969). Conforme observado neste estudo, em meio de cultura BDA, os ME germinam e produzem conidióforos, resultando em altas concentrações de conídios. Os ME mantiveram altos níveis de produtividade de conídios ao longo dos 12 meses de avaliação. Apenas nos últimos meses ocorreu uma queda na produtividade, mas ainda produzindo elevada quantidade de conídios. Esse resultado é importante quanto a vida útil e a estabilidade desse tipo de propágulo quando se considera seu potencial como agente de controle biológico.

Os esclerócios encontrados em solos e material vegetal geralmente apresentam coloração marrom escura ou preta, devido à presença de melanina (Song, 2018). Diferentemente dos esclerócios do solo, os ME produzidos em cultura líquida sob constante agitação apresentam, em sua maioria, cor marrom clara (Song et al., 2014; 2016). Da mesma forma, os ME obtidos neste estudo apresentaram coloração marrom clara, sem melanização em nenhuma das fases do desenvolvimento.

Nas minicolônias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* foram avaliadas as taxas de aceitação de iscas de ME e conídios de *E. weberi*, tanto viáveis quanto mortos. Foi observado que as formigas conseguem distinguir o tipo de propágulo (conídios ou ME) mostrado pelas diferenças nas taxas de aceitação. As operárias carregaram menor porcentagem de iscas com conídios em relação aos demais tratamentos. Alguns estudos mostraram que *Escovopsis* pode entrar na colônia como conídios, presentes no meio ambiente; se aderem ao tegumento dos insetos e acessam a entrada da colônia (Currie, 2001a,b; Yek et al., 2012). Augustin et al. (2017) mostraram que os conídios de *Escovopsis* entram nos formigueiros através do contato acidental de formigas operárias com esporos,

quando estes estão presentes nas áreas de forrageamento ao redor do ninho. Eles também observaram que as operárias não eram capazes de reconhecer imediatamente pequenas quantidades de conídios em seus corpos e, portanto, não realizavam o comportamento de limpeza. Portanto, a grande concentração de conídios nas iscas do presente bioensaio, em comparação com o contato acidental com conídios aleatórios no ambiente (Augustin et al. 2017), pode explicar a maior rejeição das iscas com fungos pelas formigas operárias, apesar da comprovada atratividade das iscas à base de laranja (Boaretto & Forti, 1997).

As hifas e os conídios possuem semelhanças e diferenças em suas composições químicas. Embora ambos os propágulos tenham polissacarídeos como β -1,3 glucano e quitina na parede celular, os conídios são cobertos por uma camada protetora contendo a hidrofobina RodA e DHN-melanina (Beauvais & Latge, 2018). Esses dois compostos são essenciais para fornecer hidrofobicidade e tolerância às condições ambientais (Beauvais & Latge, 2018; Riquelme et al., 2018). É possível que o padrão de aceitação observado neste estudo quando comparados conídios e ME tenha sido influenciado por diferenças na composição da parede celular desses propágulos, ou seja, as formigas podem reconhecer os compostos nos conídios como uma ameaça maior para a colônia do que ME. Mais estudos sobre as diferenças entre conídios, hifas, paredes celulares de ME e seu reconhecimento por formigas são necessários.

Apesar de serem herbívoros dominantes, as formigas cortadeiras são muito seletivas em relação ao material vegetal que carregam para o ninho e têm a capacidade de reconhecer organismos ou substâncias prejudiciais aos indivíduos da colônia ou ao seu fungo simbiote (Della Lucia et al., 2014; Goes et al., 2020). Esse fator é um dos principais problemas no uso de iscas para o controle desses insetos, pois as formigas podem recusar os pellets contendo os agentes de controle biológico. Portanto, é importante desenvolver abordagens que possam ser efetivamente aplicadas às formigas.

Ao usar propágulos viáveis e mortos, foram observadas diferenças na aceitação da isca. Quase 100% das iscas contendo ambos os propágulos mortos foram carregadas para o ninho pelas operárias. Em contraste, esse padrão não foi observado em iscas com propágulos viáveis, que as formigas carregaram em menor porcentagem para o interior do ninho. Apesar das diferenças nas paredes

celulares de conídios e hifas mencionadas acima, é possível que fungos viáveis possam produzir compostos orgânicos voláteis que são detectados pelas operárias.

Os fungos naturalmente produzem compostos voláteis, atuando como sinais de reconhecimento ou promovendo mudanças comportamentais nos insetos (Kandasamy et al., 2019; Moisan et al., 2019). Kandasamy et al. (2019) observaram que o besouro *Ips typographus*, que ataca pinheiros na floresta de coníferas, pode distinguir seu fungo simbiótico entre outros fungos por meio de compostos orgânicos voláteis emitidos pelo primeiro. Assim, o besouro é corretamente atraído pela fonte de alimento colonizada pelo simbionte. Estudos futuros a respeito do reconhecimento fungo-inseto em formigas cortadeiras e seus fungos associados podem esclarecer as observações encontradas aqui.

Embora a viabilidade do propágulo tenha tido influência na aceitação da isca, ela não teve o mesmo efeito na atividade de forrageamento. Em todos os tratamentos contendo fungos, viáveis ou não, a área foliar acumulada (cm²) de *A. wilkesiana* cortada pelas operárias, não apresentou diferenças estatísticas. No entanto, nos tratamentos controle, a área foliar total cortada registrada foi maior do que em todos os outros tratamentos. Essa observação indicou que a presença de *Escovopsis*, viável ou não, altera o comportamento de forrageamento das formigas. Essa estratégia de comportamento pode ser uma tentativa de evitar uma possível reintrodução da *Escovopsis* na colônia (Cremer et al., 2007; Goes et al., 2020).

A presença de iscas de *Escovopsis* nas colônias influenciou a taxa de descarte de lixo. Depois que as operárias faziam a manutenção do jardim de fungos com iscas de ambos os tipos de propágulos viáveis, o volume de descarte de lixo aumentou notavelmente em comparação aos tratamentos com os dois tipos de propágulos mortos e o tratamento controle. Pode associar esse fato ao desenvolvimento e efeito do *Escovopsis* nas colônias. Comportamentos como *fungus grooming* e *weeding* são comumente observados em colônias infectadas por *Escovopsis*, com o objetivo de prevenir o colapso da colônia (Currie & Stuart, 2001). Uma vez que a colônia esteja contaminada com *Escovopsis*, as formigas tentam limpar o jardim de fungos, acumulando os esporos e esterilizando-os em suas bolsas infrabucais (Bot et al., 2001; Hart et al., 2002; Little et al., 2006; Bonadies et al., 2019). As operárias também destacam e descartam porções do jardim de fungos contaminadas com o parasita. Em ambos os casos, as operárias

depositam o patógeno ou pellets contaminados do fungo simbiote nas pilhas de lixo para descarte (Currie & Stuart, 2001).

Apesar do esforço de limpeza e remoção de fungos, *Escovopsis* ainda pode prevalecer na colônia. Uma possível explicação é que apenas os conídios são inibidos pelas glândulas metapleurais (Bot et al., 2002). Após a germinação dos conídios, as hifas da *Escovopsis* não são mais afetadas pelos compostos produzidos por esta glândula. Além disso, assim que as hifas de *Escovopsis* começam a se desenvolver e crescer no interior da colônia, esse fungo produz substâncias como a melinacidina IV e a shearinina D, ambas letais para *Pseudonocardia* (Heine et al., 2018). Como consequência da não suscetibilidade das hifas de *Escovopsis* às secreções das glândulas metapleurais e da inibição da *Pseudonocardia*, o parasita consegue colonizar com sucesso seu hospedeiro. Como forma de controlar a infecção por *Escovopsis*, as formigas operárias aumentam as atividades de *fungus grooming* e *weeding*, o que aumenta a taxa de descarte de lixo e diminui a biomassa de fungos nos jardins, conforme observado nos bioensaios deste estudo. Houve uma clara influência desses dois comportamentos nos bioensaios usando conídios e ME viáveis. Este padrão de aumento das taxas de descarte de lixo e diminuição da biomassa do jardim de fungos não foi registrado para ambos os tipos de propágulos mortos ou o tratamento controle.

No controle biológico de pragas, a aplicação de ME de fungos tem potencial de sucesso devido à sua capacidade de se manter viáveis por longos períodos em condições adversas (Jackson & Jaronski, 2009). *Escovopsis* é um parasita especialista de *L. gongylophorus* e é uma ameaça para a integridade da colônia de formigas cortadeiras (Currie, 2001b). Até agora, não houve relatos de produção de ME por fungos micoparasitas como o *Escovopsis*. O uso de ME de fungos entomopatogênicos, fitopatogênicos e nematófagos para controle biológico tem sido estudado e se mostrado como uma alternativa ao controle químico (Jackson & Jaronski, 2009; Mascarin et al., 2013; Boyette et al., 2014; Goble et al., 2015 ; Kobori et al., 2015; Song et al., 2016; Huarte-Bonnet et al., 2019).

CONCLUSÕES

A formação de esclerócios é recorrente em alguns grupos de fungos como forma de sobrevivência, mas este é o primeiro relato de produção de ME por *Escovopsis*. Foi observado que ME frescos e armazenados foram capazes de germinar e produzir conídios.

As formigas cortadeiras são seletivas na busca de material vegetal para o fungo simbiote, essencial para a saúde da colônia. As iscas contendo ME foram atrativas para formigas, e isso indica que este propágulo tem potencial para estratégias de biocontrole, com menor risco de rejeição e maior possibilidade de causar contaminação por *Escovopsis* nas colônias. Uma vez nas minicolônias, ME teve um efeito negativo no desenvolvimento normal no jardim de fungos, resultando em um declínio na saúde da colônia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Augustin, J.O., Groenewald, J.Z., Nascimento, R.J., Mizubuti, E.S.G., Barreto, R.W., Elliot, S.L., Evans, H.C. (2013) Yet more “weeds” in the garden: fungal novelties from nests of leaf-cutting ants. *PLoS One*. 8(12):822-65.
- Augustin, J.O., Simões, T.G., Dijksterhuis, J., Elliot, S.L., Evans, H.C. (2017) Putting the waste out: a proposed mechanism for transmission of the mycoparasite *Escovopsis* between leafcutter ant colonies. *Royal Soc. Open Sci.* 4:161013. DOI:10.1098/rsos.161013.
- Beauvais, A., Latgé, J.P. (2018) Special issue: Fungal cell wall. *J. Fungi*. 4:91. DOI:10.3390/jof4030091.
- Boaretto, M.A.C., Forti, L.C. (1997) Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. *Série técnica*.11(30):31-46.

- Bonadies, E., Wcislo, W.T., Gálvez, D., Hughes, W.H.O., Fernández-Marín, H. (2019) Hygiene defense behaviors used by a fungus-growing ant depend on the fungal pathogen stages. *Insects*. 10(5):130-136. DOI:10.3390/insects10050130.
- Bot, A.N.M., Currie, C.R., Hart, A.G., Boomsma, J.J. (2001) Waste management in leaf-cutting ants. *Ethol Ecol Evol.* 13(3):225-237. DOI:10.1080/08927014.2001.9522772.
- Bot, A.N.M., Ortius-Lechner, D., Finster, K., Maile, R., Boomsma, J.J. (2002) Variable sensitivity of fungi and bacteria to compounds produced by the metapleural glands of leaf-cutting ants. *Insectes Soc.* 49:363–370. DOI: 10.1007/PL00012660.
- Boyette, C.D., Abbas, H.K., Johnson, B., Hoagland, R.E., Weaver, M.A. (2014) Biological control of the weed *Sesbania exaltata* using a microsclerotia formulation of the bioherbicide *Colletotrichum truncatum*. *Am J Plant Sci.* 5:2672–2685. DOI:10.4236/ajps.2014.518282.
- Chet, I., Henis, Y., Kislev, N. (1969) Ultrastructure of sclerotia and hyphae of *Sclerotium rofsii* Sacc. *J Gen Microbiol.* 57:143-147.
- Choi, Y.W., Hyde, K.D., Ho, W.H. (1999) Single spore isolation of fungi. *Fungal Divers.* 3:29-38.
- Cocco, P. (2002) On the rumors about the silent spring: review of the scientific evidence linking occupational and environmental pesticide exposure to endocrine disruption health effects. *Cad Saude Publica.* 18(2):379-402.
- Coley-Smith, J.R., Cooke, R.C. (1971) Survival and germination of fungal sclerotia. *Annu Rev Phytopathol.* 9:65-92. DOI:10.1146/annurev.py.09.090171.000433.
- Cremer, S., Armitage, S.A.O., Schmid-Hempel, P. (2007) Social immunity. *Curr Biol.* 17:693–702.
- Currie, C.R. (2001a) Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. *Oecologia.* 128:99–106. DOI: 10.1007/s004420100630.
- Currie, CR. (2001b) A community of ants, fungi, and bacteria: a multilateral approach to studying symbiosis. *Annu Rev Microbiol.* 55:357-380. DOI:10.1146/annurev.micro.55.1.357.
- Currie, C.R., Mueller, U.G., Malloch, D. (1999) The agricultural pathology of ant fungus gardens. *Proc Natl Acad Sci.* 96:7998–8002. DOI:10.1073/pnas.96.14.7998.

- Currie, C.R., Stuart, A.E. (2001) Weeding and grooming of pathogen in agriculture by ants. *Proc R Soc B Biol Sci.* 268:1033-1039. DOI:10.1098/rspb.2001.1605.
- Della Lucia, T.M.C., Gandra, L.C., Guedes, R.N.C. (2014) Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. *Pest Manag Sci.* 70:14–23. DOI:10.1002/ps.3660.
- Erthal, M., Silva, C.P., Cooper, R.M., Samuels, R.I. (2009) Hydrolytic enzymes of leaf-cutting ant fungi. *Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol.* 152(1):54-59. DOI:10.1016/j.cbpb.2008.09.086.
- Fernandez-Marín, H., Zimmerman, J.K., Rehner, S.A., Wcislo, W.T. (2006) Active use of the metapleural glands by ants in controlling fungal infection. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 273:1689–1695. DOI:10.1098/rspb.2006.3492.
- Flury, M. (1996) Experimental evidence of transport of pesticides through field soils - A review. *J Environ Qual.* 25:25-45. DOI:10.2134/jeq1996.00472425002500010005x.
- Folgarait, P.J., Gorosito, N., Poulsen, M., Currie, C.R. (2011) Preliminary in vitro insights into the use of natural fungal pathogens of leaf-cutting ants as biocontrol agents. *Curr Microbiol.* 63(3):250–258. DOI:10.1007/s00284-011-9944-y.
- Fowler, H.G., Della Lucia, T.M.C., Moreira, D.D.O. (1993) Posição taxonomica das formigas cortadeiras. In: Della Lucia, T.M.C. (org) *As formigas cortadeiras*. Viçosa: Folha de Viçosa. p 4-25.
- Goble, T.A., Hajek, A.E., Jackson, M.A., Gardescu, S. (2015) *Microsclerotia* of *Metarhizium brunneum* F52 applied in hydromulch for control of asian longhorned beetles (Coleoptera: Cerambycidae). *J Econ Entomol.* 108:433–443. DOI:10.1093/jee/tov013.
- Goes, A.C., Barcoto, M.O., Kooij, P.W., Bueno, O.C., Rodrigues, A. (2020) How do leaf-cutting ants recognize antagonistic microbes in their fungal crops? *Front Ecol Evol.* 8(95):1-13. DOI:10.3389/fevo.2020.00095.
- Haifig, S.S., Albarici, T.R., Nunes, P.H., Haifig, I., Vieira, P.C., Rodrigues, A. (2017) Nature of the interactions between hypocrealean fungi and the mutualistic fungus of leaf-cutter ants. *Antonie van Leeuwenhoek.* 110(4):593–605. DOI:10.1007/s10482-016-0826-y.
- Hart, A.G., Bot, A.N.M., Brown, M.J.F. (2002) A colony-level response to disease control in a leaf-cutting ant. *Naturwissenschaften.* 89(6):275-7. DOI:10.1007/s00114-002-0316-0.

- Heine, D., Holmes, N.A., Worsley, S.F., Santos, A.C.A., Innocent, T.M., Scherlach, K., Patrick, E.H., Yu, D.W., Murrell, J.C., Viera, P.C., Boomsma, J.J., Hertweck, C., Hutchings, M.I., Wilkinson, B. (2018) Chemical warfare between leafcutter ant symbionts and a co-evolved pathogen. *Nat. Commun.* 9:2208. DOI:10.1038/s41467-018-04520-1.
- Huarte-Bonnet, C., Paixão, F.R.S., Mascarin, G.M., Santana, M., Fernandes, E.K.K., Pedrini, N. (2019) The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* produces microsclerotia-like pellets mediated by oxidative stress and peroxisome biogenesis. *Environ Microbiol Rep.* 11(4):518–524. DOI:10.1111/1758-2229.12742.
- Jackson, M.A., Jaronski, S.T. (2009) Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. *Mycol Res.* 113:842–850. DOI:10.1016/j.mycres.2009.03.004.
- Jackson, M.A., Schisler, D.A. (1995) Liquid culture production of microsclerotia of *Colletotrichum truncatum* for use as bioherbicidal propagules. *Mycol Res.* 99:879–884. DOI:10.1016/s0953-7562(09)80745-4.
- Kandasamy, D., Gershenzon, J., Andersson, M.N., Hammerbacher, A. (2019) Volatile organic compounds influence the interaction of the eurasian spruce bark beetle (*Ips typographus*) with its fungal symbionts. *The ISME Journal.* 13(7):1. DOI:10.1038/s41396-019-0390-3.
- Kobori, N.N., Mascarin, G.M., Jackson, M.A., Schisler, D.A. (2015) Liquid culture production of microsclerotia and submerged conidia by *Trichoderma harzianum* active against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*. *Fungal Biol.* 119(4):179-90. DOI:10.1016/j.funbio.2014.12.005.
- Laabs, V., Amelung, W., Pinto, A., Zech, W. (2002) Fate of pesticides in tropical soils of Brazil under field conditions. *J Environ Qual.* 31(1):256-68. DOI:10.2134/jeq2002.0256.
- Little, A.E.F., Murakami, T., Mueller, U.G., Currie, C.R. (2006) Defending against parasites: fungus-growing ants combine specialized behaviours and microbial symbionts to protect their fungus gardens. *Biol Lett.* 2(1):12-6. DOI:10.1098/rsbl.2005.0371.

- Marfetan, J.R., Romero, A.I., Folgarait, P.J. (2015) Pathogenic interaction between *Escovopsis weberi* and *Leucoagaricus* sp.: mechanisms involved and virulence levels. *Fungal Ecol.* 17:52-61. DOI:10.1016/j.funeco.2015.04.002.
- Mascarin, G.M., Kobori, N.N., Vital, R.C.J., Jackson, M.A., Quintela, E.D. (2013) Production of microsclerotia by Brazilian strains of *Metarhizium* spp. using submerged liquid culture fermentation. *World J Microbiol Biotechnol.* 30(5):1583-1590. DOI:10.1007/s11274-013-1581-0.
- Mattoso, T.C., Moreira, D.D.O., Samuels, R.I. (2011) Symbiotic bacteria on the cuticle of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* protect workers from attack by entomopathogenic fungi. *Biol Lett.* 8:461-474. DOI:10.1098/rsbl.2011.0963.
- Moisan, K., Cordovez, V., Zande, E.M.V., Raaijmakers, J.M., Dicke, M., Barbosa, D.L. (2019) Volatiles of pathogenic and non-pathogenic soil-borne fungi affect plant development and resistance to insects. *Oecologia.* 190:589–604. DOI:10.1007/s00442-019-04433-w.
- Montoya-Lerma, J., Giraldo-Echeverri, C., Armbrrecht, I., Farji-Brener, A., Calle, Z. (2012) Leaf-cutting ants revisited: Towards rational management and control. *Int J Pest Manag.* 58(3):225-247. DOI:10.1080/09670874.2012.663946.
- Quinlan, R.J., Cherrett, J.M. (1979) The role of the fungus in the diet of the leafcutting ant *Atta cephalotes*. *Ecol Entomol.* 4(2):151–160. DOI:10.1111/j.1365-2311.1979.
- Riquelme, M., Aguirre, J., Bartnicki-García, S., Braus, G.H., Feldbrügge, M., Fleig, U., Hansberg, W., Herrera-Estrella, A., Kämper, J., Kück, U., Mouriño-Pérez, R.R., Takeshita, N., Fischer, R. (2018) Fungal morphogenesis, from the polarized growth of hyphae to complex reproduction and infection structures. *Microbiol Mol Biol Rev.* 79:243–262. DOI:10.1128/MMBR.00068-17.
- Samuels, R.I., Mattoso, T.C., Moreira, D.D.O. (2013) Chemical warfare: Leaf-cutting ants defend themselves and their gardens against parasite attack by deploying antibiotic secreting bacteria. *Commun Integr Biol.* 6(2):e23095. DOI:10.4161/cib.23095.
- Shearer, J.F., Jackson, M.A. (2006) Liquid culturing of microsclerotia of *Mycoleptodiscus terrestris*, a potential biological control agent for the management of hydrilla. *Biol Control.* 38(3):298–306. DOI:10.1016/j.biocontrol.2006.04.012.

- Shik, J.Z., Rytter, W., Arnan, X., Michelsen, A. (2018) Disentangling nutritional pathways linking leafcutter ants and their co-evolved fungal symbionts using stable isotopes. *Ecology*. 99(9):1999–2009. DOI:10.1002/ecy.2431
- Silva, A., Rodrigues, A., Bacci Jr, M., Pagnocca, F.C., Bueno, O.C. (2006) Susceptibility of the ant-cultivated fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales: Basidiomycota) towards microfungi. *Mycopathologia*. 162:115-119. DOI:10.1007/s11046-006-0037-6.
- Smith, M.E., Henkel, T.W., Rollins, J.A. (2014) How many fungi make sclerotia? *Fungal Ecol*. 13:211-220. DOI:10.1016/j.funeco.2014.08.010.
- Soares, W.L., Porto, M.F.S. (2009) Estimating the social cost of pesticide use: An assessment from acute poisoning in Brazil. *Ecol. Econ*. 68:2721–2728. DOI:10.1016/j.ecolecon.2009.05.008.
- Song, Z.Y. (2018) Fungal microsclerotia development: essential prerequisites, influencing factors and molecular mechanism. *Appl Microbiol Biotechnol*. 102(23):9873–9880. DOI:10.1007/s00253-018-9400-z.
- Song, Z.Y., Shen, L., Zhong, Q., Yin, Y.P., Wang, Z.K. (2016) Liquid culture production of microsclerotia of *Purpureocillium lilacinum* for use as bionematicide. *Nematol*. 18(6):719–726. DOI:10.1163/15685411-00002987.
- Song, Z.Y., Yin, Y.P., Jiang, S.S., Liu, J.J., Wang, Z.K. (2014) Optimization of culture medium for microsclerotia production by *Nomuraea rileyi* and analysis of their viability for use as a mycoinsecticide. *BioControl*. 59:597–605. DOI:10.1007/s10526-014-9589-4.
- Taerum, S.J., Cafaro, M.J., Little, A.E., Schultz, T.R., Currie, C.R. (2007) Low host-pathogen specificity in the leaf-cutting ants microbe symbiosis. *Proc. R. Soc. Lond*. 274:1971-1978. DOI:10.1098/rspb.2007.0431.
- Varanda-Haifig, S.S., Albarici, T.R., Nunes, P.H., Haifig, I., Vieira, P.C., Rodrigues, A. (2017) Nature of the interactions between hypocrealean fungi and the mutualistic fungus of leaf-cutter ants. *Antonie van Leeuwenhoek*. 110:593–605. DOI:10.1007/s10482-016-0826-y.
- Vigueras, G., Paredes-Hernandez, D., Revah, S., Valenzuela, J., Olivares-Hernandez, R., Le Borgne, S. (2017) Growth and enzymatic activity of *Leucoagaricus gongylophorus*, a mutualistic fungus isolated from the leaf-cutting ant *Atta mexicana*, on cellulose and lignocellulosic biomass. *Lett. Appl. Microbiol*. 65(2):173-181. DOI:10.1111/lam.12759.

- Villamizar, L.F., Nelson, T.L., Jones, S.A., Jackson, T.A., Hurst, M.R.H., Marshall, S.D.G. (2018) Formation of microsclerotia in three species of *Beauveria* and storage stability of a prototype granular formulation. *Biocontrol Sci Technol.* 28(12):1-17. DOI:10.1080/09583157.2018.1514584.
- Yek, S.H., Boomsma, J.J., Poulsen, M. (2012) Towards a Better Understanding of the Evolution of Specialized Parasites of Fungus-Growing Ant Crops. *Psyche.* 239392:10. DOI:10.1155/2012/239392.
- Zanetti, R., Zanuncio, J.C., Santos, J.C., Silva, W.L.P., Ribeiro, G.T., Lemes, P.G. (2014) An overview of integrated management of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in brazilian forest plantations. *Forests.* 5:439-454. DOI:10.3390/f5030439

3.3. EFEITO DE OFERTAS CONSECUTIVAS DE ISCAS BIOLÓGICAS A BASE DE *Escovopsis weberi* PARA AS FORMIGAS CORTADEIRAS *Acromyrmex subterraneus subterraneus* E *Atta sexdens rubropilosa*

RESUMO

A utilização de iscas granuladas para controle de formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, com praticidade de aplicação, é a forma mais utilizada de inserção do agente de controle nos formigueiros. Atualmente, a busca por agentes biológicos para substituir os agentes químicos é uma necessidade urgente. Este estudo investigou a oferta consecutiva de iscas biológicas contendo *Escovopsis weberi*, parasita especializado do jardim de fungos, usando duas bases atrativas diferentes, farinha de laranja e extrato de soja. Os ensaios foram realizados em minicolônias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e *Atta sexdens rubropilosa*. Os resultados apontam que as duas espécies não apresentaram rejeição das iscas na 1ª oferta, mas demonstraram comportamentos distintos quanto à aceitação da 2ª oferta de iscas. *A. subterraneus subterraneus* apresentou rejeição de iscas na 2ª oferta, independente da base atrativa. Já *A. sexdens rubropilosa* apresentou aceitação das iscas ofertadas pela 2ª vez, porém apenas de iscas à base de extrato de soja. Minicolônias de ambas as espécies

apresentaram alterações nas atividades de forrageamento e descarte de lixo da colônia no período após as ofertas das iscas, indicando influência das mesmas e efeito negativo sobre a biomassa de jardim de fungos. Os resultados demonstram que as estratégias de controle biológico utilizando iscas a base de *Escovopsis* devem ser estabelecidas levando em consideração as especificidades de cada espécie de formiga cortadeira e a base atrativa das iscas utilizadas.

Palavras-chave: Atratividade, Attini, Controle biológico, Micoparasita

ABSTRACT

The use of granulated baits for the control of leaf-cutting ants of the genera *Atta* and *Acromyrmex*, is the most used form of control. The search for biological control agents to replace chemical agents is urgently needed. This study investigated, the consecutive offering of biological baits containing *Escovopsis weberi*, specialist parasite of the fungus garden, using two different attractants, orange flour and soy extract. The tests were carried out in *Acromyrmex subterraneus subterraneus* and *Atta sexdens rubropilosa* mini colonies. The results demonstrated that the two species did not reject the baits during the first offer, but showed different behaviors regarding the acceptance of baits during the second offer. *A. subterraneus subterraneus* rejected baits during the second offer, regardless of the attractant. *A. sexdens rubropilosa* showed acceptance of the baits offered for a second time, but only baits with soybean extract. Workers from mini colonies of both species showed changes in foraging activities and colony rubbish disposal in the period after the bait offers, indicating their influence and negative effect on fungus garden biomass. The results demonstrate that biological control strategies using *Escovopsis*-based baits should be established taking into account the specificities of each leaf-cutting ant species and the attractant used in the baits.

Keywords: attractiveness, Attini, biological control, mycoparasite

INTRODUÇÃO

Atta e *Acromyrmex* são os gêneros de formigas cultivadoras de fungo mais derivados da tribo Attini, com sua origem estimada entre 8 e 12 milhões de anos (Schultz & Brady, 2008). A simbiose dessas formigas com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* é fundamental para a sobrevivência de ambos os organismos. Diferentemente dos outros gêneros mais primitivos da tribo, *Atta* e *Acromyrmex* cultivam seu fungo simbiote apenas com material vegetal fresco e, por isso são chamadas de formigas cortadeiras (Mueller et al., 2005). O fungo *L. gongylophorus* provê o principal recurso alimentar para os indivíduos da colônia, armazenando em suas gongilídias substâncias nutricionalmente ricas para as rainhas, imaturos e operárias (Shik et al., 2018). Colônias maduras de formigas cortadeiras causam grande impacto devido ao consumo de recursos vegetais e são consideradas os herbívoros dominantes na região Neotropical (Schultz & Brady, 2008). Devido a essa característica, *Atta* e *Acromyrmex* causam enormes prejuízos nos diversos sistemas agrícolas, florestais e pastoris e muitas espécies são consideradas pragas de grande importância econômica no Brasil e em outros países (Montoya-Lerma et al., 2012).

A integridade da colônia é ameaçada pela presença de diversos organismos patogênicos que podem entrar na colônia. Dos microrganismos com potencial efeito negativo nas colônias, os fungos do gênero *Escovopsis* se destacam por serem parasitas do jardim de fungos, que coevoluiu junto com a simbiose formiga-fungo (Currie et al., 1999; Varanda-Haifig et al., 2017). As formigas cortadeiras, como insetos eussociais, possuem estratégias de defesas contra esses microrganismos. A imunidade social consiste em comportamentos profiláticos preventivos e comportamentos em situações de presença de parasitas na colônia que consistem em adaptações comportamentais, fisiológicas e organizacionais, a fim de evitar a entrada, estabelecimento e avanço de patógenos e parasitas (Cremer et al., 2007). Alguns exemplos são os comportamentos de *selfgrooming*, *allogrooming*, *fungus grooming* e *weeding*, como mecanismos de defesa após a introdução do patógeno na colônia. Além desses comportamentos, as formigas possuem a capacidade do aprendizado associativo, para evitar a

reintrodução do patógeno na colônia (Goes et al., 2020). Devido a isso, após a introdução de algum microrganismo deletério, ocorre uma diminuição da taxa de forrageamento, como forma de prevenção de maiores riscos à colônia.

Essas estratégias de imunidade social são relevantes quando se considera a metodologia de controle de formigas cortadeiras. A utilização de inseticidas químicos sintéticos continua sendo a principal estratégia de controle. O método mais comum é utilizar iscas granuladas, que são eficientes e práticas (Zanetti et al., 2014). Diversas bases atrativas de iscas químicas já foram estudadas (Boaretto & Forti, 1997; Lima et al., 2003; Teixeira & Santos, 2008; Nagamoto et al., 2011). Contudo, apesar dessas pesquisas, as iscas químicas comercializadas continuam utilizando apenas a polpa cítrica como principal base atrativa, devido à comprovada atratividade para as operárias de formigas cortadeiras (Boaretto & Forti, 1997; Carlos et al., 2009; Zanetti et al., 2014).

É sabido que a utilização de produtos químicos traz comprovados malefícios para a saúde humana e meio ambiente e seu uso deve ser minimizado a fim de promover o desenvolvimento sustentável (Cocco, 2002; Koifman & Hatagima, 2003; Ribas & Matsumura, 2009; Soares, 2010; Kim et al., 2017). O controle de formigas cortadeiras utilizando iscas biológicas é uma alternativa ecologicamente correta e promissora. Fungos como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Trichoderma* spp. e *Escovopsis* spp. são eficientes contra as colônias de cortadeiras e são potenciais agentes de controle biológico (Jaccoud et al., 1999; Couceiro et al., 2016; Castrillo et al., 2016; Batey et al., 2020; Stefanelli et al., 2021). Apesar da ampla gama de trabalhos sobre a patogenicidade desses fungos em colônias de formigas cortadeiras, poucos são os trabalhos que avaliaram a exequibilidade destes em iscas atrativas para o possível controle desses insetos (Cardoso et al., 2012; Palma, 2016; Travaglini et al., 2017).

Ademais, ainda não há estudos que avaliem a aceitação de ofertas subsequentes de iscas biológicas para formigas cortadeiras utilizando diferentes bases atrativas em cada oferta. Estratégia esta que aumentaria a expectativa de inserir o inóculo no formigueiro, uma vez que pode prejudicar a capacidade das formigas em reconhecer a ameaça, interferindo no aprendizado associativo que elas possuem. Essa metodologia poderia burlar as estratégias de prevenção de entrada de microrganismos patogênicos e beneficiar o controle biológico das colônias.

Com isso, o objetivo deste estudo é investigar as diferenças nos padrões de aceitação de ofertas consecutivas de iscas biológicas com diferentes bases atrativas para as formigas cortadeiras das espécies *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e *Atta sexdens rubropilosa* e seu efeito nos formigueiros.

MATERIAIS E MÉTODOS

Manutenção das colônias oriundas do campo e estabelecimento das minicolônias em laboratório

As colônias de *A. subterraneus subterraneus* foram coletadas em Bom Jardim, RJ e as colônias de *A. sexdens rubropilosa* foram coletadas em eucaliptal no município de São Francisco do Itabapoana, RJ, e mantidas na Unidade de Mirmecologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). A identificação das espécies de *Acromyrmex* e *Atta* seguiram as chaves de Fowler et al. (1993) A manutenção da criação das colônias coletadas em campo foi feita diariamente com oferta de folhas frescas de *Acalypha wilkesiana* mantidas a 27°C e umidade relativa de 70% (Della Lucia, 1993). Para os bioensaios, foram estabelecidas minicolônias compostas por operárias de todas as castas, larvas e pupas, sem rainha, com 350 mL de jardim de fungo em um pote plástico transparente e uma área de forrageamento em uma bandeja de plástico (40 cm x 30 cm x 10 cm), no escuro.

Produção de microesclerócios de Escovopsis weberi

Conídios do isolado AT-02, de *Escovopsis weberi*, foram inoculados em meio de cultura de batata, dextrose e ágar (BDA) em placas de Petri e mantidos no escuro a 27°C por 5 dias. Após esse período, os esporos produzidos foram removidos com o auxílio de uma espátula e suspensos em Tween 80 (0,03% em

água destilada estéril). A concentração foi ajustada para obtenção de uma suspensão de 1×10^7 conídios/mL.

Para a produção de microesclerócios (ME) de *E. weberi*, 1 mL de suspensão de conídios foi inoculada em frascos Erlenmeyer estéreis de 250 mL, contendo 49 mL de meio líquido de farinha de grão de bico (3%), extrato de levedura (4%) e dextrose (4%) em água destilada. Os frascos foram mantidos em shaker rotativo orbital (Solab® modelo SL-223/F) no escuro, a 27°C e 230 rpm por quatro dias. Após quatro dias, os ME foram lavados com água destilada estéril e centrifugados a 3.000 rpm por 5 min (Nova Técnica® modelo NT 810). A lavagem foi repetida 5 vezes. Os ME frescos foram mantidos com água destilada estéril a 4°C até a sua utilização na produção das iscas biológicas.

Confecção dos pellets de isca

As iscas utilizadas neste trabalho foram produzidas manualmente com farinha de laranja Bahia ou com extrato de soja como base. As laranjas foram descascadas, retirado o excesso de líquido e secas em câmara de secagem (Nova Ética® modelo 411d) a 28°C por 48 horas e posteriormente trituradas em liquidificador e peneiradas (mesh 1mm) para se obter uma farinha homogênea. O extrato de soja integral orgânico utilizado neste trabalho foi da marca Mãe Terra®.

Ambas as iscas foram compostas por 90% de farinha (farinha de laranja ou extrato de soja), 5% de carboximetilcelulose (CMC) e 5% de óleo de soja. Todo o material foi autoclavado por 20 minutos a 121°C. Para a formação da massa a ser moldada em pellets, à farinha seca + CMC + óleo, foi adicionado água destilada estéril e 500 µL da biomassa de ME de *E. weberi* fresco para cada porção de isca a ser utilizados os bioensaios (3 gramas). Após a homogeneização de todos os componentes, os pellets de isca foram produzidos com o auxílio de uma seringa descartável estéril de 20 mL e secos por 4 horas a 27°C em câmara de secagem. As iscas controle foram produzidas da mesma forma, mas sem adição do fungo.

Bioensaios em minicolônia

Para os bioensaios em minicolônias, foram ofertados 3 gramas de pellets de isca atrativa para cada minicolônia de *A. subterraneus subterraneus* e de *A.*

sexdens rubropilosa em dois momentos distintos, com intervalo de sete dias entre eles, denominados: 1° oferta de isca e 2° oferta de isca. Foram estabelecidos três tratamentos com fungos e três tratamentos controle. Para cada tratamento estipulado, foram estabelecidas 4 repetições. Cada repetição consistia em uma minicolônia.

Deste ponto em diante, os tratamentos serão referidos por suas respectivas siglas, determinadas pela combinação das letras F (fungo), C (controle), L (farinha de laranja) e S (extrato de soja), de acordo com a ordem das ofertas de isca (Tabela 1).

Tabela 1. Esquema da nomenclatura das siglas utilizadas no estudo de acordo com o tipo de base atrativa e a ordenação das ofertas das iscas

Tratamentos com fungo (F)		
1° oferta de isca	2° oferta de isca	Sigla
farinha de laranja (L)	farinha de laranja (L)	FLL
extrato de soja (S)	extrato de soja (S)	FSS
farinha de laranja (L)	extrato de soja (S)	FLS
Tratamento controle, sem fungo (C)		
1° oferta de isca	2° oferta de isca	Sigla
farinha de laranja (L)	farinha de laranja (L)	CLL
extrato de soja (S)	extrato de soja (S)	CSS
farinha de laranja (L)	extrato de soja (S)	CLS

Durante todo período do bioensaio, folhas frescas de *A. wilkesiana* foram oferecidas diariamente às minicolônias, exceto no sétimo dia (1° oferta de isca) e no 14° dia (2° oferta de isca), quando 3 gramas de pellets das iscas foram colocados na área de forrageamento de cada minicolônia. Vinte e quatro horas depois (8° e 15° dia, respectivamente), todas as iscas restantes foram removidas para estabelecer a taxa de aceitação das iscas. Esse valor foi obtido a partir da subtração do peso de iscas oferecidas (3 gramas) com o peso das iscas remanescentes após 24 horas. Após a segunda oferta de iscas, os bioensaios continuaram por mais 7 dias, totalizando 21 dias.

A atividade de forrageamento das operárias em *A. wilkesiana* foi registrada diariamente, com a medição da área foliar (cm²) cortada. A atividade de

fORAGEAMENTO foi estabelecida a partir da diferença entre a área foliar oferecida no dia e a área foliar remanescente coletada no dia seguinte. Para isso, foi utilizado o medidor portátil de área foliar CI - 202 (CID Bio-Science Inc.). Para as análises deste parâmetro, os resultados foram divididos em 3 períodos de tempo: do dia 1 ao dia 7 (Tempo 1 – Controle, anterior à oferta de isca), do dia 8 ao dia 14 (Tempo 2 – após a primeira oferta de isca), do dia 15 ao dia 21 (Tempo 3 – após a segunda oferta de isca). Para cada período de tempo foi estipulada a taxa acumulada de corte de folha diário ao longo dos sete dias.

O lixo produzido pelas operárias foi removido diariamente da bandeja plástica das minicolônias com o auxílio de uma espátula para aferição da taxa de descarte de lixo (peso em gramas). Para esta análise, os bioensaios também foram divididos em 3 períodos de tempo: do dia 1 ao dia 7 (Tempo 1 – Controle, anterior à oferta de isca), do dia 8 ao dia 14 (Tempo 2), do dia 15 ao dia 21 (Tempo 3). Cada período de tempo representou o peso de lixo acumulado durante os sete dias definidos.

O peso do jardim do fungo foi determinado ao início e fim dos ensaios. Para isso, os potes plásticos contendo o jardim de fungos foram selados temporariamente para evitar a fuga das operárias e pesados com auxílio de balança analítica (Bel®).

Análise estatística

Os valores das médias do descarte de lixo e da taxa de forrageamento foram submetidos a ANOVA de duas vias seguido pelo teste post hoc de Tukey ($\alpha = 0,05$). A taxa média de aceitação da isca e o peso do jardim de fungo foram submetidos a ANOVA de uma via seguido pelo teste post hoc de Tukey ($\alpha = 0,05$). A comparação das médias da 1ª oferta e da 2ª dentro de cada tratamento foi submetida ao teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). Todas as análises foram realizadas usando Sigma-Plot v. 12.5.

RESULTADOS

Carregamento das iscas

Os resultados obtidos mostram diferenças no carregamento das iscas pelas operárias das duas espécies de formiga, *A. subterraneus subterraneus* e *A. sexdens rubropilosa*.

Para *Acromyrmex*, houve diferenças estatísticas na taxa de carregamento das iscas na 1° e na 2° oferta (Figura 1). Na 1° oferta, a isca de laranja do tratamento FLS foi a mais aceita e estatisticamente diferente dos demais, seguido pelos tratamentos FSS e CSS ($F_{(5,18)}=4,966$; $p=0,005$). Os tratamentos FLL, CLL e CLS foram os que, estatisticamente, apresentaram menor taxa de carregamento das iscas. Ou seja, na 1° oferta de isca, a isca com fungo que foi mais aceita foi a base de laranja.

Já na 2° oferta de isca, o tratamento que apresentou maior aceitação pelas operárias foi CLL, à base de laranja, porém não continha fungo em sua composição ($F_{(5,18)}=7,355$; $p<0,001$). Em seguida, os tratamentos com maior taxa de carregamento foram CLS e CSS, que também não continham fungo em suas composições e não foram estatisticamente diferentes. Ou seja, na 2° oferta, nenhuma isca contendo fungo apresentou boa aceitação pelas formigas.

Ainda considerando *Acromyrmex*, quando comparado à taxa de carregamento das iscas das 1° e 2° ofertas dentro de cada tratamento, foi observado que os tratamentos FSS e FLS apresentaram queda na taxa de aceitação das iscas na 2° oferta (respectivamente $F_{(1,6)}=48,433$; $p<0,001$ e $F_{(1,6)}=1656,519$; $p<0,001$). Essas diferenças na taxa de aceitação não foram observadas nos tratamentos controle correspondentes a esses tratamentos (CSS e CLS).

Iscas com fungo à base de laranja (FLL) não diferiram estatisticamente entre a 1° e 2° oferta ($F_{(1,6)}=4,409$; $p=0,081$), diferentemente do observado no tratamento das iscas com fungo à base de extrato de soja (FSS), que apresentou uma queda na taxa de aceitação na 2° oferta ($F_{(1,6)}=48,433$; $p<0,001$). O tratamento controle referente à isca de laranja (CLL) apresentou aumento significativo na taxa

de aceitação da 1ª para a 2ª oferta ($F_{(1,6)}=31,214$; $p=0,001$). O tratamento controle referente à isca de soja (CSS) não diferiu estatisticamente entre a 1ª e 2ª oferta.

Para o tratamento com iscas à base de laranja na 1ª oferta e à base de soja na 2ª oferta (FLS), foi observado que a taxa no carregamento apresentou uma queda significativa da 1ª para a 2ª oferta ($F_{(1,6)}=1656,519$; $p<0,001$). Ao passo que o tratamento controle referente (CLS) não apresentou diferenças estatísticas entre a 1ª e 2ª oferta.

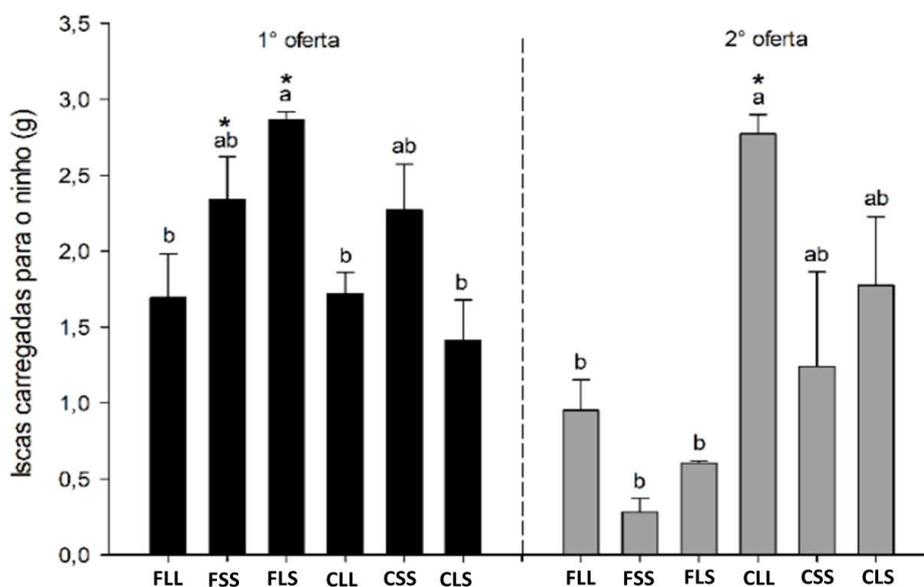


Figura 1. Aceitação das iscas carregadas por *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. A quantidade de iscas (g) carregadas foi usada como parâmetro de aceitação. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). Médias com * foram estatisticamente diferentes quando comparando a 1ª e 2ª oferta dentro de cada tratamento, de acordo com o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Atta apresentou padrões diferentes de aceitação das iscas biológicas em relação a *Acromyrmex*. A taxa de aceitação no 1º evento de oferta de isca não foi estatisticamente diferente quando comparando todos os tratamentos, com ou sem fungo ($F_{(5,18)}=0,887$; $p=0,510$) (Figura 2).

Os tratamentos FLS e FSS não diferiram estatisticamente da 1ª oferta para a 2ª oferta de iscas (respectivamente $F_{(1,6)}=0,0301$; $p=0,868$ e $F_{(1,6)}=0,291$; $p=0,609$), ou seja, a aceitação das iscas com fungo + extrato de soja na 2ª oferta

manteve o mesmo padrão da taxa de aceitação da 1° oferta. Diferentemente, nos tratamentos FLL, CLL e CLS, onde a aceitação das iscas decaiu, comparado com a 1° oferta.

Foram observadas diferenças entre os tratamentos de iscas com as duas bases (laranja e soja). Iscas, com fungo apenas à base de laranja (FLL) apresentaram maior aceitação na 1° oferta, com queda na 2° oferta, ou seja, a aceitação decaiu.

Nos dois tratamentos com fungos que utilizaram isca à base de soja na 2° oferta (FLS e FSS) não houve diferenças estatísticas entre a duas ofertas (respectivamente $F_{(1,6)}=0,0301$; $p=0,868$ e $F_{(1,6)}=0,291$; $p=0,609$), ou seja, a aceitação se manteve similar. Porém, iscas com fungo à base de laranja na 1° e soja na 2° oferta (FLS) apresentaram a melhor taxa de aceitação, em comparação com soja em ambas as ofertas (FSS).

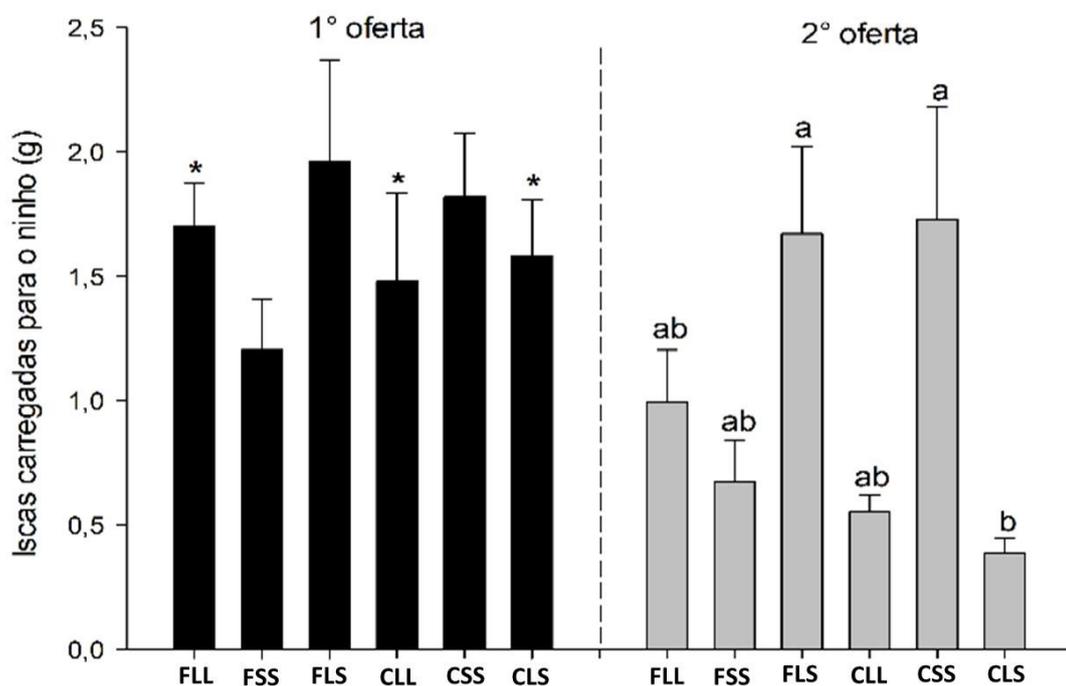


Figura 2. Aceitação de iscas carregadas por *Atta sexdens rubropilosa*. A quantidade de iscas (g) carregadas foi usada como parâmetro de aceitação. As médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). Médias com * foram estatisticamente diferentes quando comparando a 1° e 2° oferta dentro de cada tratamento de acordo com o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Taxas de corte de folhas

Os resultados obtidos para o corte de folhas de *A. wilkesiana* por operárias de *Acromyrmex* apontam que a taxa de corte de folhas variou entre os três períodos de tempo, quando avaliados cada tratamento separadamente ($F_{(2,54)}=30,863$; $p<0,001$) (Figura 3). Os três tratamentos com fungo apresentaram queda na taxa de corte após as ofertas de iscas. FLL manteve as taxas estatisticamente similares entre os tempos 1 e 2, mas apresentou queda no tempo 3. FSS teve taxa de corte estatisticamente maior no tempo 1 ($p<0,001$) do que nos tempos 2 e 3. FLS apresentou valores progressivamente menores e estatisticamente diferentes para cada um dos três tempos.

Os tratamentos controle apresentaram padrões diferentes do observado para os tratamentos com fungo. CLL apresentou maior taxa de corte de folhas no tempo 2, sendo que no tempo 1 e 3 não houve diferenças estatísticas ($p<0,001$). CSS e CLS não apresentaram diferenças estatísticas entre os 3 períodos de tempo ($p>0,05$).

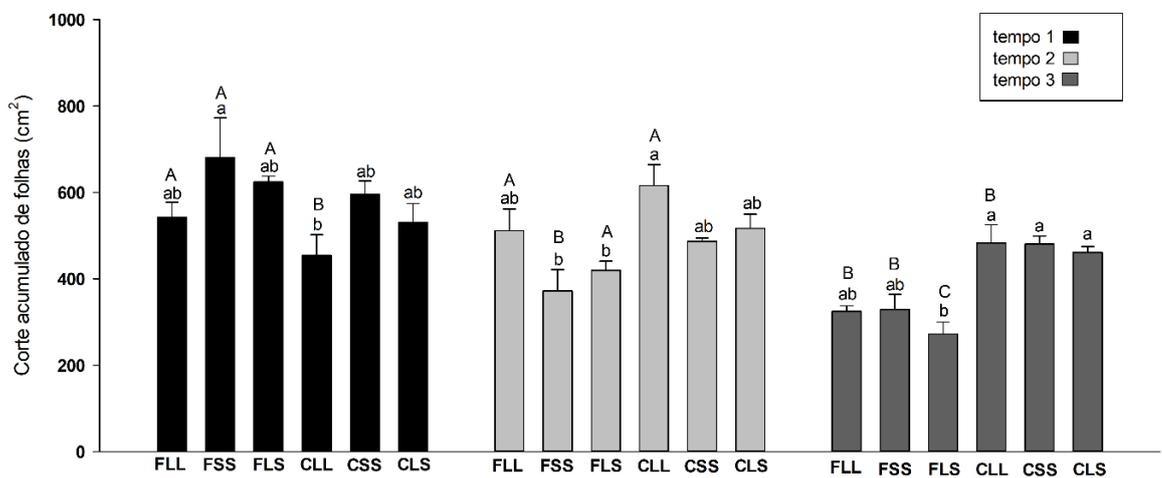


Figura 3. Corte acumulado de folhas (área foliar cm²) por *Acromyrmex subterraneus subterraneus* do dia 1 ao dia 7 (Tempo 1 – Controle, anterior à oferta de isca), do dia 8 ao dia 14 (Tempo 2 – após a primeira oferta de isca), do dia 15 ao dia 21 (Tempo 3 – após a segunda oferta de isca). Médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si, dentro de cada período de tempo, de acordo com o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). Médias seguidas por letras maiúsculas

iguais não diferem estatisticamente, quando comparando os três períodos de tempo por cada tratamento, de acordo com o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Nos bioensaios com *Atta*, os tratamentos apresentaram diferenças estatísticas nas taxas de corte de folhas ($F_{(5,54)}=4,758$; $p=0,001$) (figura 4). Os tratamentos FLL, FLS, CSS e CLS tiveram maior taxa de corte no tempo 1, seguido por FSS e CLL. No tempo 2, todos os tratamentos foram estatisticamente iguais entre si, não havendo diferenças entre eles. No tempo 3, CSS foi o tratamento que apresentou maior taxa de corte, seguido de CLL e CLS. Os três tratamentos com fungo foram os que apresentaram as menores taxas de corte de folhas no tempo 3.

Dentro de cada tratamento, as diferenças nas taxas de corte de folhas variaram entre os períodos de tempo ($F_{(2,54)}=74,671$; $p<0,001$). Nos tratamentos FLL, FLS e CLS as taxas de corte de folhas foram diferentes em cada um dos três tempos, com progressiva queda da taxa ao longo do tempo. Para FSS e CSS, os tempos 1 e 2 apresentaram taxas sem diferenças estatísticas, com queda na taxa no tempo 3. CLL não apresentou diferenças significativas em nenhum dos 3 tempos.

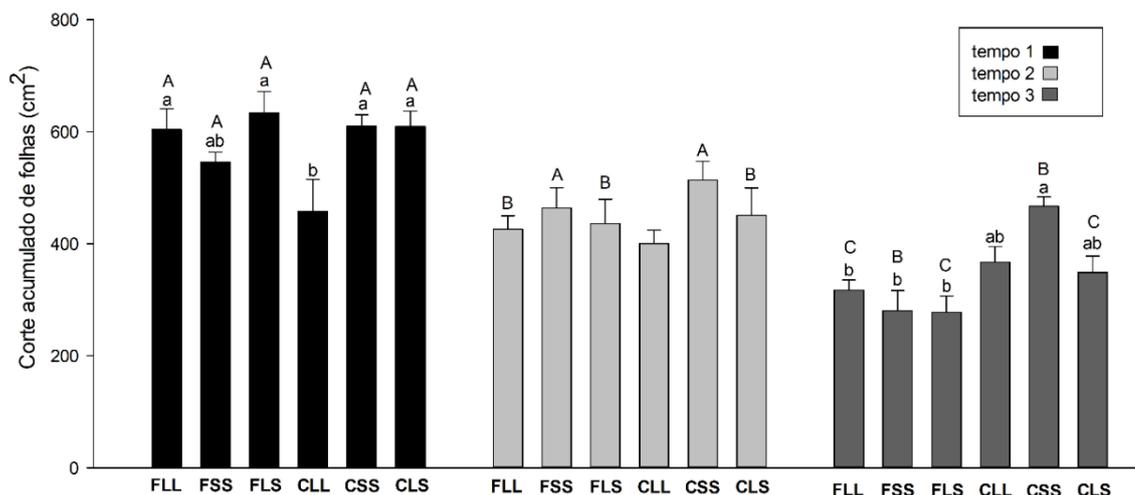


Figura 4. Corte acumulado de folhas (área foliar cm^2) por *Atta sexdens rubropilosa* do dia 1 ao dia 7 (Tempo 1 – Controle, anterior à oferta de isca), do dia 8 ao dia 14 (Tempo 2 – após a primeira oferta de isca), do dia 15 ao dia 21 (Tempo 3 – após a segunda oferta de isca). Médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente entre si, dentro de cada período de tempo, de acordo com o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). Médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem

estatisticamente, quando comparando os três períodos de tempo dentro de cada tratamento, de acordo com o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Descarte de lixo

O acúmulo de lixo pelas operárias de *Acromyrmex* em cada um dos tratamentos apresentou diferenças estatísticas ($F_{(5,54)}=5,329$; $p<0,001$). Os resultados podem ser observados na Tabela 2. Durante o tempo 1, referente ao período antes da primeira oferta de isca, todos os tratamentos apresentaram médias sem diferenças estatísticas. Durante o tempo 2, todos os tratamentos se mantiveram sem diferenças estatísticas, exceto FSS, que apresentou maior descarte de lixo. No tempo 3, todos os tratamentos apresentaram médias sem diferenças estatísticas, exceto FLS, que resultou em um descarte de lixo maior, e CLL, que apresentou o menor descarte de lixo.

Dentro de cada tratamento de *Acromyrmex*, houve algumas diferenças entre os períodos de tempo estabelecidos ($F_{(2,54)}=14,285$ $p<0,001$). Para FLL e CLL, o descarte de lixo foi menor durante o tempo 1 e estatisticamente diferente do descarte de lixo nos tempos 2 e 3, que não foram estatisticamente diferentes. Os tratamentos FSS e FLS apresentaram o descarte de lixo estatisticamente diferente durante os 3 períodos de tempo, sendo maior o descarte de lixo durante o tempo 2 comparando com os outros dois tempos. Os tratamentos CSS e CLS não apresentaram diferenças estatísticas entre os 3 períodos de tempo.

Os tratamentos aplicados com asinicolônias de *Atta* apresentaram diferenças estatísticas entre si em cada período de tempo ($F_{(2,54)}=3548$, $p=0,036$). Assim como para *Acromyrmex*, todos os tratamentos foram estatisticamente iguais no tempo 1. Já no tempo 2, os tratamentos com maior descarte de lixo foram FLL e CLS e o tratamento com menor descarte de lixo foi FLS. Durante o tempo 3, CLS foi o tratamento com maior descarte e CSS o tratamento com menor descarte de lixo.

Em relação à produção de lixo de cada tratamento, apenas os tratamentos FLS e CLL em minicolônias de *Atta*, apresentaram diferenças estatísticas entre os períodos de tempo ($F_{(2,54)}=3,548$, $p=0,036$). Em FLS, o descarte de lixo no tempo 1 foi estatisticamente maior do que no tempo 2. Para CLL, o descarte de lixo foi maior nos tempos 1 e 2, mas não foi estatisticamente diferente, mas com queda na produção durante o tempo 3.

Tabela 2. Peso de lixo acumulado (gramas) do dia 1 ao dia 7 (Tempo 1 – Controle, anterior à oferta de isca), do dia 8 ao dia 14 (Tempo 2 – após a primeira oferta de isca), do dia 15 ao dia 21 (Tempo 3 – após a segunda oferta de isca) em minicolônias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e *Atta sexdens rubropilosa*

Espécie	Tratament o	Tempo 1 (g) ± SEM	Tempo 2 (g) ± SEM	Tempo 3 (g) ± SEM
<i>A. subterraneu s</i>	FLL	2,25 ± 0,20 Ba	3,75 ± 0,15 Ab	4,79 ± 0,3 Aab
	FSS	3,11 ± 0,32 Ca	6,25 ± 0,66 Aa	4,54 ± 0,33 Bab
	FLS	2,23 ± 0,29 Ba	4,15 ± 0,28 Ab	4,97 ± 0,58 Aa
<i>s subterraneu s</i>	CLL	2,51 ± 0,33 Ba	2,83 ± 0,54 Ab	2,94 ± 0,36 Ab
	CSS	3,80 ± 0,41 Aa	4,37 ± 0,73 Ab	3,37 ± 0,35 Aab
	CLS	3,68 ± 0,79 Aa	3,67 ± 0,40 Ab	3,90 ± 0,39 Aab
<i>A. sexdens rubropilosa</i>	FLL	3,70 ± 1,24 a	6,03 ± 0,50 a	4,88 ± 0,39 ab
	FSS	3,68 ± 1,03 a	4,09 ± 0,87 ab	2,68 ± 0,95 ab
	FLS	5,57 ± 1,07 Aa	2,59 ± 0,46 Bb	3,24 ± 0,76 ABab
	CLL	5,50 ± 0,76 Aa	5,9 ± 0,38 Aab	2,97 ± 0,47 Bab
	CSS	3,37 ± 0,30 a	4,05 ± 0,28 ab	2,07 ± 0,28 b
	CLS	3,92 ± 1,29 a	6,65 ± 0,66 a	6,10 ± 1,22 a

As médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). Letras minúsculas: diferenças entre tratamentos dentro de cada período de tempo (colunas); letras maiúsculas: diferenças entre os períodos de tempo dentro de cada tratamento (linhas).

Efeitos das ofertas das iscas na biomassa dos jardins de fungos

Os efeitos das ofertas das iscas na biomassa dos jardins de fungos de minicolônias de *Acromyrmex* foram estatisticamente diferentes entre os tratamentos ($F_{(5,18)}=88,504$; $p<0,001$) (Figura 5). O tratamento FSS foi o que apresentou maior perda da biomassa de jardim de fungos, com 86% de perda. FLL e FLS também apresentaram elevada perda de biomassa, com 61,5% e 63,7% de perda, respectivamente. Porém, esses valores foram estatisticamente diferentes do que em FSS. Os três tratamentos controle apresentaram baixas perdas quando

comparados com os três tratamentos com fungos. Os controles não foram estaticamente diferentes.

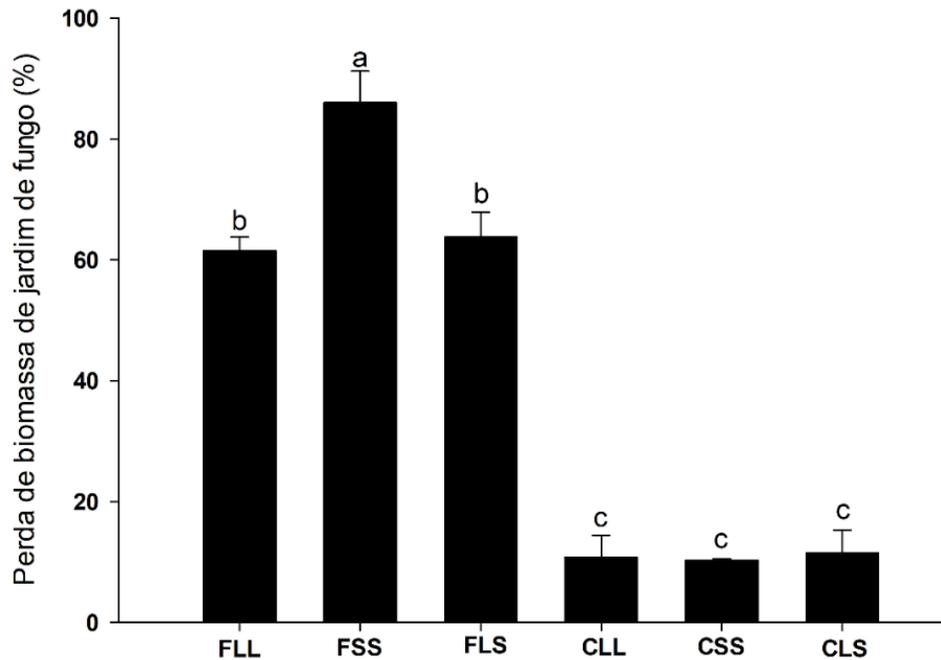


Figura 5. Perda de biomassa de jardim de fungo de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* tratados com iscas biológicas ao final de 21 dias de bioensaio. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Em minicolônias de *Atta*, as taxas de perda de biomassa também foram estatisticamente diferentes ($F_{(5,18)}=35,571$, $p<0,001$). Assim como em *Acromyrmex*, os três tratamentos controle apresentaram taxa de perda de biomassa inferior e estatisticamente diferente da apresentada nos tratamentos com fungo. Os tratamentos FLL e FSS apresentaram as maiores taxas de perda de biomassa (86,2% e 75,2%, respectivamente), seguido pelo tratamento FLS (50%).

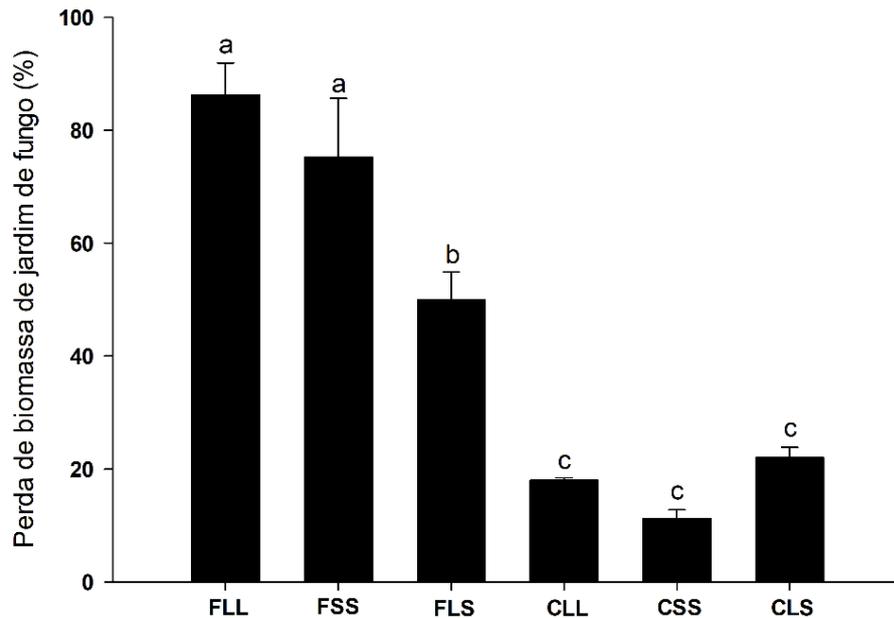


Figura 6. Perda de biomassa de jardim de fungo de *Atta sexdens rubropilosa* tratados com iscas biológicas ao final de 21 dias de bioensaio. Médias de biomassa com letras iguais não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

DISCUSSÃO

Este trabalho demonstrou o efeito de duas ofertas consecutivas de iscas biológicas com base atrativa de farinha de laranja e de extrato de soja, contendo microesclerócios de *Escovopsis weberi* como princípio ativo, em minicolônias de duas espécies de formigas cortadeiras. Os resultados obtidos apontam diferenças nos padrões de aceitação das iscas em relação às espécies de formigas e seus efeitos nas colônias.

Minicolônias de *Acromyrmex* demonstraram um padrão de aceitação das iscas diferente do encontrado em *Atta*. Em *Acromyrmex*, os tratamentos com fungo apresentaram maior aceitação na 1ª oferta e queda da aceitação na 2ª oferta. Esta queda da aceitação das iscas na 2ª oferta não foi observada em nenhum tratamento controle, nos quais ocorreu o inverso, *ie.*, as operárias carregaram quantidades iguais ou maiores de pellets de iscas na 2ª oferta. Portanto, a presença do fungo

carregado para a minicolônia na 1° oferta de isca influenciou a taxa de aceitação das iscas quando ofertadas pela segunda vez.

As formigas possuem mecanismos de detecção de ameaças, com padrões de reconhecimento e aprendizado associativo de patógenos que eventualmente ameaçam as colônias (Goes et al., 2020). Nesses casos, após o patógeno iniciar o dano no jardim de fungos, as formigas reconhecem pistas químicas emitidas pelo fungo simbiote, estabelecendo o padrão de reconhecimento através do aprendizado associativo. Esta imunidade social adquirida é temporária, pois tem como duração o ciclo de vida daquelas operárias envolvidas no processo (Goes et al., 2020). Bioensaios realizados em laboratório por Tranter e colaboradores (2015) avaliaram a capacidade de *Acromyrmex echinator* em detectar e responder a presença de fungos patógenos e observaram que as operárias evitam recursos alimentares contaminados com parasitas. Similarmente, operárias de *Acromyrmex ambiguus* conseguem identificar material vegetal impróprio para seu fungo simbiote através de informações oriundas da pilha de lixo da colônia, evitando os mesmos após a detecção (Arenas & Roces, 2017).

No campo, a aplicação de iscas granuladas com princípios ativos químicos é a metodologia mais largamente utilizada para controle de formigas cortadeiras. Seu uso engloba praticidade e eficiência (Della Lucia et al., 2014; Zanetti et al., 2014), podendo ser usado em áreas urbanas e rurais (Schowalter & Ring, 2017). Iscas com polpa cítrica como base atrativa são amplamente aceitas pelas operárias de formigas cortadeiras e utilizadas em formulações comerciais de inseticidas químicos (Verza et al., 2006; Montoya-Lerma et al., 2012). Outras bases atrativas já foram testadas, como colmo de cana-de-açúcar, folhas de capim-Jaraguá, polpa do fruto do jatobá e folhas de acalifa, mas não foram aprimoradas para o uso comercial (Lima et al., 2003; Teixeira & Santos, 2008; Nagamoto et al., 2011).

Em minicolônias de *Acromyrmex*, além da observação de que todos os tratamentos com fungo apresentaram aceitação na 1° oferta e queda da aceitação na 2° oferta. Também não foi observado influência da base atrativa das iscas no carregamento, uma vez que tratamentos com bases diferentes apresentaram o mesmo padrão de aceitação. A rejeição dos pellets de iscas com fungo na 2° oferta ocorreu tanto para iscas de soja quanto laranja. Para *Acromyrmex*, a aplicação de uma 2° oferta de iscas biológicas com fungo não é a melhor estratégia para o controle desses insetos. A inserção de uma isca à base de outro ingrediente atrativo

não foi o suficiente para que a taxa de aceitação fosse maior em relação a 1º oferta. Com isso, pode inferir que a estratégia de aplicação de iscas em um evento único seja mais vantajosa para espécies de *Acromyrmex* do que a estratégia de aplicações consecutivas (2 eventos).

Ofertas consecutivas de iscas poderiam ser um método que garantiria uma maior inoculação do princípio ativo das iscas nas colônias do que uma oferta única. Porém, como espécies de *Acromyrmex* possuem ninhos com profundidade reduzida no solo e com poucas câmaras, em relação às espécies de *Atta* (Lopes et al., 2011; Della Lucia et al., 2014), a estratégia de uma aplicação única de iscas pode ser suficiente para causar danos significativos ao formigueiro. Ensaio futuros utilizando iscas atrativas com maiores dosagens de agentes de controle biológico podem elucidar a concentração máxima desses agentes, sem diminuir a taxa de aceitação das iscas observadas neste trabalho, otimizando a aplicação em campo.

Já em *Atta sexdens rubropilosa*, a aceitação das iscas ofertadas no 1º evento nas minicolônias foi toda estatisticamente igual em todos os tratamentos, com ou sem fungo. No 2º evento de oferta de iscas, houve algumas diferenças entre tratamentos com isca à base de laranja e extrato de soja. As iscas à base de farinha de laranja foram mais aceitas pelas operárias na 1º do que na 2º oferta. Já iscas com extrato de soja apresentaram aceitação na 2º oferta estatisticamente igual da 1º oferta. Como método de controle biológico desta espécie de *Atta*, a utilização de iscas à base de soja em uma segunda oferta de isca é mais eficiente em manter a taxa de aceitação depois da 1º oferta de isca. Contrariamente, fazer uso de iscas à base de laranja duas vezes não é uma estratégia vantajosa, uma vez que as operárias apresentaram alta taxa de rejeição na segunda oferta.

Colônias maduras do gênero *Atta* possuem profundidade e volume consideravelmente maiores do que as de espécies de *Acromyrmex* (Lopes et al., 2011; Della Lucia et al., 2014). O fato das operárias de *Atta* aqui estudadas não apresentarem rejeição das iscas com extrato de soja na 2º oferta é uma característica importante quando se considera controle biológico de espécies com ninhos grandes, pois a 2º oferta de isca pode aumentar o sucesso da inoculação do princípio ativo no jardim de fungos. A formulação de iscas com extrato de soja como base atrativa é uma alternativa à de polpa cítrica, uma vez que pode mascarar o princípio ativo e burlar o padrão de reconhecimento e aprendizado

associativo (Goes et al, 2020) das operárias em uma situação de ofertas consecutivas de iscas.

Os padrões observados de corte de folhas nos ensaios com minicolônias de *Acromyrmex* e *Atta* aqui estudadas ao longo dos três períodos de tempo demonstraram uma queda progressiva após as duas ofertas de isca com fungos. Esse comportamento não foi observado nos tratamentos controle, os quais mantiveram a mesma taxa de corte, com pouca variação. A relação entre queda no forrageamento de operárias e infecção fúngica por *Escovopsis* é uma associação prevista quando a colônia está combatendo uma patologia (Cremer et al., 2007). Em insetos sociais que possuem ninhos com apenas pequenas aberturas para o ambiente externo, como no caso das formigas cortadeiras, a entrada de organismos patogênicos na colônia ocorre principalmente por contato acidental do microrganismo com o tegumento das formigas operárias forrageadoras (Augustin et al., 2017). Com o propósito de evitar a exposição a novos inóculos patogênicos, o comportamento de forrageio das operárias é diminuído (Cremer et al., 2007), e o corte de material vegetal fresco é afetado.

A produção de lixo gerada pelas operárias de ambas as espécies estudadas no período de tempo que antecedeu às ofertas de iscas foi similar em todos os tratamentos. Porém, após as ofertas das iscas, em *Acromyrmex*, os dois tratamentos de iscas com fungo à base de soja foram os que mais induziram o descarte de lixo. Leguminosas como a soja são vegetais ricos em nutrientes e também uma boa fonte de aminoácidos e nitrogênio orgânico para microrganismos (Ghani et al., 2016). O uso de derivados de soja é comum em meio de culturas como aditivo para favorecer o crescimento de fungos (Silva et al., 1999; Kilikian et al., 2014; Menezes et al., 2017). A utilização do extrato de soja como base das iscas pode ter beneficiado o fungo *Escovopsis*, favorecendo sua estabilidade e germinação no jardim de fungo. Para combater os efeitos do parasitismo no jardim de fungos, as operárias realizam comportamentos de limpeza como *weeding* e *fungus grooming* (Currie & Stuart, 2001), que como consequência aumentam o descarte de lixo, como observado neste trabalho.

O descarte de lixo nos miniformigueiros de *Atta*, assim como em *Acromyrmex*, não apresentou diferenças estatísticas em nenhum tratamento anteriormente às ofertas de iscas. Após as ofertas de iscas, as taxas de descarte de lixo ainda se mantiveram similares na maioria dos tratamentos. Porém, quando

comparamos o descarte de lixo e a taxa de perda de biomassa do jardim de fungos, não há associação direta. Contudo, nos tratamentos com fungo, apesar da taxa de descarte de lixo não ter aumentado após a aplicação das iscas, houve uma queda na taxa de corte de folhas nesses tratamentos. É sabido que os materiais vegetais frescos incorporados no jardim de fungos são recursos essenciais para o cultivo do simbiote (Currie, 2001). Com isso, pode inferir que a queda na incorporação de recurso vegetal, folhas de *A. wilkesiana*, no jardim de fungos somado ao fato das operárias consumirem o recurso provido pelo mesmo fungo simbiote pode ter prejudicado o jardim de fungos, causando a perda de biomassa observada neste trabalho.

CONCLUSÃO

Neste trabalho, operárias de *A. subterraneus subterraneus* parecem reconhecer e associar iscas com *Escovopsis weberi* a uma ameaça para a colônia, uma vez que houve grande rejeição das iscas na 2ª oferta, independente do tipo de base atrativa da isca. Para *Acromyrmex*, o método de controle baseado em uma única oferta de isca é o mais indicado. Por outro lado, operárias de *A. sexdens rubropilosa* parecem ser mais influenciadas pelo tipo de base atrativa do que pelo reconhecimento do fungo como ameaça através do aprendizado associativo, uma vez que na 2ª oferta houve maior aceitação de iscas à base de extrato de soja em relação à isca com base de laranja. Assim, para o controle desta espécie, a utilização de iscas em 2 eventos consecutivos é uma possibilidade, desde que as iscas ofertadas na 1ª e na 2ª aplicação sejam à base de diferentes atrativos.

Dessa forma, as diferenças nos padrões de aceitação de iscas biológicas com microesclerócios do fungo *Escovopsis weberi* em diferentes bases atrativas para *A. sexdens rubropilosa* e *A. subterraneus subterraneus* ressaltam a importância da correta identificação das espécies de formigas cortadeiras, a fim de se estabelecer as melhores estratégias de controle biológico apropriadamente para cada espécie.

Em ambas as espécies de formigas foram observadas influências das iscas contendo o parasita *Escovopsis* em atividades essenciais dos formigueiros, como forrageamento e limpeza da colônia, que acarretaram em perda de biomassa do jardim de fungos, em detrimento da saúde da colônia.

Avaliações no campo necessitam ser realizadas, mas de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, iscas biológicas utilizando como princípio ativo microesclerócios de *Escovopsis* e diferentes estratégias de aplicação para as espécies estudadas de *Acromyrmex* e *Atta*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arenas, A., Roces, F. (2017) Avoidance of plants unsuitable for the symbiotic fungus in leaf-cutting ants: Learning can take place entirely at the colony dump. *PLoS One*. 12(3):e0171388. DOI:10.1371/journal.pone.0171388.
- Augustin, J.O., Simões, T.G., Dijksterhuis, J., Elliot, S.L., Evans, H.C. (2017) Putting the waste out: a proposed mechanism for transmission of the mycoparasite *Escovopsis* between leafcutter ant colonies. *Royal Soc. Open Sci.* 4:161013. DOI:10.1098/rsos.161013.
- Batey, S., Greco, C., Hutchings, M. I., Wilkinson, B. (2020) Chemical warfare between fungus-growing ants and their pathogens. *Curr Opin Chem Biol.* 59:172–181. DOI: 10.1016/j.cbpa.2020.08.001.
- Boaretto, M.A.C., Forti, L.C. (1997) Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. *Série técnica*.11(30):31-46.
- Cardoso, S., Nagamoto, N., Forti, L., Souza, E. (2012) Carrying and effect of granulated baits formulated with entomopathogenic fungi among *Atta sexdens rubropilosa* colonies (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*. 59:681-689.
- Carlos, A.A., Forti, L.C., Camargo, R.S., Moreira, S.M., Verza, S.S., Diniz, E.A. (2009) Attractiveness of different citrus pulps to the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*. 54(3):799-805.

- Castrillo, M., Bich, G., Zapata, P., Villalba, L. (2016) Biocontrol of *Leucoagaricus gongylophorus* of leaf-cutting ants with the mycoparasitic agent *Trichoderma koningiopsis*. *Mycosphere*. 7:810-819. DOI: 10.5943/mycosphere/7/6/12.
- Cocco, P. (2002) On the rumors about the silent spring: review of the scientific evidence linking occupational and environmental pesticide exposure to endocrine disruption health effects. *Cad Saude Publica*. 18(2):379-402.
- Couceiro, J.C., Marcelino, W.L., Amaral, K.D., Gandra, L.C., de Souza, D.J., Della Lucia, T.M.C. (2016) Effects of entomopathogenic fungi on the mortality and immune system of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. *Entomol Exp Appl*. 161:152-159. DOI:10.1111/eea.12500.
- Cremer, S., Armitage, S.A.O., Schmid-Hempel, P. (2007) Social immunity. *Curr Biol*. 17:693–702.
- Currie, C.R., Mueller, U.G., Malloch, D. (1999) The agricultural pathology of ant fungus gardens. *Proc Natl Acad Sci*. 96:7998–8002. DOI:10.1073/pnas.96.14.7998.
- Currie, C.R. (2001) Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. *Oecologia*. 128:99–106. DOI: 10.1007/s004420100630
- Currie, C.R., Stuart, A.E. (2001) Weeding and grooming of pathogen in agriculture by ants. *Proc R Soc B Biol Sci*. 268:1033-1039. DOI:10.1098/rspb.2001.1605.
- Della Lucia, T.M.C., Gandra, L.C., Guedes, R.N.C. (2014) Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. *Pest Manag Sci*. 70:14–23. DOI:10.1002/ps.3660.
- Fowler, H.G., Della Lucia, T.M.C., Moreira, D.D.O. (1993) Posição taxonomica das formigas cortadeiras. *In: Della Lucia, T.M.C. (org) As formigas cortadeiras*. Viçosa: Folha de Viçosa. p 4-25.
- Ghani, M., Kulkarni, K.P., Song, J.T., Shannon, J.G., Lee, J.D. (2016) Soybean Sprouts: A Review of Nutrient Composition, Health Benefits and Genetic Variation. *Plant Breed. Biotechnol*. 4:398-412. DOI: 10.9787/PBB.2016.4.4.398.
- Goes, A.C., Barcoto, M.O., Kooij, P.W., Bueno, O.C., Rodrigues, A. (2020) How do leaf-cutting ants recognize antagonistic microbes in their fungal crops? *Front Ecol Evol*. 8(95):1-13. DOI:10.3389/fevo.2020.00095.
- Jaccoud, D.B., Hughes, W.O.H., Jackson, C.W. (1999) The epizootiology of a *Metarhizium* infection in mini-nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Entomol Exp Appl*. 93:51–61.

- Kilikian, B., Afonso, L.C., Souza, T., Ferreira, R., Pinheiro, I. (2014) Filamentous fungi and media for cellulase production in solid state cultures. *Braz J Microbiol.* 45. 279-86. DOI:10.1590/S1517-83822014005000028.
- Kim, K., Kabir, E., Jahan, S.A. (2017) Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci. Total Environ.* 575:525-535. DOI:10.1016/j.scitotenv.2016.09.009.
- Koifman, S., Hatagima, A. (2003) Agrotóxicos e câncer no Brasil. In: Peres, F., Moreira, J.C. (org) *É veneno ou é remédio?* 1. ed. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, p. 75-99.
- Lima, C.A., Della Lucia, T.M.C., Guedes, R.N.C., Veiga, C.E. (2003) Desenvolvimento de iscas granuladas com atraentes alternativos para *Atta bisphaerica* Forel, (Hymenoptera: Formicidae) e sua aceitação pelas operárias. *Neotrop. Entomol.* 32(3):497-501. DOI:10.1590/S1519-66X2003000300019.
- Lopes, J.F.S., Ribeiro, L.F., Brugger, M.S., Camargo, R.S., Caldato, N., Forti, L.C. (2011) Internal architecture and population size of *Acromyrmex subterraneus molestans* (Hymenoptera, Formicidae) nests: Comparison between a rural and an urban area. *Sociobiology.* 58(3):593-605.
- Menezes, B.S., Rossi, D.M., Ayub, M.A. (2017) Screening of filamentous fungi to produce xylanase and xylooligosaccharides in submerged and solid-state cultivations on rice husk, soybean hull, and spent malt as substrates. *World J Microbiol Biotechnol.* 33(3):58. DOI: 10.1007/s11274-017-2226-5.
- Montoya-Lerma, J., Giraldo-Echeverri, C., Armbrrecht, I., Farji-Brener, A., Calle, Z. (2012) Leaf-cutting ants revisited: Towards rational management and control. *Int J Pest Manag.* 58(3):225-247. DOI:10.1080/09670874.2012.663946.
- Mueller, U.G., Wcislo, W.T. (1998) Nesting biology of the fungus-growing ant *Cyphomyrmex longiscapus* Weber (Attini, Formicidae). *Insectes Soc.* 45:181–189.
- Nagamoto, N.S., Barbieri, R.F., Forti, L.C., Cardoso, S.R.S., Moreira, S.M., Lopes, J.F.S (2011) Attractiveness of copperleaf-based bait to leaf-cutting ants. *Cienc Rural.* 41(6):931-934.
- Palma, A.M.C. (2016) *Iscas biológicas para controle de formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae)*. Trabalho de Conclusão de Curso como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Florestal. Cruz das Almas - BA, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, 42p.

- Ribas, P.P., Matsumura, A.T.S. (2009) A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente. *Revista Liberato*. 10(14):149-158.
- Schowalter, T.D., Ring, D.R. (2017) Biology and Management of the Texas Leafcutting Ant (Hymenoptera: Formicidae). *J Integr Pest Manag*. 8(1):1-8. DOI:10.1093/jipm/pmx013.
- Schultz, T.R., Brady, S.G. (2008) Major evolutionary transitions in ant agriculture. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 105(14):5435–5440.
- Shik, J.Z., Rytter, W., Arnan, X., Michelsen, A. (2018) Disentangling nutritional pathways linking leafcutter ants and their co-evolved fungal symbionts using stable isotopes. *Ecology*. 99(9):1999–2009. DOI:10.1002/ecy.2431
- Silva, E.B., Cavalcanti, M., Souza-Motta, C. (1999) Pathogenicity characteristics of filamentous fungi strains isolated from processed oat. *Braz J Microbiol*. 30:377-380.
- Soares, W.L. (2010) *Uso dos agrotóxicos e seus impactos à saúde e ao ambiente: uma avaliação integrada entre a economia, a saúde pública, a ecologia e a agricultura*. Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências na área de Saúde Pública e Meio Ambiente. FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, 150 p.
- Stefanelli, L.E.P., Mota Filho, T.M.M., Camargo, R.S., Matos, C.A.O., Forti, L.C. (2021) Effects of entomopathogenic fungi on individuals as well as groups of workers and immatures of *Atta sexdens rubropilosa* leaf-cutting ants. *Insects*. 12(1):10. DOI: 10.3390/insects12010010.
- Teixeira, M.L.F., Santos, M.N. (2008) Atratividade da isca granulada de polpa de fruto do jatobá para saúva-limão no campo. *Cienc Rural*. 38(4):907-911.
- Tranter, C., LeFevre, L., Evison, S.E.F., Hughes, W.O.H. (2014) Threat detection: contextual recognition and response to parasites by ants. *Behav. Ecol*. 26(2):396-405.
- Travaglini, R., Stefanelli, L., Arnosti, A., Camargo, R., Camargo, S., Forti, C. (2017) Isca encapsulada atrativa visando controle microbiano de formigas cortadeiras. *Tekhne e Logos*. 8(3):100-111.
- Varanda-Haifig, S.S., Albarici, T.R., Nunes, P.H., Haifig, I., Vieira, P.C., Rodrigues, A. (2017) Nature of the interactions between hypocrealean fungi and the mutualistic fungus of leaf-cutter ants. *Antonie van Leeuwenhoek*. 110:593–605. DOI:10.1007/s10482-016-0826-y.

- Verza, S.S., Forti, L.C., Matos, C.A.O., Garcia, M.G., Nagamoto, N.S. (2006) Attractiveness of citrus pulp and orange albedo extracts to *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*. 47(2):391-399.
- Zanetti, R., Zanuncio, J.C., Santos, J.C., Silva, W.L.P., Ribeiro, G.T., Lemes, P.G. (2014) An overview of integrated management of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in brazilian forest plantations. *Forests*. 5:439-454. DOI:10.3390/f5030439

4. RESUMOS E CONCLUSÕES

O controle biológico de formigas cortadeiras é desafiador, e o desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de inseticidas sintéticos para controle de pragas agrícolas e florestais é uma necessidade cada vez mais urgente, devido a problemáticas ambientais e de saúde pública. Os trabalhos aqui relatados compreendem novas descobertas e diferentes metodologias para controle biológico das formigas cortadeiras.

Quando verificadas as diferenças entre blastosporos e conídios na infecção de *Atta* e *Acromyrmex*, foi observado que ambos são propágulos infectivos e eficientes em reduzir a sobrevivência das operárias. Contudo, em relação à blastosporos, o formulado em emulsão foi mais eficiente do que o formulado apenas em água.

A produção em laboratório de microesclerócios de *Escovopsis weberi* e sua utilização na forma de iscas granuladas atrativas, mostrou potencial de controle de formigas cortadeiras, uma vez que foi mais aceito pelas formigas do que as iscas a base de conídios do mesmo fungo e apresentou efeitos negativos para o jardim de fungos, debilitando a saúde da colônia.

Ao adotar a metodologia de ofertas consecutivas de iscas biológicas de *Escovopsis weberi*, com duas bases atrativas diferentes, extrato de soja e farinha de laranja, foi constatado que as estratégias de utilização diferem para duas espécies de formigas. Uma única oferta de isca pode ser a melhor estratégia para

controle de *Acromyrmex*; enquanto que para *Atta*, o oferecimento de iscas em dois eventos distintos utilizando bases atrativas diferentes, poderá ser mais eficiente para impactar negativamente a colônia.

Os estudos sobre alternativas de controle das formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* e *Acromyrmex subterraneus subterraneus* aqui realizados podem ser empregados como modelos para outras espécies desses gêneros, além de direcionar futuras pesquisas para aprimoramento das metodologias e desenvolvimento de novas tecnologias de controle biológico de formigas cortadeiras.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alkhaibari, A.M., Carolino, A.T., Yavasoglu, S.I., Maffei, T., Mattoso, T.C., Bull, J.C., Samuels, R.I., Butt, T.M. (2016) *Metarhizium brunneum* blastospore pathogenesis in *Aedes aegypti* larvae: attack on several fronts accelerates mortality. *Plos Pathog.* 12(7):1-19.
- Alves, S.B. (1998) *Controle microbiano de insetos*. 2.ed. Piracicaba: FEALQ. 1163p.
- Alves, S.B., Gómez, D.R.S. (1983) Virulência do *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* para duas castas de *Atta sexdens rubropilosa*. *Poliagro.* 5:1–9.
- Angelone, S., Bidochka, M.J. (2018) Diversity and abundance of entomopathogenic fungi at ant colonies. *J Invertebr Pathol.* 156:73-76. DOI:10.1016/j.jip.2018.07.009.
- Arenas, A., Roces, F. (2017) Avoidance of plants unsuitable for the symbiotic fungus in leaf-cutting ants: Learning can take place entirely at the colony dump. *PLoS One.* 12(3):e0171388. DOI:10.1371/journal.pone.0171388.
- Augustin, J.O., Groenewald, J.Z., Nascimento, R.J., Mizubuti, E.S.G., Barreto, R.W., Elliot, S.L., Evans, H.C. (2013) Yet more “weeds” in the garden: fungal novelties from nests of leaf-cutting ants. *PLoS One.* 8(12):822-65.
- Augustin, J.O., Simões, T.G., Dijksterhuis, J., Elliot, S.L., Evans, H.C. (2017) Putting the waste out: a proposed mechanism for transmission of the mycoparasite

- Escovopsis* between leafcutter ant colonies. *Royal Soc. Open Sci.* 4:161013. DOI:10.1098/rsos.161013.
- Batey, S., Greco, C., Hutchings, M. I., Wilkinson, B. (2020) Chemical warfare between fungus-growing ants and their pathogens. *Curr Opin Chem Biol.* 59:172–181. DOI: 10.1016/j.cbpa.2020.08.001.
- Beauvais, A., Latgé, J.P. (2018) Special issue: Fungal cell wall. *J. Fungi.* 4:91. DOI:10.3390/jof4030091.
- Bellows, T.S., Fisher, T.W. (1999) *Handbook of Biological Control: Principles and Applications of Biological Control.* 2. Ed. San Diego, California: Academic Press, 1046p.
- Boaretto, M.A.C., Forti, L.C. (1997) Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. *Série técnica.*11(30):31-46.
- Bonadies, E., Wcislo, W.T., Gálvez, D., Hughes, W.H.O., Fernández-Marín, H. (2019) Hygiene defense behaviors used by a fungus-growing ant depend on the fungal pathogen stages. *Insects.* 10(5):130-136. DOI:10.3390/insects10050130.
- Bot, A.N.M., Currie, C.R., Hart, A.G., Boomsma, J.J. (2001) Waste management in leaf-cutting ants. *Ethol Ecol Evol.* 13(3):225-237. DOI:10.1080/08927014.2001.9522772.
- Bot, A.N.M., Ortius-Lechner, D., Finster, K., Maile, R., Boomsma, J.J. (2002) Variable sensitivity of fungi and bacteria to compounds produced by the metapleural glands of leaf-cutting ants. *Insectes Soc.* 49:363–370. DOI: 10.1007/PL00012660.
- Boucias, D., Pedland, J. (1991) Attachment of mycopathogens to cuticle. The initial events of mycoses in arthropod hosts. *In: Cole G., Hoch H., (org) The Fungal Spore and Disease Initiation in Plant and Animals.* 1. ed. Boston, MA, USA: Springer, p.101–127.
- Boyette, C.D., Abbas, H.K., Johnson, B., Hoagland, R.E., Weaver, M.A. (2014) Biological control of the weed *Sesbania exaltata* using a microsclerotia formulation of the bioherbicide *Colletotrichum truncatum*. *Am J Plant Sci.* 5:2672–2685. DOI:10.4236/ajps.2014.518282.
- Britto, J.S., Forti, L.C., Oliveira, M.A., Zanetti, R., Wilcken, C.F., Zanuncio, J.C., Loeck, A.E., Caldato, N., Nagamoto, N.S., Lemes, P.G., Camargo, R.S., (2016) Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. *Int. J. Res. Environ. Stud.* 3:11-92.

- Cardoso, S., Nagamoto, N., Forti, L., Souza, E. (2012) Carrying and effect of granulated baits formulated with entomopathogenic fungi among *Atta sexdens rubropilosa* colonies (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*. 59:681-689.
- Carlos, A.A., Forti, L.C., Camargo, R.S., Moreira, S.M., Verza, S.S., Diniz, E.A. (2009) Attractiveness of different citrus pulps to the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*. 54(3):799-805.
- Carolino, A.T., Gomes, S.A., Teodoro, T.B.P., Mattoso, T.C., Samuels, R.I. (2019) *Aedes aegypti* pupae are highly susceptible to infection by *Metarhizium anisopliae* blastospores. *J Pure Appl Microbiol*. 13:1629-1634.
- Carson, R. (1962) *Silent Spring*. 2. Ed. Greenwich, Connecticut: CrestBook Fawcett Publications, 304p.
- Castilho, A., Conteiro, M., Fraga, M.E., Aguiar-Menezes, E.L., Rosa, C.A.R. (2010) Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* patogênicos a soldados de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa* em condições de laboratório. *Cienc. Rural*. 40(6):1243-1249. DOI:10.1590/S0103-84782010005000100.
- Castrillo, M., Bich, G., Zapata, P., Villalba, L. (2016) Biocontrol of *Leucoagaricus gongylophorus* of leaf-cutting ants with the mycoparasitic agent *Trichoderma koningiopsis*. *Mycosphere*. 7:810-819. DOI: 10.5943/mycosphere/7/6/12.
- Catalani, G.C., Sousa, K.K.A., Camargo, R.S., Caldato, N., Matos, C.A.O., Forti, L.C. (2019) Chemical control of leaf-cutting ants: how do workers disperse toxic bait fragments onto fungus garden? *Rev Bras Entomol*. 63(4):290-295. DOI:10.1016/j.rbe.2019.09.004.
- Charnley, A. (2003) Fungal pathogens of insects: cuticle degrading enzymes and toxins. *Adv Bot Res*. 40:241-321. DOI:10.1016/S0065-2296(05)40006-3.
- Cherrett, J.M. (1986) The economic importance and control of leaf-cutting ants. In: Vinson, S.B. (org) *Economic impact and control of social insects*. 2. Ed. Praeger, New York, p.165-192.
- Chet, I., Henis, Y., Kislev, N. (1969) Ultrastructure of sclerotia and hyphae of *Sclerotium rorfsii* Sacc. *J Gen Microbiol*. 57:143-147.
- Choi, Y.W., Hyde, K.D., Ho, W.H. (1999) Single spore isolation of fungi. *Fungal Divers*. 3:29-38.

- Cocco, P. (2002) On the rumors about the silent spring: review of the scientific evidence linking occupational and environmental pesticide exposure to endocrine disruption health effects. *Cad Saude Publica*. 18(2):379-402.
- Coley-Smith, J.R., Cooke, R.C. (1971) Survival and germination of fungal sclerotia. *Annu Rev Phytopathol*. 9:65-92. DOI:10.1146/annurev.py.09.090171.000433.
- Couceiro, J.C., Marcelino, W.L., Amaral, K.D., Gandra, L.C., de Souza, D.J., Della Lucia, T.M.C. (2016) Effects of entomopathogenic fungi on the mortality and immune system of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. *Entomol Exp Appl*. 161:152-159. DOI:10.1111/eea.12500.
- Cremer, S., Armitage, S.A.O., Schmid-Hempel, P. (2007) Social immunity. *Curr Biol*. 17:693–702.
- Currie, C.R. (2001a) Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. *Oecologia*. 128:99–106. DOI: 10.1007/s004420100630.
- Currie, CR. (2001b) A community of ants, fungi, and bacteria: a multilateral approach to studying symbiosis. *Annu Rev Microbiol*. 55:357-380. DOI:10.1146/annurev.micro.55.1.357.
- Currie, C.R., Mueller, U.G., Malloch, D. (1999) The agricultural pathology of ant fungus gardens. *Proc Natl Acad Sci*. 96:7998–8002. DOI:10.1073/pnas.96.14.7998.
- Currie, C.R., Stuart, A.E. (2001) Weeding and grooming of pathogen in agriculture by ants. *Proc R Soc B Biol Sci*. 268:1033-1039. DOI:10.1098/rspb.2001.1605.
- DeBach, P., Rosen, D. (1991) *Biological control by natural enemies*. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 440p.
- Delabie, J.H.C., Della Lucia, T.M.C., Pastre, L. (2010) Protocolo de experimentação para avaliar a atratividade de novas formulações de iscas granuladas utilizadas no controle das formigas cortadeiras *Acromyrmex* spp. e *Atta* spp. (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini) no campo. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*. 29(4):843-848.
- Della Lucia, T.M.C. (1993) *As formigas cortadeiras*. 1. Ed. Editora Folha de Viçosa, Viçosa: 262p.
- Della Lucia, T.M.C. (2003) Hormigas de importancia económica en la region neotropical. In: Fernandez, F. (org) *Introducción a las hormigas de la region neotropical*. 1. ed. Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt, p. 337-349.

- Della Lucia, T.M.C., Gandra, L.C., Guedes, R.N.C. (2014) Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. *Pest Manag Sci.* 70:14–23. DOI:10.1002/ps.3660.
- Diehl-Fleig, E. (1995) *Formigas: organização social e ecologia comportamental*. São Leopoldo, RS: Ed Unisinos. 168 pp.
- Diehl-Fleig, E., Lucchese, M.E. (1991) Reações comportamentais de operárias de *Acromyrmex striatus* (Hymenoptera, Formicidae) na presença de fungos entomopatogênicos. *Rev Bras Entomol.* 35:101–107.
- Dornelas, A.S.P., Sarmiento, R.A., Pedro-Neto, M., Silva, D.G., Santos, G.R., Nascimento, M.O., Oliveira, C.A., Souza, D.J. (2017) Susceptibility of *Atta sexdens* worker ants treated with the immunosuppressant Sandimmun Neoral to *Metarhizium anisopliae*. *Pesqui Agropecu Bras.* 52(2):133-136. DOI:10.1590/s0100-204x2017000200008.
- Erthal, M., Silva, C.P., Cooper, R.M., Samuels, R.I. (2009) Hydrolytic enzymes of leaf-cutting ant fungi. *Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol.* 152(1):54-59. DOI:10.1016/j.cbpb.2008.09.086.
- Fernandez-Marín, H., Zimmerman, J.K., Rehner, S.A., Wcislo, W.T. (2006) Active use of the metapleural glands by ants in controlling fungal infection. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 273:1689–1695. DOI:10.1098/rspb.2006.3492.
- Fernández-Marín, H., Zimmerman, J.K., Nash, D., Boomsma, J., Wcislo, W. (2009) Reduced biological control and enhanced chemical pest management in the evolution of fungus farming ants. *Proc Biol Sci.* 276:2263-2269. DOI:10.1098/rspb.2009.0184.
- Flury, M. (1996) Experimental evidence of transport of pesticides through field soils - A review. *J Environ Qual.* 25:25-45. DOI:10.2134/jeq1996.00472425002500010005x.
- Folgarait, P.J., Goffré, D., Osorio, A.G. (2020) *Beauveria bassiana* for the control of leafcutter ants: strain and host differences. *Biocontrol Sci Technol.* 30:(9):996-1005. DOI: 10.1080/09583157.2020.1772199
- Folgarait, P.J., Gorosito, N., Poulsen, M., Currie, C.R. (2011) Preliminary in vitro insights into the use of natural fungal pathogens of leaf-cutting ants as biocontrol agents. *Curr Microbiol.* 63(3):250–258. DOI:10.1007/s00284-011-9944-y.

- Fowler, H.G., Della Lucia, T.M.C., Moreira, D.D.O. (1993) Posição taxonomica das formigas cortadeiras. *In: Della Lucia, T.M.C. (org) As formigas cortadeiras.* Viçosa: Folha de Viçosa. p 4-25.
- Ghani, M., Kulkarni, K.P., Song, J.T., Shannon, J.G., Lee, J.D. (2016) Soybean Sprouts: A Review of Nutrient Composition, Health Benefits and Genetic Variation. *Plant Breed. Biotechnol.* 4:398-412. DOI: 10.9787/PBB.2016.4.4.398.
- Goble, T.A., Hajek, A.E., Jackson, M.A., Gardescu, S. (2015) *Metarhizium brunneum* F52 applied in hydromulch for control of asian longhorned beetles (Coleoptera: Cerambycidae). *J Econ Entomol.* 108:433–443. DOI:10.1093/jee/tov013.
- Goes, A.C., Barcoto, M.O., Kooij, P.W., Bueno, O.C., Rodrigues, A. (2020) How do leaf-cutting ants recognize antagonistic microbes in their fungal crops? *Front Ecol Evol.* 8(95):1-13. DOI:10.3389/fevo.2020.00095.
- Goffré, D., Cavallo, E.C., Cavalitto, S.F., Folgarait, P.J. (2018) Selection and yield optimisation of a *Beauveria bassiana* isolate for the biological control of leaf cutter ants. *Biocontrol Sci Technol.* 28(7):672-687. DOI:10.1080/09583157.2018.1479730.
- Goffré, D., Folgarait, P.J. (2015) *Purpureocillium lilacinum*, potential agent for biological control of the leaf-cutting ant *Acromyrmex lundii*. *J Invertebr Pathol.* 130:107–115. DOI:10.1016/j.jip.2015.07.008.
- Guarda, C., Lutinski, J. (2020) Glandular secretions of ants (Hymenoptera: Formicidae): A review on extraction, chemical characterization and antibiotic potential. *Sociobiology.* 67(1):13-25. DOI:10.13102/sociobiology.v67i1.4277.
- Haifig, S.S., Albarici, T.R., Nunes, P.H., Haifig, I., Vieira, P.C., Rodrigues, A. (2017) Nature of the interactions between hypocrealean fungi and the mutualistic fungus of leaf-cutter ants. *Antonie van Leeuwenhoek.* 110(4):593–605. DOI:10.1007/s10482-016-0826-y.
- Hart, A.G., Bot, A.N.M., Brown, M.J.F. (2002) A colony-level response to disease control in a leaf-cutting ant. *Naturwissenschaften.* 89(6):275-7. DOI:10.1007/s00114-002-0316-0.
- Heine, D., Holmes, N.A., Worsley, S.F., Santos, A.C.A., Innocent, T.M., Scherlach, K., Patrick, E.H., Yu, D.W., Murrell, J.C., Vieria, P.C., Boomsma, J.J., Hertweck, C., Hutchings, M.I., Wilkinson, B. (2018) Chemical warfare between leafcutter ant

- symbionts and a co-evolved pathogen. *Nat. Commun.* 9:2208. DOI:10.1038/s41467-018-04520-1.
- Holder, D.J., Keyhani, N.O. (2005) Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria* (Cordyceps) *bassiana* to substrata. *Appl Environ Microbiol.* 71(9):5260-5266. DOI: 10.1128/AEM.71.9.5260-5266.2005.
- Holder, D.J., Kirkland, B.H., Lewis, M.W., Keyhani, N.O. (2007) Surface characteristics of the entomopathogenic fungus *Beauveria* (Cordyceps) *bassiana*. *Microbiology.* 153:3448-3457. DOI:10.1099/mic.0.2007/008524-0.
- Hölldobler, B., Wilson, E.O. (1990) *The ants*. 1. Ed. Cambridge, Massachusetts: The Belknap Press of Harvard University. 732p.
- Huarte-Bonnet, C., Paixão, F.R.S., Mascarin, G.M., Santana, M., Fernandes, E.K.K., Pedrini, N. (2019) The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* produces microsclerotia-like pellets mediated by oxidative stress and peroxisome biogenesis. *Environ Microbiol Rep.* 11(4):518–524. DOI:10.1111/1758-2229.12742.
- Huffaker, C.B., Messenger, P.S. (1976) *Theory and Practice of Biological Control*. 2. Ed. New York: Academic Press, 788p.
- Hughes, W.O.H., Thomsen, L., Eilenberg, J., Boomsma, J.J. (2004) Diversity of entomopathogenic fungi near leaf-cutting ant nests in a neotropical forest, with particular reference to *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *J Invertebr Pathol.* 85(1):46-53. DOI:10.1016/j.jip.2003.12.005.
- Jaccoud, D.B., Hughes, W.O.H., Jackson, C.W. (1999) The epizootiology of a *Metarhizium* infection in mini-nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Entomol Exp Appl.* 93:51–61.
- Jackson, M.A., Dunlap, C.A., Jaronski, S.T. (2010) Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *BioControl.* 55:129–145. DOI:10.1007/s10526-009-9240-y.
- Jackson, M.A., Jaronski, S.T. (2009) Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. *Mycol Res.* 113:842–850. DOI:10.1016/j.mycres.2009.03.004.
- Jackson, M.A., McGuire, M.R., Lacey, L.A., Wraight, S.P. (1997) Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus

- Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycol Res.* 101(1):35-41
DOI:10.1017/S0953756296002067.
- Jackson, M.A., Schisler, D.A. (1995) Liquid culture production of microsclerotia of *Colletotrichum truncatum* for use as bioherbicidal propagules. *Mycol Res.* 99:879–884. DOI:10.1016/s0953-7562(09)80745-4.
- Juruena, L.F. (1980) As formigas cortadeiras. *Ipagro Informa.* 23:3-17.
- Kandasamy, D., Gershenzon, J., Andersson, M.N., Hammerbacher, A. (2019) Volatile organic compounds influence the interaction of the eurasian spruce bark beetle (*Ips typographus*) with its fungal symbionts. *The ISME Journal.* 13(7):1. DOI:10.1038/s41396-019-0390-3.
- Kilikian, B., Afonso, L.C., Souza, T., Ferreira, R., Pinheiro, I. (2014) Filamentous fungi and media for cellulase production in solid state cultures. *Braz J Microbiol.* 45. 279-86. DOI:10.1590/S1517-83822014005000028.
- Kim, J.S., Je, Y.H., Skinner, M., Parker, B.L. (2013) An oil-based formulation of *Isaria fumosorosea* blastospores for management of greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). *Pest Manag Sci.* 69(5):576-81. DOI: 10.1002/ps.3497.
- Kim, K., Kabir, E., Jahan, S.A. (2017) Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci. Total Environ.* 575:525-535. DOI:10.1016/j.scitotenv.2016.09.009.
- Koagan, M. (1998) Integrated pest management: Historical perspectives and contemporary developments. *Annu. Rev. Entomol.* 43:243-270.
- Kobori, N.N., Mascarin, G.M., Jackson, M.A., Schisler, D.A. (2015) Liquid culture production of microsclerotia and submerged conidia by *Trichoderma harzianum* active against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*. *Fungal Biol.* 119(4):179-90. DOI:10.1016/j.funbio.2014.12.005.
- Koifman, S., Hatagima, A. (2003) Agrotóxicos e câncer no Brasil. In: Peres, F., Moreira, J.C. (org) *É veneno ou é remédio?* 1. ed. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, p. 75-99.
- Laabs, V., Amelung, W., Pinto, A., Zech, W. (2002) Fate of pesticides in tropical soils of Brazil under field conditions. *J Environ Qual.* 31(1):256-68. DOI:10.2134/jeq2002.0256.
- Lacey, L.A., Frutos, R., Kaya, H.K., Vails, P. (2001) Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? *Biol Control.* 21:230–248.

- Lima, C.A., Della Lucia, T.M.C., Guedes, R.N.C., Veiga, C.E. (2003) Desenvolvimento de iscas granuladas com atraentes alternativos para *Atta bisphaerica* Forel, (Hymenoptera: Formicidae) e sua aceitação pelas operárias. *Neotrop. Entomol.* 32(3):497-501. DOI:10.1590/S1519-66X2003000300019.
- Little, A.E.F., Murakami, T., Mueller, U.G., Currie, C.R. (2006) Defending against parasites: fungus-growing ants combine specialized behaviours and microbial symbionts to protect their fungus gardens. *Biol Lett.* 2(1):12-6. DOI:10.1098/rsbl.2005.0371.
- Lopes, J.F.S., Ribeiro, L.F., Brugger, M.S., Camargo, R.S., Caldato, N., Forti, L.C. (2011) Internal architecture and population size of *Acromyrmex subterraneus molestans* (Hymenoptera, Formicidae) nests: Comparison between a rural and an urban area. *Sociobiology.* 58(3):593-605.
- Lopez, E., Orduz, S. (2003) *Metarhizium anisopliae* and *Trichoderma viride* for control of nests of the fungus-growing ant, *Atta cephalotes*. *Biol Control.* 27(2):194-200. DOI:10.1016/S1049-9644(03)00005-7.
- Loureiro, E., Monteiro, A. (2005) Pathogenicity of isolates of three entomopathogenic fungi against soldiers of *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera : Formicidae). *Revista Árvore.* 29:553-561.
- Machado, V., Diehl-Fleig, E., Silva, M.E. Lucchese, M.E. (1988) Reações observadas em colônias de algumas espécies de *Acromyrmex* (Hymenoptera - Formicidae) quando inoculados com fungos entomopatogênicos. *Cienc Cult.* 40: 1106–1108.
- Maina, U.M., Galadima, I.B., Gambo, F.M., Zakaria, D. (2018) A review on the use of entomopathogenic fungi in the management of insect pests of field crops. *J Entomol Zool Stud.* 6(1):27-32.
- Marfetan, J.R., Romero, A.I., Folgarait, P.J. (2015) Pathogenic interaction between *Escovopsis weberi* and *Leucoagaricus* sp.: mechanisms involved and virulence levels. *Fungal Ecol.* 17:52-61. DOI:10.1016/j.funeco.2015.04.002.
- Mariconi, F.A.M. (1970) *As saúvas*. 2. Ed. São Paulo, SP: Agronômica Ceres. 167p.
- Martin, M.M., Martin, J.S. (1970) The biochemical basis for the symbiosis between the ant, *Atta colombica tonsiper* and its food fungus. *J Insect Physiol.* 16:109–119.
- Mascarin, G.M., Kobori, N.N., Vital, R.C.J., Jackson, M.A., Quintela, E.D. (2013) Production of microsclerotia by Brazilian strains of *Metarhizium* spp. using

- submerged liquid culture fermentation. *World J Microbiol Biotechnol.* 30(5):1583-1590. DOI:10.1007/s11274-013-1581-0.
- Mascarin, G.M., Lopes, R.B., Delalibera Í.Jr., Fernandes, E.K.K., Luz, C., Faria, M. (2018) Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. *J Invertebr Pathol.* 165:46-53. DOI: 10.1016/j.jip.2018.01.001.
- Mattoso, T.C., Moreira, D.D.O., Samuels, R.I. (2011) Symbiotic bacteria on the cuticle of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* protect workers from attack by entomopathogenic fungi. *Biol Lett.* 8:461-474. DOI:10.1098/rsbl.2011.0963.
- Mazzarello, P., Garbarino, C., Cani, V. (2013) *Bassi, Agostino*. John Wiley & Sons. 2013:1-6. DOI:10.1002/9780470015902.a0025074.
- Menezes, B.S., Rossi, D.M., Ayub, M.A. (2017) Screening of filamentous fungi to produce xylanase and xylooligosaccharides in submerged and solid-state cultivations on rice husk, soybean hull, and spent malt as substrates. *World J Microbiol Biotechnol.* 33(3):58. DOI: 10.1007/s11274-017-2226-5.
- Meyling, N.V., Eilenberg, J. (2007) Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biol Control.* 43:145–155.
- Miranpuri, G.S., Khachatourians, G.G. (1990) Larvicidal activity of blastospores and conidiospores of *Beauveria bassiana* (strain GK 2016) against age groups of *Aedes aegypti*. *Vet Parasitol.* 37(2):155-162.
- Moisan, K., Cordovez, V., Zande, E.M.V., Raaijmakers, J.M., Dicke, M., Barbosa, D.L. (2019) Volatiles of pathogenic and non-pathogenic soil-borne fungi affect plant development and resistance to insects. *Oecologia.* 190:589–604. DOI:10.1007/s00442-019-04433-w.
- Montoya-Lerma, J., Giraldo-Echeverri, C., Armbrrecht, I., Farji-Brener, A., Calle, Z. (2012) Leaf-cutting ants revisited: Towards rational management and control. *Int J Pest Manag.* 58(3):225-247. DOI:10.1080/09670874.2012.663946.
- Moreira, D.D.O., Erthal, M., Carrera, M.S., Samuels, R.I. (2006) Oral trophallaxis in adult leaf-cutting ants *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera:Formicidae). *Insectes Soc.* 53:345-348

- Mueller, U.G., Wcislo, W.T. (1998) Nesting biology of the fungus-growing ant *Cyphomyrmex longiscapus* Weber (Attini, Formicidae). *Insectes Soc.* 45:181–189.
- Moreira, J.C., Jacob, S.C., Peres, F., Lima, J.S., Meyer, A., Oliveira-Silva, J.J., Sarcinelli, P.N., Batista, D.F., Egler, M., Faria, M.V.C., Araújo, A.J., Kubota, A.H., Soares, M.O., Alves, S.R., Moura, C.M., Curi, R. (2002) Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. *Cien Saude Colet.* 7(2):299-311.
- Mueller, U.G., Gerardo, N.M., Aanen, D.K., Six, D.L., Schultz, T.R. (2005) The evolution of agriculture in insects. *Annu Rev Ecol Evol Syst.* 36(1):563-595.
- Murdoch, W.W., Chesson, J., Chersson, P.L. (1985) Biological control in theory and practice. *Am. Nat.* 125(3):344-366.
- Nagamoto, N.S., Barbieri, R.F., Forti, L.C., Cardoso, S.R.S., Moreira, S.M., Lopes, J.F.S (2011) Attractiveness of copperleaf-based bait to leaf-cutting ants. *Cienc Rural.* 41(6):931-934.
- Neves, P.M.O.J., Alves, S.B. (2004) External events related to the infection process of *Cornitermes cumulans* (Kollar) (Isoptera: Termitidae) by the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Neotrop Entomol.* 33(1):051-056.
- Palma, A.M.C. (2016) *Iscas biológicas para controle de formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae)*. Trabalho de Conclusão de Curso como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Florestal. Cruz das Almas - BA, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, 42p.
- Prokopy, R., Kogan, M. (2003) Integrated Pest Management. *In: Resh, V.H., Cardé, R.T. (org) Encyclopedia of Insects.* 1. Ed. San Diego, California: Academic Press, p. 589–594.
- Qiu, H-L., Fox, E.G.P., Qin, C-S., Zhao, D-Y., Yang, H., Xu, J-Z. (2019) Microcapsuled entomopathogenic fungus against fire ants, *Solenopsis invicta*. *Biol Control.* 134:141-149. DOI:10.1016/j.biocontrol.2019.03.018.
- Quinlan, R.J., Cherrett, J.M. (1979) The role of the fungus in the diet of the leafcutting ant *Atta cephalotes*. *Ecol Entomol.* 4(2):151–160. DOI:10.1111/j.1365-2311.1979.

- Reynolds, H.T., Currie, C.R. (2004) Pathogenicity of *Escovopsis weberi*: The parasite of the attine ant-microbe symbiosis directly consumes the ant-cultivated fungus. *Mycologia*. 96(5):955–959.
- Ribas, P.P., Matsumura, A.T.S. (2009) A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente. *Revista Liberato*. 10(14):149-158.
- Ribeiro, M.M.R., Amaral, K.D., Seide, V.E., Souza, B.M.R., Della Lucia, T.M.C., Kasuya, M.C.M., Souza, D.J. (2012) Diversity of fungi associated with *Atta bisphaerica* (Hymenoptera: Formicidae): The activity of *Aspergillus ochraceus* and *Beauveria bassiana*. *Psyche*. Volume 2012. Article ID 389806. DOI:10.1155/2012/389806.
- Riquelme, M., Aguirre, J., Bartnicki-García, S., Braus, G.H., Feldbrügge, M., Fleig, U., Hansberg, W., Herrera-Estrella, A., Kämper, J., Kück, U., Mouriño-Pérez, R.R., Takeshita, N., Fischer, R. (2018) Fungal morphogenesis, from the polarized growth of hyphae to complex reproduction and infection structures. *Microbiol Mol Biol Rev*. 79:243–262. DOI:10.1128/MMBR.00068-17.
- Samuels, R.I., Mattoso, T.C., Moreira, D.D.O. (2013) Chemical warfare: Leaf-cutting ants defend themselves and their gardens against parasite attack by deploying antibiotic secreting bacteria. *Commun Integr Biol*. 6(2):e23095. DOI:10.4161/cib.23095.
- Samuels, R.I., Paula, A., Carolino, A., Gomes, S., Paula, C., Cypriano, M., Silva, L., Ribeiro, A., Bastos, J., Peres, C. (2016) Entomopathogenic organisms: conceptual advances and real-world applications for mosquito biological control. *Open access insect physiol*. 6:25-31 DOI:10.2147/OAIP.S68850.
- Schowalter, T.D., Ring, D.R. (2017) Biology and Management of the Texas Leafcutting Ant (Hymenoptera: Formicidae). *J Integr Pest Manag*. 8(1):1-8. DOI:10.1093/jipm/pmx013.
- Schultz, T.R., Brady, S.G. (2008) Major evolutionary transitions in ant agriculture. *Proc Natl Acad Sci*. 105(14):5435–5440.
- Shah, P.A., Pell, J.K. (2003) Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl Microbiol Biotechnol*. 61:413–423. DOI 10.1007/s00253-003-1240-8.
- Shearer, J.F., Jackson, M.A. (2006) Liquid culturing of microsclerotia of *Mycocleptodiscus terrestris*, a potential biological control agent for the management of hydrilla. *Biol Control*. 38(3):298–306. DOI:10.1016/j.biocontrol.2006.04.012.

- Shik, J.Z., Rytter, W., Arnan, X., Michelsen, A. (2018) Disentangling nutritional pathways linking leafcutter ants and their co-evolved fungal symbionts using stable isotopes. *Ecology*. 99(9):1999–2009. DOI:10.1002/ecy.2431
- Silva, A., Rodrigues, A., Bacci Jr, M., Pagnocca, F.C., Bueno, O.C. (2006) Susceptibility of the ant-cultivated fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales: Basidiomycota) towards microfungi. *Mycopathologia*. 162:115-119. DOI:10.1007/s11046-006-0037-6.
- Silva, E.B., Cavalcanti, M., Souza-Motta, C. (1999) Pathogenicity characteristics of filamentous fungi strains isolated from processed oat. *Braz J Microbiol*. 30:377-380.
- Silva, G.E., Machado, V., Diehl-Fleig, E., Silva, M.E., Specht, A. (1993) Potencial de *Beauveria bassiana* como agente de controle das formigas cortadeiras em áreas de reflorestamento. *Acta Biol. Leopold*. 15:87–94.
- Smith, M.E., Henkel, T.W., Rollins, J.A. (2014) How many fungi make sclerotia? *Fungal Ecol*. 13:211-220. DOI:10.1016/j.funeco.2014.08.010.
- Soares, W.L. (2010) *Uso dos agrotóxicos e seus impactos à saúde e ao ambiente: uma avaliação integrada entre a economia, a saúde pública, a ecologia e a agricultura*. Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências na área de Saúde Pública e Meio Ambiente. FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, 150 p.
- Soares, W.L., Porto, M.F.S. (2009) Estimating the social cost of pesticide use: An assessment from acute poisoning in Brazil. *Ecol. Econ.*, 68:2721–2728. DOI:10.1016/j.ecolecon.2009.05.008.
- Song, Z.Y. (2018) Fungal microsclerotia development: essential prerequisites, influencing factors and molecular mechanism. *Appl Microbiol Biotechnol*. 102(23):9873–9880. DOI:10.1007/s00253-018-9400-z.
- Song, Z.Y., Shen, L., Zhong, Q., Yin, Y.P., Wang, Z.K. (2016) Liquid culture production of microsclerotia of *Purpureocillium lilacinum* for use as bionematicide. *Nematol*. 18(6):719–726. DOI:10.1163/15685411-00002987.
- Song, Z.Y., Yin, Y.P., Jiang, S.S., Liu, J.J., Wang, Z.K. (2014) Optimization of culture medium for microsclerotia production by *Nomuraea rileyi* and analysis of their viability for use as a mycoinsecticide. *BioControl*. 59:597–605. DOI:10.1007/s10526-014-9589-4.
- Stefanelli, L.E.P., Mota Filho, T.M.M., Camargo, R.S., Matos, C.A.O., Forti, L.C. (2021) Effects of entomopathogenic fungi on individuals as well as groups of

- workers and immatures of *Atta sexdens rubropilosa* leaf-cutting ants. *Insects*. 12(1):10. DOI: 10.3390/insects12010010.
- Taerum, S.J., Cafaro, M.J., Little, A.E., Schultz, T.R., Currie, C.R. (2007) Low host-pathogen specificity in the leaf-cutting ants microbe symbiosis. *Proc. R. Soc. Lond.* 274:1971-1978. DOI:10.1098/rspb.2007.0431.
- Tartar, A., Shapiro, A.M., Scharf, D.W., Boucias, D.G. (2005) Differential expression of chitin synthase (CHS) and glucan synthase (FKS) genes correlates with the formation of a modified, thinner cell wall in in vivo-produced *Beauveria bassiana* cells. *Mycopathologia*. 160:303–314.
- Teixeira, M.L.F., Santos, M.N. (2008) Atratividade da isca granulada de polpa de fruto do jatobá para saúva-limão no campo. *Cienc Rural*. 38(4):907-911.
- Tranter, C., LeFevre, L., Evison, S.E.F., Hughes, W.O.H. (2014) Threat detection: contextual recognition and response to parasites by ants. *Behav. Ecol*. 26(2):396-405.
- Travaglini, R., Stefanelli, L., Arnosti, A., Camargo, R., Camargo, S., Forti, C. (2017) Isca encapsulada atrativa visando controle microbiano de formigas cortadeiras. *Tekhne e Logos*. 8(3):100-111.
- Varanda-Haifig, S.S., Albarici, T.R., Nunes, P.H., Haifig, I., Vieira, P.C., Rodrigues, A. (2017) Nature of the interactions between hypocrealean fungi and the mutualistic fungus of leaf-cutter ants. *Antonie van Leeuwenhoek*. 110:593–605. DOI:10.1007/s10482-016-0826-y.
- Verza, S.S., Forti, L.C., Matos, C.A.O., Garcia, M.G., Nagamoto, N.S. (2006) Attractiveness of citrus pulp and orange albedo extracts to *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*. 47(2):391-399.
- Vigueras, G., Paredes-Hernandez, D., Revah, S., Valenzuela, J., Olivares-Hernandez, R., Le Borgne, S. (2017) Growth and enzymatic activity of *Leucoagaricus gongylophorus*, a mutualistic fungus isolated from the leaf-cutting ant *Atta mexicana*, on cellulose and lignocellulosic biomass. *Lett. Appl. Microbiol*. 65(2):173-181. DOI:10.1111/lam.12759.
- Villamizar, L.F., Nelson, T.L., Jones, S.A., Jackson, T.A., Hurst, M.R.H., Marshall, S.D.G. (2018) Formation of microsclerotia in three species of *Beauveria* and storage stability of a prototype granular formulation. *Biocontrol Sci Technol*. 28(12):1-17. DOI:10.1080/09583157.2018.1514584.

- Weber, N.A. (1972) *Gardening Ants: The Attines*. Series Memoirs of the American Philosophical Society. American Philosophical Society. v. 92. 146 pp.
- Wilson, E.O. (1971) *The insect societies*. Cambridge, MA: Belknap Harvard University Press, 548p.
- Yek, S.H., Boomsma, J.J., Poulsen, M. (2012) Towards a Better Understanding of the Evolution of Specialized Parasites of Fungus-Growing Ant Crops. *Psyche*. 239392:10. DOI:10.1155/2012/239392.
- Zanetti, R., Zanuncio, J.C., Santos, J.C., Silva, W.L.P., Ribeiro, G.T., Lemes, P.G. (2014) An overview of integrated management of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in brazilian forest plantations. *Forests*. 5:439-454. DOI:10.3390/f5030439