

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
DEPARTAMENTO DE DEFESA FITOSSANITÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL**

Mateus Alves Saldanha

**EFICIÊNCIA DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS NO CONTROLE
BIOLÓGICO DE *Acromyrmex heyeri* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE,
MYRMICINAE)**

Santa Maria, RS
2022

Mateus Alves Saldanha

EFICIÊNCIA DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE *Acromyrmex heyeri* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE, MYRMICINAE)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Florestal**.

Orientador: Prof. Dr. Ervandil Corrêa Costa

Santa Maria, RS
2022

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Saldanha, Mateus Alves

EFICIÊNCIA DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE *Acromyrmex heyeri* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE, MYRMICINAE) / Mateus Alves Saldanha.- 2022.

77 p.; 30 cm

Orientador: Ervandil Corrêa Costa
Coorientadora: Marlove Fátima Brião Muniz

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2022

1. *Acromyrmex* 2. *Beauveria bassiana* 3. Controle biológico 4. *Cordyceps fumosorosea* 5. *Metarhizium anisopliae* I. Corrêa Costa, Ervandil II. Brião Muniz, Marlove Fátima III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, MATEUS ALVES SALDANHA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela universidade, entre outras consequências legais.

Mateus Alves Saldanha

EFICIÊNCIA DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE *Acromyrmex heyeri* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE, MYRMICINAE)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Florestal**.

Aprovado em 15 de fevereiro de 2022:



Ervandil Corrêa Costa, Dr. (UFSM) - Videoconferência
(Presidente/Orientador)



Gerusa Pauli Kist Steffen, Dr^a. (DDPA) - Videoconferência



Dayanna do Nascimento Machado, Dr^a. (FACEM) - Videoconferência

Santa Maria, RS
2022

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal (PPGEF), pela formação e estrutura que proporcionou a realização deste trabalho, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Ao professor Ervandil Corrêa Costa, pela oportunidade oferecida no Laboratório de Entomologia Florestal desde o início da graduação, pelo apoio e dedicação ao me orientar, pela confiança em meu trabalho, bem como pelos seus ensinamentos, que contribuíram para meu desenvolvimento pessoal e profissional. Da mesma forma, agradeço à professora Marlove Fátima Brião Muniz, pela confiança e todo o auxílio oferecido na execução deste trabalho.

Às equipes do Laboratório de Entomologia Florestal e do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Maria, agradeço pelo auxílio na execução dos experimentos, bem como pela troca de conhecimentos, experiências, e também pela amizade.

Aos membros do comitê de orientação e da banca de defesa, pela disponibilidade e por aceitarem contribuir com a melhoria de meu trabalho.

A todos os amigos e amigas que se fizeram presentes neste período, agradeço por estarem comigo, pelo carinho e apoio para a conclusão deste projeto. Tenho absoluta certeza de que não chegaria até aqui sem o apoio de vocês.

Muito obrigado!

RESUMO

EFICIÊNCIA DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE *Acromyrmex heyeri* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE, MYRMICINAE)

AUTOR: Mateus Alves Saldanha

ORIENTADOR: Dr. Ervandil Corrêa Costa

Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de verificar a eficiência de isolados de *Beauveria bassiana*, *Cordyceps fumosorosea* e *Metarhizium anisopliae* como uma alternativa para o controle de formigas cortadeiras. Em três artigos foram apresentados estudos que consistiram na caracterização morfofisiológica dos isolados de fungos entomopatogênicos utilizados nos ensaios, avaliação da patogenicidade de fungos entomopatogênicos em *Acromyrmex heyeri* (Forel, 1899) e a avaliação do efeito do inseticida Fipronil sobre o crescimento vegetativo e esporulação de isolados de fungos entomopatogênicos estudados. Os resultados deste estudo permitem auxiliar com o desenvolvimento de uma alternativa de controle biológico para o manejo de formigas cortadeiras.

Palavras-chave: *Acromyrmex*. *Beauveria bassiana*. *Cordyceps fumosorosea*. *Metarhizium anisopliae*.

ABSTRACT

EFFICIENCY OF ENTOMOPATOGENIC FUNGI IN THE BIOLOGICAL CONTROL OF *Acromyrmex heyeri* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE, MYRMICINAE)

AUTHOR: Mateus Alves Saldanha

ADVISOR: Dr. Ervandil Corrêa Costa

This study was carried out with the objective of verifying the efficiency of isolates of *Beauveria bassiana*, *Cordyceps fumosorosea* and *Metarhizium anisopliae* as an alternative for the control of leaf-cutting ants. In three articles, studies were presented that consisted of the morphophysiological characterization of entomopathogenic fungi isolates used in the assays, evaluation of the pathogenicity of entomopathogenic fungi in *Acromyrmex heyeri* (Forel, 1899) and evaluation of the effect of the insecticide Fipronil on the vegetative growth and sporulation of isolates of entomopathogenic fungi studied. The results of this study allow us to help with the development of an alternative biological control for the management of leaf-cutting ants.

Key words: *Acromyrmex*. *Beauveria bassiana*. *Cordyceps fumosorosea*. *Metarhizium anisopliae*.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1:

Figura 1 - Aspecto das colônias de isolados de *Beauveria bassiana*, *Cordyceps fumosorosea* e *Metarhizium anisopliae* em diferentes meios de cultura, após 15 dias de incubação.....46

ARTIGO 2:

Figura 1 – Bioensaio com formigas cortadeiras da espécie *Acromyrmex heyeri*, com destaque para o comportamento exibido pelas formigas durante a realização do ensaio em laboratório.....55

Figura 2 - Extrusão de fungos entomopatogênicos em cadáveres de *Acromyrmex heyeri*. (A) *Beauveria bassiana*. (B) *Cordyceps fumosorosea*. (C) *Metarhizium anisopliae*.....55

LISTA DE TABELAS:

ARTIGO 1:

Tabela 1 - Crescimento micelial (mm), índice de velocidade de crescimento micelial (mm/dia) e esporulação (esporos/mL) de <i>Beauveria bassiana</i> em diferentes meios de cultura, aos 15 dias de incubação.....	41
Tabela 2 - Crescimento micelial (mm), índice de velocidade de crescimento micelial (mm/dia) e esporulação (esporos/mL) de <i>Cordyceps fumosorosea</i> em diferentes meios de cultura, aos 15 dias de incubação.....	43
Tabela 3 - Crescimento micelial (mm), índice de velocidade de crescimento micelial (mm/dia) e esporulação (esporos/mL) de <i>Metarhizium anisopliae</i> em diferentes meios de cultura, aos 15 dias de incubação.....	44
Tabela 4 - Coloração e aspecto das colônias de <i>Beauveria bassiana</i> em diferentes meios de cultura.....	47
Tabela 5 - Coloração e aspecto das colônias de <i>Cordyceps fumosorosea</i> em diferentes meios de cultura.....	48
Tabela 6 - Coloração e aspecto das colônias de <i>Metarhizium anisopliae</i> em diferentes meios de cultura.....	49

ARTIGO 2:

Tabela 1 – Percentual de controle (%) de espécimes de <i>Acromyrmex heyeri</i> por isolados de <i>Beauveria bassiana</i> em diferentes concentrações de esporos.....	55
Tabela 2 - Percentual de controle (%) de espécimes de <i>Acromyrmex heyeri</i> por isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> em diferentes concentrações de esporos.....	56
Tabela 3 - Percentual de controle (%) de espécimes de <i>Acromyrmex heyeri</i> por isolado de <i>Cordyceps fumosorosea</i> em diferentes concentrações de esporos.....	56
Tabela 4 - Concentração - letal (CL ₅₀ e CL ₉₀ ; esporos.mL ⁻¹) de isolados de <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Cordyceps fumosorosea</i> e <i>Metarhizium anisopliae</i> contra espécimes de <i>Acromyrmex heyeri</i>	61

ARTIGO 3:

Tabela 1 - Crescimento micelial (mm) de isolados de <i>Beauveria bassiana</i> em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), tratados com diferentes concentrações (g/L) do inseticida Fipronil, aos 15 dias de incubação.....	65
Tabela 2 - Esporulação ($\times 10^6$. mL ⁻¹) de isolados de <i>Beuaveria bassiana</i> em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), tratados com diferentes concentrações (g/L) do inseticida Fipronil, aos 15 dias de incubação.....	66
Tabela 3 - Crescimento micelial (mm) de isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), tratados com diferentes concentrações (g/L) do inseticida Fipronil, aos 15 dias de incubação.....	67
Tabela 4 - Esporulação ($\times 10^6$. mL ⁻¹) de isolados de <i>Metarhizium anisopliae</i> em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), tratados com diferentes concentrações (g/L) do inseticida Fipronil, aos 15 dias de incubação.....	68
Tabela 5 - Crescimento micelial (mm) e esporulação ($\times 10^6$. mL ⁻¹) de isolados de <i>Cordyceps fumosorosea</i> em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), tratados com diferentes concentrações (g/L) do inseticida Fipronil, aos 15 dias de incubação.....	69
Tabela 6 - Valores calculados do índice “T” e classificação do inseticida Fipronil, em diferentes concentrações, quanto à toxicidade <i>in vitro</i> sobre isolados de <i>Beauveria bassiana</i> (IBCB 66, IBCB 170, IBCB 632), <i>Cordyceps fumosorosea</i> (IBCB 130) e <i>Metarhizium anisopliae</i> (IBCB 348, IBCB 383, IBCB 425).....	70

SUMÁRIO:

1. INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1. OBJETIVO GERAL	14
1.1.1 Objetivos específicos	14
REFERÊNCIAS	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 FORMIGAS CORTADEIRAS	16
2.1.1 Importância ecológica e econômica das formigas cortadeiras	17
2.1.2 O gênero <i>Acromyrmex</i>	17
2.1.2 Controle de formigas cortadeiras	18
2.2 CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS COM FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS	20
2.2.2 Vantagens e limitações da utilização de fungos entomopatogênicos no controle biológico de insetos-praga	22
2.3 MANEJO INTEGRADO DE PRAGAS	23
2.4 FIPRONIL	23
REFERÊNCIAS	24
3. DESENVOLVIMENTO	36
ARTIGO 1	36
3.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS.....	36
3.1.1 Introdução	37
3.1.2 Material e métodos	38
3.1.2.1 Repicagem dos isolados de fungos entomopatogênicos	39
3.1.2.2 Avaliação do crescimento micelial e esporulação dos isolados de fungos entomopatogênicos	40
3.1.2.3 Caracterização dimensional dos conídios e coloração das colônias dos isolados de fungos entomopatogênicos	40
3.1.2.4 Análise estatística	40
3.1.3 Resultados e discussão	41
3.1.4 Conclusões	50
REFERÊNCIAS	50
ARTIGO 2	52
3.2 PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS A OPERÁRIAS DE <i>Acromyrmex heyeri</i> (Forel, 1899) (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)	52
3.2.1 Introdução	52
3.2.2 Material e métodos	53
3.2.2.1 Coleta e identificação dos insetos alvos	53
3.2.2.2 Procedência e manutenção dos isolados de fungos entomopatogênicos	54
3.2.2.3 Preparo da suspensão de esporos	54
3.2.2.4 Teste de patogenicidade	54

3.2.2.5 Análise estatística	54
3.2.3 Resultados	54
3.2.4 Discussão	57
3.2.5 Conclusão	58
REFERÊNCIAS	58
ARTIGO 3	60
3.3 COMPATIBILIDADE DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS COM O INSETICIDA FIPRONIL PARA O CONTROLE DE FORMIGAS CORTADEIRAS	60
3.3.1 Introdução	61
3.3.2 Material e métodos	63
3.3.2.1 Preparo e manutenção dos fungos entomopatogênicos utilizados	63
3.3.2.2 Cultivo dos fungos entomopatogênicos em meio de cultura contendo Fipronil	63
3.3.2.3 Avaliação do crescimento micelial e esporulação dos fungos entomopatogênicos	64
3.3.2.4 Classificação do inseticida Fipronil quanto à toxicidade sobre os diferentes isolados de fungos entomopatogênicos	64
3.3.2.5 Análise estatística	65
3.3.3 Resultados e discussão	65
3.3.4 Conclusões	72
REFERÊNCIAS	72
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	76

1 INTRODUÇÃO GERAL

As formigas dos gêneros *Atta* (saúvas) e *Acromyrmex* (quenquéns) cortam partes frescas de vegetais, principalmente folhas, para o cultivo do fungo do qual se alimentam e, por isso, são popularmente conhecidas como formigas cortadeiras (MARICONI, 1970).

Devido ao hábito de cortar material vegetal fresco, as formigas cortadeiras são consideradas as pragas mais importantes de plantios florestais, principalmente dos gêneros *Pinus*, *Eucalyptus* e *Acacia*. Elas podem causar a desfolha total, tanto de mudas como de plantas adultas, entretanto, a idade das plantas pode influenciar a vulnerabilidade e os prejuízos causados por formigas cortadeiras. Os danos são mais severos em plantas jovens, sendo que na fase inicial do plantio, as perdas por esses insetos podem ser irreversíveis, pela fragilidade das mudas (DELLA LUCIA, 2011).

O controle de formigas cortadeiras é realizado principalmente pelo uso de iscas granuladas. Essas iscas compreendem um substrato atrativo em mistura com um princípio ativo sintético, em *pellets* (BOARETTO; FORTI, 1997). As iscas formicidas são distribuídas de forma sistemática ou localizada, antes e após o plantio. O controle sistemático compreende a distribuição de iscas formicidas em locais equidistantes entre si, de maneira a cobrir toda a área a ser tratada. Já o controle localizado, compreende a distribuição de iscas somente nos locais onde forem encontrados ninhos ou plantas atacadas (FILHO et al., 2015).

Alguns métodos alternativos de controle de formigas cortadeiras têm sido constantemente mencionados, tais como: controle cultural, mecânico, biológico, uso de plantas resistentes ou tóxicas e uso de feromônios. No entanto, até o momento, o controle químico através de iscas formicidas é o único com tecnologia disponível para uso em grande escala (ARAÚJO et al., 2003). Porém, deve-se destacar que o uso de inseticidas químicos tem acarretado dificuldades, como a contaminação ambiental e os riscos potenciais à saúde humana e animal.

A partir deste cenário, tem crescido o interesse científico pela busca e implementação de métodos menos agressivos. Os fungos entomopatogênicos são microrganismos que se instalam no corpo de insetos causando sua morte (ALVES, 1998). Esses fungos, naturalmente, infectam mais de 300 espécies de insetos de diversas Ordens, incluindo importantes pragas agrícolas e florestais (SILVA, 2017). Assim, o controle biológico com entomopatógenos é considerado uma alternativa viável, segura e compatível com o ambiente para o controle de insetos-praga (CHÁVEZ et al., 2016).

Estudos básicos que caracterizam a virulência desses fungos são importantes para a seleção de um novo agente a ser explorado no controle biológico de vários insetos-praga, incluindo as formigas cortadeiras. Dessa forma, trabalhos visando a caracterização destes fungos, bem como a avaliação da sua patogenicidade em espécimes de formigas cortadeiras, em laboratório, se fazem necessários para posteriores estudos objetivando a aplicação deste método de controle em condições de campo.

1.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a ação letal de *Beauveria bassiana*, *Cordyceps fumosorosea* e *Metarhizium anisopliae* sobre a mortalidade de operárias de *Acromyrmex heyeri*, e o efeito do inseticida Fipronil sobre o crescimento e a esporulação desses fungos.

1.1.1 Objetivos Específicos

- a) Realizar a caracterização morfofisiológica de isolados de *B. bassiana*, *C. fumosorosea* e *M. anisopliae*.
- b) Avaliar a ação de *B. bassiana*, *C. fumosorosea* e *M. anisopliae* sobre *Acromyrmex heyeri*, em laboratório, utilizando-se diferentes concentrações de esporos.
- c) Determinar a mortalidade de formigas cortadeiras expostas a diferentes concentrações de esporos dos isolados de fungos entomopatogênicos.
- d) Estimar as concentrações letais médias (CL₅₀ e CL₉₀) para cada isolado fúngico.
- e) Avaliar o efeito do inseticida Fipronil sobre o crescimento vegetativo e a esporulação de *B. bassiana*, *C. fumosorosea* e *M. anisopliae*, *in vitro*.
- f) Classificar o inseticida Fipronil quanto à toxicidade sobre os isolados de fungos entomopatogênicos, *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998.
- ARAÚJO, M. da S.; DELLA LUCIA, T. M. C.; SOUZA, D. J. **Estratégias alternativas de controle de formigas cortadeiras**. Salvador: Bahia Agrícola, v. 6, p. 71-74, 2003.
- BOARETTO, M. A. C.; FORTI, L. C. **Perspectivas no controle de formigas cortadeiras**. Série técnica IPEF, Piracicaba, v. 11, p. 31-46, 1997.
- CHÁVEZ, B. Y.; ROJAS, J. C.; BARRERA, J. F.; GÓMEZ, J. Evaluación de la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Pachycoris torridus* en Laboratorio. **Southwestern Entomologist**, v. 41, n. 3, p. 783-790, 2016.
- DELLA LUCIA, T. M. C. **Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa, MG: Ed da UFV, 2011. 419 p.
- FILHO, W. R.; NICKELE, M. A.; PENTEADO, S. R. C.; MARTINS, M. F. O. **Recomendações para o controle químico de formigas cortadeiras em plantios de *Pinus* e *Eucalyptus***. Embrapa: Comunicado Técnico, Colombo, 2015.
- MARICONI, F. A. M. **As saúvas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1970. 167 p.
- SILVA, G. M. H. **Fibra da algaroba: um substrato alternativo para a produção de conídios e enzimas hidrolíticas por fungos filamentosos**. 2017. Monografia (Curso de Biotecnologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FORMIGAS CORTADEIRAS

As formigas dos gêneros *Atta* (saúvas) e *Acromyrmex* (quenquéns) (Formicidae, Myrmicinae, Attini) são popularmente conhecidas como “formigas cortadeiras” (RIBEIRO et al., 2012; ARAÚJO et al., 2015; DIEHL et al., 2017). As saúvas caracterizam-se pela presença de três pares de espinhos dorsais, enquanto que as quenquéns apresentam quatro ou mais pares de espinhos dorsais (TRAVAGLINI et al., 2017).

As formigas cortadeiras estão presentes na maioria dos *habitats*, sendo que possuem o hábito de cortar matéria vegetal fresca como folhas, flores e frutos de diferentes espécies de plantas, que são pré-processados em pequenos pedaços e transportados para o formigueiro, onde são utilizados como substrato para o cultivo de fungos. As formigas preferem as partes mais jovens e macias das plantas, além de folhagens ricas em água, nitrogênio e fósforo, com pouca fibra e manganês (RANDO; FORTI, 2005; RODRÍGUEZ et al., 2008; MATTE et al., 2016; DIEHL et al., 2017).

O conjunto fungo-substrato dá-se o nome de “jardim de fungo” (DORNELAS et al., 2016). Esses jardins de fungos estão localizados em câmaras subterrâneas no formigueiro, que são constituídos por material vegetal, secreções de formigas e biomassa do próprio fungo (RODRIGUES et al., 2014). O fungo cultivado é um Basidiomiceto e pertence ao gênero *Leucoagaricus*, desenvolvendo-se adequadamente em condições de alta umidade e temperatura entre 20 °C e 30 °C (DELLA LUCIA et al., 2014; ROMER et al., 2017). O fungo cultivado é essencial para a sobrevivência e para a arquitetura da colônia das formigas (ZANETTI et al., 2014). Por esse motivo, as formigas desenvolveram diferentes estratégias que auxiliam na manutenção da integridade do fungo, como por exemplo, uma limpeza meticulosa dos ninhos e dos fragmentos de folhas utilizados como substrato, com o intuito de remover esporos fúngicos e bactérias; intenso comportamento de *auto-grooming* (autolimpeza) e *allogrooming* (limpeza e lambadura entre diferentes indivíduos na colônia); e secreção de substâncias antimicrobianas produzidas por suas glândulas metapleurais (SCHOENIAN et al., 2011; RIBEIRO et al., 2012; DELLA LUCIA et al., 2014).

Os ninhos das formigas cortadeiras são formados por um sistema de túneis e câmaras subterrâneas, que podem atingir profundidades maiores que sete metros e são capazes de abrigar milhões de indivíduos (MEYER et al., 2013). Durante a construção das câmaras, as operárias retiram o solo e depositam-o na superfície, formando um monte de terra solta (MOREIRA et al., 2007). Além das câmaras que são utilizadas para o cultivo do fungo,

existem câmaras adicionais onde são depositadas formigas mortas, fungo exaurido, detritos e restos orgânicos que são removidos dos jardins de fungos (MOUTINHO et al., 2003; SOARES et al., 2006).

2.1.1 Importância ecológica e econômica das formigas cortadeiras

As formigas cortadeiras, quando em equilíbrio com o ambiente, são muito importantes do ponto de vista ecológico, atuando em diversos níveis dentro de um ecossistema, assim chamadas de “engenheiras do solo”, uma vez que seus ninhos subterrâneos aumentam a fertilidade e permeabilidade do solo, trazendo benefícios como acúmulo de matéria orgânica, que acaba por possibilitar o desenvolvimento de determinadas espécies da flora, através da dispersão de sementes, são capazes de remodelar os cenários florestais. Existem estudos relatando que o nível de nutrientes disponíveis no solo é variável em função de que as formigas nidificam as zonas adjacentes ao formigueiro. Além disso, as câmaras de resíduos presentes nos ninhos de formigas cortadeiras podem servir como *habitat* para alguns seres vivos (MONTROYA-LERMA et al., 2012; BEZERRA, 2018).

Apesar da importância ecológica e dos serviços sistêmicos que prestam aos ecossistemas, as formigas cortadeiras constituem uma das principais pragas agrícolas e florestais. Em virtude de sua abundância e ampla distribuição, causam perdas econômicas ao desfolharem parcialmente ou totalmente as culturas para alimentar o fungo mutualista que cultivam. São consideradas herbívoros dominantes, visto que consomem muito mais vegetação do que qualquer outro grupo de animais de diversidade taxonômica comparável, realizando tal ação durante todo o ano. Os prejuízos causados pelas mesmas variam com a idade da planta e intensidade do ataque, e em certas regiões, alguns cultivos podem ser completamente inviabilizados. Ainda, além do dano direto causado às plantas, os ninhos das formigas cortadeiras podem reduzir o acesso às plantações e também, danificar estradas (ESTRADA et al., 2013; FARDER-GOMES et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017).

2.1.2 O gênero *Acromyrmex*

As formigas cortadeiras são divididas em dois gêneros: *Atta* (saúvas) e *Acromyrmex* (quenquéns). Todas cultivam e se alimentam de um fungo simbiote, utilizando o material cortado para substrato de criação do mesmo (GONÇAVES, 1961). Em algumas regiões, as quenquéns são consideradas tão ou mais importantes que as saúvas (DE GASPERI, 1975; JURUENA, 1980).

As formigas do gênero *Acromyrmex* ocorrem desde o sul dos Estados Unidos, na latitude 40°N, até a Argentina, na latitude 44°S, abrangendo toda a América tropical e subtropical, com exceção apenas do Chile, devido a incapacidade dos organismos de cruzar o deserto do Atacama e a Cordilheira dos Andes (WEBER, 1966). De acordo com Bolton et al. (2017), o gênero *Acromyrmex* compreende 33 espécies e 29 subespécies reconhecidas atualmente, dividida com base em características morfológicas, em dois subgêneros, *Moellerius* e *Acromyrmex*. O subgênero *Acromyrmex* apresenta um espinho ou tubérculo acima de cada olho, denominado espinho supraocular (GONÇALVES, 1961). As mandíbulas desse subgênero são alongadas e com a borda externa sinuosa em vista frontal, fortemente curvada em vista lateral (MAYHÉ-NUNES, 1991).

As quenquéns podem ser reconhecidas por apresentarem de quatro a cinco pares de espinhos na parte dorsal do tronco, os quais são muito reduzidos no pronoto em algumas espécies, apresentando no tergo I do gaster, vários tubérculos (MAYHÉ-NUNES, 1991), exceto para a *A. striatus* (Roger). Embora os espinhos da cabeça e do tórax sejam caracteres sistemáticos importantes, as proporções dos mesmos variam de uma colônia para outra e mesmo entre indivíduos de uma mesma colônia, além de ocorrer, com frequência, assimetria bilateral da cabeça (DIEHL-FLEIG, 1995).

O gênero *Acromyrmex* foi revisado para o território brasileiro, tendo sido elaboradas chaves dicotômicas para a determinação das espécies desse gênero (Gonçalves, 1961). Essas chaves são ainda utilizadas, além daquelas elaboradas por Andrade (1991) e Mayhé-Nunes (1991). No Brasil, de acordo com Gonçalves (1961), Fowler et al. (1986) e Fowler (1988), ocorrem 21 espécies e 11 subespécies do gênero *Acromyrmex*, podendo ser 20 o número de espécies e 9 o de subespécies aceitas como *Acromyrmex* (DELLA LUCIA et al., 1993).

Dentre as espécies de formigas quenquéns que se destacam pela sua frequência e danos causados, esta referida a espécie *Acromyrmex heyeri* (Forel, 1899), conhecida por formiga vermelha do monte, caracterizada pela coloração castanha ou amarela das operárias, a cabeça possui lobos arredondados semi-brilhantes, assim como o gaster (COSTA, 1958; JURUENA, 1980). Os ninhos são cobertos com terra ou apenas com palha (JURUENA, 1980).

2.1.3 Controle de formigas cortadeiras

O controle de formigas cortadeiras pode ser realizado por métodos biológicos, culturais, mecânicos e químicos (BOARETTO; FORTI, 1997).

O controle biológico pode ser definido como o uso racional de predadores, parasitoides e patógenos para regular a densidade populacional de pragas, evitando que as mesmas atinjam níveis capazes de provocar dano econômico. A resistência do ambiente é responsável pela mortalidade de 99,95% das rainhas de formigas cortadeiras, antes mesmo que tenham fundado seus ninhos. O controle biológico natural, com a utilização de predadores, parasitoides e microrganismos patogênicos, sem dúvida é importante fator de regulação das populações destes insetos. As aves silvestres e domésticas, principalmente as espécies insetívoras e onívoras, são importantes elementos dentre os inimigos naturais. Os predadores, parasitoides e patógenos são chamados de “inimigos naturais” e diminuem a densidade populacional e o potencial de reprodução de espécies daninhas, reduzindo, por conseguinte, os danos que estas causam aos cultivos. Os parasitoides são organismos cujos estágios imaturos se desenvolvem às expensas de um hospedeiro, causando a morte do mesmo ou fazendo com que este seja incapaz de gerar progênie. Dentre os artrópodos, destacam-se como predadores de formigas cortadeiras as aranhas, os ácaros, várias espécies de formigas predadoras e coleópteros. Destes, merecem atenção as espécies *Canthon virens* e *Canthon dives* (Coleoptera: Scarabaeidae), por se tratarem de predadores específicos de rainhas de saúvas (SIMONATO et al., 2014; CRUZ et al., 2011; ROSSI, 2012; LEÓN, 2005; BOARETTO, FORTI, 1997).

O preparo do solo, como aração e gradação, pode ser utilizado como um método de controle cultural para eliminar ninhos de formigas cortadeiras. Outro exemplo de controle com esse método é a utilização de plantas atraentes próximo às culturas, as quais servem de alimento alternativo para as formigas ou funcionam como “armadilhas”, evitando que as mesmas ataquem as plantações (MIRANDA; ARAÚJO, 2003; FILHO et al., 2011; FILHO et al., 2013).

O controle mecânico é, geralmente, pouco utilizado (MORESSI et al., 2007). Um exemplo é a remoção mecânica dos ninhos por meio de pás. Durante esse procedimento, cria-se uma crise interna na colônia, podendo ocasionar a morte da rainha e de parte da cria ou, até mesmo, tornando o ninho mais susceptível a predadores ou enfermidades (MONTROYA-CORREA et al., 2007). Outro exemplo de aplicação desse método de controle, que é muito utilizado em espécies arbóreas, é a utilização de barreiras físicas, como cones plásticos invertidos, gel adesivo ou tiras de plástico cobertas com graxa que são fixadas nos troncos das plantas e impedem que as formigas cortadeiras tenham acesso à parte aérea, onde se localizam as folhas, flores e frutos (NAVA et al., 2009; ALMEIDA et al., 2013).

Métodos químicos para controle de formigas cortadeiras são os mais frequentemente utilizados, sendo o produto químico tóxico aplicado diretamente nos ninhos, nas formulações pó, líquida ou líquidos nebulizáveis, ou apresentado na forma de iscas granuladas, aplicadas nas proximidades das colônias (BOARETTO, FORTI, 1997).

As iscas tóxicas são amplamente utilizadas devido ao baixo custo e à facilidade de aplicação (FILHO et al., 2007). Consistem em um substrato atrativo, geralmente polpa cítrica desidratada, impregnada com inseticida (PERRI et al., 2017). O inseticida adequado deve possuir ação retardada, ser letal em baixa concentração e atuar por ingestão (FORTI et al., 2003). A termonebulização é um processo indicado para grandes áreas, sendo realizado por meio de aparelhos apropriados, denominados termonebulizadores (CRUZ et al., 1984). Esse método consiste na atomização de um formicida, veiculado em querosene, óleo diesel ou óleo mineral, por meio do calor, resultando em uma fumaça tóxica, que é aplicada dentro do formigueiro. Na maioria das vezes, até a saturação do mesmo, ou seja, até a fumaça aplicada em uma das aberturas do formigueiro sair pelas demais (SILVA et al., 2008; BUENO, 2013).

2.2 CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS COM FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

Os fungos entomopatogênicos são capazes de regular, naturalmente, as populações de insetos (DÍAZ et al., 2006). Estima-se que cerca de 80 % das enfermidades que acometem os insetos têm como agente causal os fungos (BADII; ABREU, 2006). Os fungos entomopatogênicos foram os primeiros agentes biológicos a serem utilizados no controle de pragas (DELGADO; MURCIA-ORDOÑEZ, 2011).

Louis Pasteur e Agostino Bassi foram uns dos primeiros cientistas a reconhecerem o potencial da utilização de microrganismos para controlar insetos-praga e, em meados da década de 1870, essa noção de controle microbiano foi expressa por vários entomologistas proeminentes. Foi Eli Metchnikoff quem demonstrou na prática que um fungo entomopatogênico poderia infectar um inseto-praga no solo e aplicou o fungo para o controle de insetos (TANADA; KAYA, 1993).

Os fungos entomopatogênicos possuem um amplo espectro de ação, podendo colonizar diversas espécies de moscas, gafanhotos, afídeos, lagartas, besouros, entre outros, sendo utilizados como agentes no controle biológico de espécies de insetos considerados economicamente importantes, sendo que o solo constitui o seu principal reservatório (VELÁSQUEZ et al., 2007; VALICENTE, 2009; SCHAPOVALOFF et al., 2015).

Metarhizium, *Beauveria*, *Cordyceps*, *Paecilomyces*, *Aspergillus*, *Verticillium* e *Aschersonia* estão entre os principais gêneros de fungos entomopatogênicos e atuam como um

mecanismo regulador das populações de insetos nos ecossistemas (MONZÓN, 2001; CASTILLO et al., 2012). Dentre esses, destacam-se *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*. São duas espécies fúngicas entomopatogênicas mais estudadas e que têm demonstrado um grande potencial como agentes de controle microbiano, sendo amplamente utilizadas no controle de pragas em diversas culturas como café, cana-de-açúcar, banana, erva-mate, entre outras (MOINO JR. et al., 2002; POTRICH et al., 2009).

Beauveria bassiana Balls. (Vuill.) foi descoberta por Agostino Bassi em 1835 e é uma espécie cosmopolita que habita naturalmente o solo (XIAO et al., 2012; MASCARIN; JARONSKI, 2016). É conhecida por causar a “muscardine branca” nos insetos (PAULI et al., 2011). Possui uma variedade de hospedeiros, que inclui espécies de insetos vetores, pragas agrícolas e insetos invasores pertencentes às ordens Coleoptera, Diptera, Lepidoptera e Hemiptera (GHIKAS et al., 2010; PEDRINI et al., 2013; HUANES-CARRANZA; WILSONKRUGG, 2016). É um dos fungos mais utilizados em programas de controle de pragas, em virtude da sua eficiência e fácil multiplicação.

Nos Estados Unidos, *B. bassiana* tem sido utilizada no controle de adultos de *Plectrodera scalator*, atingindo taxas de mortalidade acima de 60 % (LEITE et al., 2011). Na China, estima-se que cerca de um milhão de hectares sejam tratados por ano com *B. bassiana*, com o intuito de controlar insetos, entre eles a lagarta *Dendrolimus punctatus* (BARBOZA et al., 2011; XIAO et al., 2012). Após a sua liberação, *B. bassiana* pode persistir no solo por períodos de tempo que variam de 15 dias a um ano (LEITE et al., 2011). O micélio e os conídios de *B. bassiana* cobrem o corpo ou os espaços articulares dos insetos atacados com uma capa de coloração esbranquiçada (CASTILLO et al., 2012).

Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorokin é patogênico para mais de 204 espécies de insetos, pertencentes às ordens Orthoptera, Lepidoptera, Hymenoptera, Coleoptera, entre outras, provocando o que se conhece como “muscardine verde” nos insetos. Esse fungo se encontra amplamente distribuído pelo mundo e foi isolado por Metchnikoff em 1879 do besouro *Anisoplia austriaca*. Foram descritas duas variedades, *M. anisopliae* var. *anisopliae* e *M. anisopliae* var. *majus*, que se diferenciam uma da outra pelo tamanho de seus conídios (GUERRERO et al., 2000; GUTIÉRREZ; SALDARRIAGA, 2004; BAUTISTA-GÁLVEZ; GONZÁLEZ-CORTES, 2005; DAMIN et al., 2011). No Brasil, *M. anisopliae* tem sido estudado sobre várias pragas, dentre as quais, a *Mahanarva posticata* (cigarrinha-da-cana), *Diatraea saccharalis* (broca-da-cana), *Hypothenemus hampei* (broca-do-café), *Nezara viridula* (percevejo-verde da soja), entre outras (DAMIN et al., 2011).

O processo de penetração do fungo no tegumento do inseto, colonização, infecção generalizada e morte do hospedeiro ocorre, geralmente, entre três a dez dias após o contato (MELO et al., 2007). Os hospedeiros acometidos por este fungo tornam-se mumificados e apresentam-se cobertos por uma camada pulverulenta formada pela aglomeração de conídios, podendo apresentar colorações variadas, desde verde claro à verde escuro, acinzentados ou, até mesmo, esbranquiçados com pontos verdes (ALVES, 1998; ALBUQUERQUE et al., 2005; OTTATI-DE-LIMA, 2007).

2.2.2 Vantagens e limitações da utilização de fungos entomopatogênicos no controle biológico de insetos-praga

Entre as principais vantagens do controle biológico de insetos-praga com fungos entomopatogênicos, pode-se citar o fato de que, geralmente, estes entomopatógenos são bastante específicos, não afetando os seres humanos, podendo ser facilmente cultivados em massa (HANSON; HILJE, 1993). Outras vantagens incluem o fato de que, ao contrário de outros micro-organismos como as bactérias e os vírus, os fungos entomopatogênicos não necessitam ser ingeridos para serem eficazes. Além disso, atuam sobre uma gama de organismos, sendo capazes, também, de infectar os hospedeiros em diferentes estágios de seu desenvolvimento, tais como ovos, larvas, pupas e adultos, causam baixo impacto sobre o ambiente e sobre a fauna benéfica, possuem grande variabilidade genética e apresentam alta capacidade para evitar que os hospedeiros desenvolvam resistência. Ademais, a forma de reprodução dos fungos entomopatogênicos confere maior persistência ao longo do tempo, visto que o inseto morto se converte em uma nova fonte de inóculo (FRANCE et al., 2000; QUESADA-MORAGA et al., 2006; MELO et al., 2007; DELGADO; MÚRCIA-ORDOÑEZ, 2011; BHAN et al., 2013; GUTIÉRREZ et al., 2017).

As principais limitações do controle biológico com fungos entomopatogênicos incluem a falta de conhecimento sobre os princípios do método, pessoal qualificado e apoio econômico (GUÉDEZ et al., 2008). Outras limitações estão relacionadas ao fato de que os fungos, usualmente, são patógenos de ação lenta, além disso, sua capacidade de infectar um inseto-alvo é influenciada por fatores bióticos e abióticos (CARRILLO-RAYAS; BLANCO-LABRA, 2009; ECKARD et al., 2017). Fatores como o comportamento, as condições fisiológicas e a idade do hospedeiro, além de altas temperaturas, baixa umidade e a radiação UV, podem comprometer o crescimento e desenvolvimento do fungo sobre o hospedeiro (MARANHÃO; MARANHÃO, 2009; BOTERO et al., 2009; YÁÑEZ; FRANCE, 2010). Entre os fatores abióticos, a radiação UV é uma das mais importantes, pois pode provocar

danos letais ao DNA e mutações, causando atraso na germinação ou a inativação dos conídios, reduzindo desse modo, a atividade bioinseticida (OTTATI-DE-LIMA et al., 2010; ZORZETTI et al., 2014). Ainda, podemos considerar o fato de que os fungos entomopatogênicos são generalistas, ou seja, não há seletividade entre os insetos-praga e insetos benéficos.

2.3 MANEJO INTEGRADO DE PRAGAS

O termo Manejo Integrado de Pragas (MIP) surgiu em meados dos anos 1960 e surgiu como uma reação dos pesquisadores ao uso excessivo de inseticidas no combate às pragas (BORJA, 2003; GONZAGA et al., 2009). Pode ser definido como “um processo baseado em decisões envolvendo o uso coordenado de múltiplas táticas para o controle de todas as classes de pragas (insetos, patógenos, ervas daninhas e vertebrados) de uma maneira ecologicamente e economicamente segura” (EHLER, 2006). Além do aspecto ecológico e econômico, no MIP há que se considerar o aspecto sociológico, ou seja, toda e qualquer medida a ser adotada deve-se buscar o bem-estar da sociedade, uma vez que esta irá consumir os produtos agrícolas produzidos (CARVALHO; BARCELLOS, 2012).

Na prática, o MIP consiste em ter o domínio de alguns conhecimentos básicos sobre a correta identificação e o comportamento das pragas, da sua dinâmica populacional, da sua ecologia, da flutuação estacional e mortalidade natural (efeito do clima e dos inimigos naturais), entre outros, sendo o monitoramento da praga-alvo o ponto inicial para a escolha do método de controle mais adequado (SALVADORI; PEREIRA, 2006). O MIP representa um avanço significativo, pois seu principal objetivo é a utilização mínima de agroquímicos, contribuindo para amenizar os problemas de contaminação ambiental e para diminuir as taxas de resíduos no produto final, melhorando, desse modo, a qualidade de vida tanto dos produtores quanto dos consumidores (LAURENTIS, 2017).

2.4 FIPRONIL

O Fipronil é um inseticida do grupo químico fenil pirazol (BRITTO et al., 2016). Foi o primeiro inseticida fenil pirazol a ser introduzido no controle de pragas (IKEDA et al., 2004). É considerado extremamente tóxico para os insetos (SIMAS et al., 2001). Atua no sistema nervoso central dos insetos, mais especificamente nos receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA) associados a canais de cloreto, bloqueando a passagem de íons cloreto. Eliminando, desse modo, a inibição normal dos impulsos nervosos, provocando um aumento da atividade neural e, por conseguinte, a paralisia e morte do organismo (TOFOLO

et al., 2015; CHAGURI, 2016). É conhecido em mais de 70 países, sendo empregado no controle de pragas em mais de 100 culturas (OKUMURA, 2009). No Brasil, o início de sua utilização foi registrado no ano 2000 em plantações na região Nordeste e, atualmente, vem sendo utilizado no controle de cupins, besouros, formigas cortadeiras, lagartas e broca, nas culturas de algodão, batata, milho, soja, entre outras. O Fipronil é utilizado, ainda, como antiparasitário em animais domésticos, com o intuito de se controlar pulgas e carrapatos (SILVA et al., 2012). Nos Estados Unidos, está registrado para vários usos como o controle de pulgas, carrapatos, cupins, formigas, entre outros (GROSMAN et al., 2002). No entanto, o Fipronil pode causar efeitos tóxicos indesejáveis para espécies não-alvo como peixes e invertebrados aquáticos, assim como para o meio ambiente, podendo contaminar o solo e fontes de água (UDO, 2012; FRATTI; TORRES, 2014).

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, A. C.; PEREIRA, K. C. A.; CUNHA, F. M.; VEIGA, A. F. S. L.; ATHAYDE, A. C. R.; LIMA, E. A. L. A. Patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* sobre *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 4, p. 585-591, 2005.
- ALMEIDA, J. T. S.; MEDICI, L. O.; AGUIAR-MENEZES, E. L. Eficiência e princípio de funcionamento de barreira física cônica contra as quenquéns. **Floresta**, v. 43, n. 4, p. 633-642, 2013.
- ALVES, S. B. Controle microbiano de insetos. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998.
- ANDRADE, M. L. **Bionomia e distribuição geográfica do gênero *Acromyrmex*, 1865 (Hymenoptera: Formicidae) no Estado de São Paulo, Brasil**. 1991. Dissertação (Mestrado em Zoologia)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1991.
- ARAÚJO, M. S.; RODRIGUES, C. A.; OLIVEIRA, M. A.; JESUS, F. G. Controle biológico de formigas-cortadeiras: o caso da predação de fêmeas de *Atta* spp. por *Canthon virens*. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 2, n. 3, p. 8-12, 2015.
- BADII, M. H.; ABREU, J. L. Control biológico una forma sustentable de control de plagas. **Daena: International Journal of Good Conscience**, v. 1, n. 1, p. 82-89, 2006.

- BARBOZA, M. R.; SILVA, D. N.; LUSTOSA, S. B. C.; HIROSE, E. Patogenicidade do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* sobre o percevejo *Collaria scenica* (Hemiptera: Miridae). **Ambiência**, v. 7, n. 3, p. 473-480, 2011.
- BAUTISTA-GÁLVEZ, A.; GONZÁLEZ-CORTES, N. Tres dosis de *Metarhizium anisopliae* sobre la mosca pinta (*Aeneolamia* spp.) em caña de azúcar en la región de los ríos, estado de tabasco. **Universidad y Ciencia**, v. 21, n. 41, p. 37-40, 2005.
- BEZERRA, N. S. **Eficiência de fungos entomopatogênicos sobre formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae)**. Dissertação. 96 p. Mestrado em Biotecnologia. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2018.
- BHAN, S.; SHRANKHLA; MOHAN, L.; SRIVASTAVA, C. N. Larvicidal toxicity of Temephos and entomopathogenic fungus, *Aspergillus flavus* and their synergistic activity against malaria vector, *Anopheles stephensi*. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 1, n. 6, p. 55-60, 2013.
- BOARETTO, M. A. C.; FORTI, L. C. **Perspectivas no controle de formigas cortadeiras**. Série Técnica IPEF, v. 11, n. 30, p. 31-46, 1997.
- BOLTON, B. **AntWeb**: Ants of Bolton World Catalog, 2017. Disponível em: <https://www.antweb.org/project.do?name=worldants>, acesso em: 17 de Agosto de 2021.
- BORJA, G. E. M. Erradicação ou manejo integrado das mífases neotropicais das Américas? **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 32, p. 131-138, 2003.
- BOTERO, C. E. G.; MARÍN, P. M.; MACHADO, P. B. Claves para el éxito del hongo *Beauveria bassiana* como controlador biológico de la broca del café. **Avances Técnicos Cenicafé**, v. 384, p. 1-8, 2009.
- BRITTO, J. S.; FORTI, L. C.; OLIVEIRA, M. A.; ZANETTI, R.; WILCKEN, C. F.; ZANUNCIO, J. C.; LOECK, A. E.; CALDATO, N.; NAGAMOTO, N. S.; LEMES, P. G.; CAMARGO, R. S. Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. **International Journal of Research in Environmental Studies**, v. 3, p. 11-92, 2016.

BUENO, F. C. **Seleção de ingredientes ativos para o desenvolvimento de iscas tóxicas para o controle de formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae)**. 2013. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

CARVALHO, N. L.; BARCELLOS, A. L. Adoção do Manejo Integrado de Pragas baseado na percepção e educação ambiental. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 5, n. 5, p. 749-766, 2012.

CARRILLO-RAYAS, M. T.; BLANCO-LABRA, A. Potencial y Algunos de los Mecanismos de Acción de los Hongos Entomopatógenos para el Control de Insectos Plaga. **Acta Universitaria**, v. 19, n. 2, p. 40-49, 2009.

CASTILLO, C. E.; CAÑIZALEZ, L. M.; VALERA, R.; GODOY, J. C.; GUEDEZ, C.; OLIVAR, R.; MORILLO, S. Caracterización morfológica de *Beauveria bassiana*, aislada de diferentes insectos en Trujillo – Venezuela. **Revista Academia**, v. 11, n. 23, p. 275-281, 2012.

CHAGURI, J. L. **Efeitos da exposição ao pesticida fipronil nas alterações pressóricas em ratos acordados**. 2016. Dissertação (Mestrado em Farmacologia e Biotecnologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu.

COSTA, R. G. **Alguns insetos e outros pequenos animais que danificam plantas cultivadas no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Sec. Agric. Ind. Com., 1958. 296p.

CRUZ, J. M.; NOGUEIRA, S. B.; PEREIRA, A. R.; MEWES, B. O. Adaptação de uma motocicleta para termonebulização no controle de formigas saúvas (*Atta* spp.) em áreas reflorestadas de Cerrado. **Revista Árvore**, v. 8, n. 2, p. 104-111, 1984.

CRUZ, J. C.; MAGALHAES, P. C.; FILHO, I. A. P.; MOREIRA, J. A. A. **Milho: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa, 2011.

DAMIN, S.; VILANI, A.; FREITAS, D.; KRASBURG, C.; QUEIROZ, J. A.; KAGIMURA, F. Y.; ONOFRE, S. B. Ação de fungicidas sobre o crescimento do fungo entomopatogênico *Metarhizium* sp. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 9, n. 1, p. 41-49, 2011.

DEGASPERI, A.J. **Formigas cortadeiras, espécies e medidas de controle**. Porto Alegre: Sec. Agric., 1975. 31p

DELGADO, P. A. M.; MURCIA-ORDOÑEZ, B. Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. **Ambi-Agua**, v. 6, n. 2, p. 77-90, 2011.

DELLA LUCIA, T. M. C.; GANDRA, L. C.; GUEDES, R. N. C. Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. **Pest Management Science**, v. 70, p. 14-23, 2014.

DELLA LUCIA, T. M. C et al. **Espécies de formigas cortadeiras no Brasil**. In: DELLA LUCIA, T. M. C. et al. (Ed.) As formigas cortadeiras. Viçosa: Sociedade de Investigações Florestais, 1993. cap. 3. p. 26-30.

DÍAZ, M. P.; MACÍAS, A. F.; NAVARRO, S. R.; TORRE, M. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. **Interciencia**, v. 31, n. 12, p. 856-860, 2006.

DIEHL, E.; DIEHL-FLEIG, E.; ALBUQUERQUE, E. Z. Occurrence of Attini (Formicidae) in two geomorphological provinces of Rio Grande do Sul, Brazil, **Brazilian Journal of Agriculture**, v. 92, n. 1, p. 66-74, 2017.

DIEHL-FLEIG, E. **Formigas: organização social e ecologia comportamental**. São Leopoldo: Unisinos, 1995.

DORNELAS, A. S. P.; SARMENTO, R. A.; SANTOS, G. R.; NASCIMENTO, M. O.; SOUZA, D. J. Fungos Filamentosos Associados às Espécies *Atta sexdens* (Linnaeus) e *Atta laevigata* (F. Smith) (Hymenoptera: Formicidae). **EntomoBrasilis**, v. 9, n. 1, p. 26-30, 2016.

EHLER, L. E. Perspectives Integrated pest management (IPM): definition, historical development and implementation, and the other IPM. **Pest Management Science**, 2006.

ECKARD, S.; BACHER, S.; ENKERLI, J.; GRABENWEGER, G. A simple in vitro method to study interactions between soil insects, entomopathogenic fungi, and plant extracts. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 163, p. 315-327, 2017.

ESTRADA, C.; WCISLO, W. T.; VAN BAEL, S. A. Symbiotic fungi alter plant chemistry that discourages leaf-cutting ants. **New Phytologist**, v. 198, p. 241-251, 2013.

- FRATTI, I. G. B.; TORRES, M. A. P. **Eficiencia en el transporte de cebos tóxicos por hormigas cortadoras del género *Acromyrmex***. Tesis - Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. 2014.
- FARDER-GOMES, C. F.; OLIVEIRA, M. A.; GONÇALVES, P. L.; GONTIJO, L. M.; ZANUNCIO, J. C.; BRAGANÇA, M. A. L.; PIRES, E. M. Reproductive ecology of phorid parasitoids in relation to the head size of leaf-cutting ants *Atta sexdens* Forel. **Bulletin of Entomological Research**, v. 107, p. 487-492, 2017.
- FILHO, L. C. P.; CIESLIK, L. F.; TALHEIMER, R.; LUCINI, M.; SILVEIRA, E. R. Mortalidade de formigueiros por diferentes métodos de controle em pastagens. **Synergismus scyentifica**. UTFPR, v. 2, 2007.
- FILHO, W. R.; NICKELE, M. A.; STRAPASSON, P. **Combate às formigas cortadeiras**. Curitiba: SENAR-PR., 2011.
- FILHO, W. R.; PORFÍRIO-DA-SILVA, V.; NICKELE, M. A. MARTINS, M. F. O. Formigas cortadeiras em sistemas de integração lavoura-pecuária-floresta - ILPF: fundamentos para o controle. 1. ed. Colombo, PR: **Embrapa Florestas**, 2013.
- FORTI, L. C.; NAGAMOTO, N. S.; RAMOS, V. M.; ANDRADE, A. P. P.; LOPES, J. F. CAMARGO, R. S.; MOREIRA, A. A.; BOARETTO, M. A. C. Eficiencia de sulfluramida, fipronil y clorpirifos como cebos en el control de *Atta capiguara* Gonçalves (Hymenoptera: Formicidae). **Pasturas Tropicales**, v. 25, n. 3, p. 28-35, 2003.
- FOWLER, H. G. Taxa of neotropical grass-cutting ants, *Acromyrmex* (Moellerius) (Hymenoptera, Formicidae). **Cientifica**, Jaboticabal, v. 16, n. 2, p. 281-296, 1988.
- FOWLER, H.G. et al. Population dynamics of leaf-cutting ants: a brief review. In: LOFGREN, C.S. et al. (Ed.) **Fire ants and leaf-cutting ants: biology and management**. Boulder, Colorado: Westview Press, 1986.
- FRANCE, A.; GERDING, M.; GERDING, M.; SANDOVAL, A. Patogenicidad de una colección de cepas nativas de *Metarhizium* spp. y *Beauveria* spp. en *Aegorhinus superciliosus*, *Asynonychus cervinus* y *Otiorynchus sulcatus*. **Agricultura Técnica**, v. 60, n. 3, 2000.

- GHIKAS, D. V.; KOUVELIS, V. N.; TYPAS, M. A. Phylogenetic and biogeographic implications inferred by mitochondrial intergenic region analyses and ITS1-5.8S-ITS2 of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *B. brongniartii*. **BMC Microbiology**, v. 10, 2010.
- GONÇALVES, C. R. O gênero *Acromyrmex* no Brasil. **Studia Entomol.**, Petrópolis, v.4, n.1-4, p.113-180, 1961.
- GONZAGA, A. D.; SOUSA, S. G. A.; SILVA, N. M.; PEREIRA, J. O. Toxicidade de Urina de Vaca e da Manipueira de Mandioca Sobre Pragas Chaves do Abacaxi, **Rev. Bras. De Agroecologia**, v. 4, n. 2, 2009.
- GUÉDEZ, C.; CASTILLO, C.; CAÑIZALES, L.; OLIVAR, R. Control biológico: una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible. **Academia**, v. 7, n. 13, p. 50-74, 2008.
- GUERRERO, J.; MERA, M.; SALVO, H.; CARRILLO, R. Discriminación de cepas nativas chilenas del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* con marcadores moleculares RAPD. **Agro sur**, v. 28, n. 1, p. 81-91, 2000.
- GUTIÉRREZ, A. I.; SALDARRIAGA, Y. Observación de la patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* em soldados *Nasutitermes* sp. (Isoptera: Termitidae). **Revista Colombiana de Entomología**, v. 30, n. 2, p. 151-156, 2004.
- GUTIÉRREZ, M. E. M.; CÁRDENAS, Y. G.; LEQUERQUE, A. El género *Metarhizium* Sorokin y su aplicación en el control de insectos plagas. **Revista Cubana de Ciencias Biológicas**, v. 5, n. 2, p. 1-13, 2016-2017.
- GROSMAN, D. M.; UPTON, W. W.; MCCOOK, F. A.; BILLINGS, R. F. Attractiveness and efficacy of fipronil and sulfluramid baits for control of the *Texas leafcutting* ant. **Southwestern Entomologist**, v. 27, n. 3/4, 2002.
- HANSON, P.; HILJE, L. **Control Biológico de Insectos**. Turrialba: Centro Agronomico Tropical de Investigacion y Enseñanza, 1993.
- HUANES-CARRANZA, J.; WILSON-KRUGG, J.; Efecto de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre adultos y ninfas de *Oligonychus* sp. en condiciones de laboratorio. **Rebiol**, v. 36, n. 1, p. 51-58, 2016.

IKEDA, T.; NAGATA, K.; KONO, Y.; YEH, J. Z.; NARAHASHI, T. Fipronil modulation of GABAA receptor single-channel currents. **Pest Management Science**, v. 60, p. 487-492, 2004.

JURUENA, L. F. **As formigas cortadeiras**. *Ipagro Informa*, Porto Alegre, n.23, p.3-17, 1980.

LAURENTIS, V. L. **Helicoverpa armigera (HÜBNER) (Lepidoptera: Noctuidae): táticas para o manejo integrado**. 2017. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

LEITE, M. S. P.; IEDE, E. T.; PENTEADO, S. R. C.; ZALESKI, S. R. M.; CAMARGO, J. M. M.; RIBEIRO, R. D. Seleção de isolados de fungos entomopatogênicos para o controle de *Hedypathes betulinus* e avaliação da persistência. **Floresta**, v. 41, n. 3, p. 619-628, 2011.

LEÓN, G. A. La diversidad de insectos en cítricos y su importancia en los programas de manejo integrado de plagas. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecología**, n. 74, p. 85-93, 2005.

MARANHÃO, E. A. A.; MARANHÃO, E. H. A. Hongos entomopatógenos: importante ferramenta para el control de “moscas blancas” (Homoptera: Aleyrodidae). **Anais da academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 5/6, p. 209-242, 2009.

MASCARIN, G. M.; JARONSKI, S. T. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, 2016.

MATTE, W. D.; QUEIROZ, L. F.; CORASSA, J. N. Primeiro registro de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) atacando noni (*Morinda citrifolia* L.) em Colorado do Oeste (RO), Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p. 1-4, 2016.

MAYHÉ-NUNES, A. J. **Estudo de *Acromyrmex* (Hymenoptera, Formicidae) com ocorrência constatada no Brasil: subsídios para uma análise filogenética**. Dissertação. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1991.

MELO, D. R.; CRUZ, G. B.; REIS, R. C. S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Desenvolvimento dos fungos *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 e *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 sobre *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835). **Revista brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 3, p. 166-170, 2007.

- MEYER, S. T.; NEUBAUER, M.; SAYER, E. J.; LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; WIRTH, R. Leaf-cutting ants as ecosystem engineers: topsoil and litter perturbations around *Atta cephalotes* nests reduce nutrient availability. **Ecological Entomology**, v. 38, p. 497-504, 2013.
- MIRANDA, J. E.; ARAUJO, L. H. A. **Pragas da cultura do gergelim: biologia, danos e métodos de controle**. 1. ed. Campina Grande, Paraíba: Embrapa Algodão, 2003.
- MOINO JR., A.; ALVES, S. B.; LOPES, R. B.; NEVES, P. M. O. J.; PEREIRA, R. M.; VIEIRA, S. A. External development of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in the subterranean termite *Heterotermes tenuis*. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 2, p. 267- 273, 2002.
- MOREIRA, A. A.; FORTI, L. C.; CASTELLANI, M. A.; ANDRADE, A. P. P. Arquitetura dos ninhos das formigas cortadeiras de gramíneas. **Biológico**, v. 69, Supl. 2, p. 83-85, 2007.
- MORESSI, M.; NETO, A. M.; CREPALDI, R. A.; CARBONARI, V.; DEMÉTRIO, M. F.; SILVESTRE, R. Eficiência do controle mecânico de formigas cortadeiras (*Atta laevigata*) no reflorestamento com espécies nativas. **Biológico**, v. 69, Supl. 2, p. 471-473, 2007.
- MOUTINHO, P.; NEPSTAD, D. C.; DAVIDSON, E. A. Influence of leaf-cutting ant nests on secondary forest growth and soil properties in Amazonia. **Ecology**, v. 84, n. 5, p. 1265-1276, 2003.
- MONTOYA-CORREA, M.; MONTOYA-LERMA, J.; ARMBRECHT, I. ROPERO, M. C. G. Cómo responde la hormiga cortadora de hojas *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Myrmicinae) a la remoción mecánica de sus nidos? **Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle**, v. 8, n. 2, p. 1-8, 2007.
- MONTOYA-LERMA, J. et al. Leaf-cutting ants revisited: Towards rational management and control. **International Journal of Pest Management**, London, v. 58, n. 3, p. 225–247, 2012.
- MONZÓN, A. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. **Manejo Integrado de Plagas**, n. 63, p. 95-103, 2001.
- NAVA, D. E.; ZANARDI, O. Z.; MELO, M.; SILVA, S. D. A. Insetos praga e benéficos na cultura do tungue. Pelotas: **Embrapa Clima Temperado**, 2009.

OKUMURA, F. **Estudo voltamétrico e desenvolvimento de metodologia eletroanalítica para determinação do inseticida fipronil utilizando o eletrodo compósito de grafite-poliuretana.** Tese (Pós-graduação em Química), Universidade de São Paulo, São Carlos. 2009.

OLIVEIRA, B. M. S.; MELO, C. R.; ALVES, P. B.; SANTOS, A. A.; SANTOS, A. C. C.; SANTANA, A. S.; ARAÚJO, A. P. A.; NASCIMENTO, P. E. S.; BLANK, A. F.; BACCI, L. Essential Oil of *Aristolochia trilobata*: Synthesis, Routes of Exposure, Acute Toxicity, Binary Mixtures and Behavioral Effects on Leaf-Cutting Ants. **Molecules**, v. 22, 2017.

OTTATI-DE-LIMA, E. L. **Produção de *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (BALS.) Vuill. em diferentes substratos e efeito da radiação ultravioleta e da temperatura sobre estruturas infectivas desses entomopatógenos.** 2007. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo.

OTTATI-DE-LIMA, E. L.; FILHO, A. B.; ALMEIDA, J. E. M.; GASSEN, M. H.; WENZEL, I. M.; ALMEIDA, A. M. B.; ZAPPELLINI, L. O. Produção semissólida de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em diferentes substratos e efeito da radiação ultravioleta e da temperatura sobre propágulos desses entomopatógenos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 4, p. 651-659, 2010.

PAULI, G.; LOPES, R. B.; ALVES, S. B.; JUNIOR, E. R. D.; MASCARIN, G. M. Falsa broca aumenta disseminação de *Beauveria bassiana* em populações de campo da broca-do-rizoma da bananeira. **Ciência Rural**, v. 41, n. 11, p. 1867-1870, 2011.

PEDRINI, N.; ORTIZ-URQUIZA, A.; HUARTE-BONNET, C.; ZHANG, S.; KEYHANI, N. O. Targeting of insect epicuticular lipids by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: hydrocarbon oxidation within the context of host-pathogen interaction. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 24, p. 1-18, 2013.

PERRI, D.; GOROSITO, N.; FERNANDEZ, P.; BUTELER, M. Plant-based compounds with potential as push-pull stimuli to manage behavior of leaf-cutting ants. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 163, p. 150-159, 2017.

POTRICH, M.; ALVES, L. F. A.; HAAS, J.; SILVA, E. R. L.; DAROS, A.; PIETROWSKI, V.; NEVES, P. M. O. J. Seletividade de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* a

Trichogramma pretiosum Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 6, p. 822-826, 2009.

QUESADA-MORAGA, E.; RUIZ-GARCÍA, A.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. Laboratory Evaluation of Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* Against Puparia and Adults of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 99, n. 6, p. 1955-1966, 2006.

RANDO, J. S. S.; FORTI, L. C. Ocorrência de formigas *Acromyrmex Mayr*, 1865, em alguns municípios do Brasil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 27, n. 2, p. 129-133, 2005.

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. Diversity of Fungi Associated with *Atta bisphaerica* (Hymenoptera: Formicidae): The Activity of *Aspergillus ochraceus* and *Beauveria bassiana*. **Psyche**, p. 1-6, 2012.

RODRIGUES, A.; CARLETTI, C. D.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C. Leaf-cutting ant faecal fluid and mandibular gland secretion: effects on microfungi spore germination. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 64-67, 2008.

RODRIGUES, A.; PASSARINI, M. R. Z.; FERRO, M.; NAGAMOTO, N. S.; FORTI, L. C.; BACCI JR., M.; SETTE, L. D.; PAGNOCCA, F. C. Fungal communities in the garden chamber soils of leaf-cutting ants. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, p. 1186-1196, 2014.

ROMER, D.; BOLLAZZI, M.; ROCES, F. Carbon dioxide sensing in an obligate insectfungus symbiosis: CO₂ preferences of leafcutting ants to rear their mutualistic fungus. **Plos One**, v. 12, n. 4, p. 1-17, 2017.

ROSSI, G. D. **Explorando as interações hospedeiro-parasitoide para a identificação de moléculas com potencial biotecnológico**. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, São Paulo. 2012.

SALVADORI, J. R.; PEREIRA, P. R. V. S. Manejo integrado de corós em trigo e culturas associadas. Passo Fundo: **Embrapa Trigo**, 2006.

SCHAPOVALOFF, M. E.; ALVES, L. F. A.; URRUTIA, M. I.; LASTRA, C. C. L. Ocorrência natural de hongos entomopatógenos en suelos cultivados con yerba mate (*Ilex*

paraguariensis St. Hil.) en Misiones, Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 47, n. 2, p. 138-142, 2015.

SCHOENIAN, I.; SPITELLER, M.; GHASTE, M.; WIRTH, R.; HERZ, H.; SPITELLER, D. Chemical basis of the synergism and antagonism in microbial communities in the nests of leafcutting ants. **PNAS**, v. 108, n. 5, p. 1955-1960, 2011.

SILVA, J. C.; CASTRO, V. R.; XAVIER, B. A. **Cartilha do fazendeiro florestal**. 2. ed. Viçosa, Minas Gerais, 2008.

SILVA, L. C.; MOREIRA, R. A.; ROCHA, O. Toxicidade aguda do agrotóxico fipronil para o cladóceros *Bosmina freyi* De Melo and Hebert, 1994. **Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 8, n. 2, 2012.

SIMAS, V. R.; COSTA, E. C.; SIMAS, C. A. Controle de *Camponotus punctulatus* Mayr, 1868 (Hymenoptera: Formicidae). **Revista da FZVA**, v. 7/8, n. 1, p. 24-32, 2001.

SIMONATO, J.; GRIGOLLI, J. F. J.; OLIVEIRA, H. N. **Controle biológico de insetos-praga na soja**. In: LOURENÇÃO, A. L. F.; GRIGOLLI, J. F. J.; MELOTTO, A. M.; PITOL, C.; GITTI, D. de C.; ROSCOE, R. Maracaju, MS: Fundação MS, 2014, p. 178-193.

SOARES, I. M. F.; DELLA LUCIA, T. M. C.; SANTOS, A. A.; NASCIMENTO, I. C.; DELABIE, J. H. C. Caracterização de ninhos e tamanho de colônia de *Acromyrmex rugosus* (F. Smith) (Hymenoptera, Formicidae, Attini) em restingas de Ilhéus, BA, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 50, n. 1, p. 128-130, 2006.

TANADA, Y.; KAYA, H. K. **Insect Pathology**. Academic Press, London, 1993.

TRAVAGLINI, R. V.; STEFANELLI, L. E. P.; ARNOSTI, A.; CAMARGO, R. S.; FORTI, L. C. Isca encapsulada atrativa visando controle microbiano de formigas cortadeiras. **Tekhne e Logos**, v. 8, n. 3, p. 100-111, 2017.

TOFOLO, V. C.; GIANNOTTI, E.; PIZANO, M. A. Exposure of Workers of *Ectatomma brunneum* Smith (Hymenoptera: Formicidae: Ectatomminae) to ant Baits Containing Different Active Ingredients under Laboratory Conditions. **EntomoBrasilis**, v. 8, n. 1, p. 38-44, 2015.

UDO, M. S. B. **Avaliação dos efeitos tóxicos da exposição pré-natal ao Fipronil na prole de ratas Wistar**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo. 2012.

VALICENTE, F. H. Controle Biológico de pragas com entomopatógenos. **Informe Agropecuário**, v. 30, n. 251, p. 48-55, 2009.

VELÁSQUEZ, V. B.; CÁRCAMO, M. P.; MERIÑO, C. R.; IGLESIAS, A. F.; DURÁN, J. F. Intraspecific differentiation of Chilean isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* as revealed by RAPD, SSR and ITS markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 1, p. 89-99, 2007.

WEBER, N. A. Fungus-Growing Ants. **Science**, Washington D.C., v. 153, n. 3736, p. 587–604, 1966.

XIAO, G.; YING, S.; ZHENG, P.; WANG, Z.; ZHANG, S.; XIE, X.; SHANG, Y.; ST LEGER, R. J.; ZHAO, G.; WANG, C.; FENG, M. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. **Scientific Reports**, v. 2, p. 1-10, 2012.

YÁÑEZ, M.; FRANCE, A. Effects of fungicides on the development of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 70, n. 3, p. 390-398, 2010.

ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J. C.; SANTOS, J. C.; SILVA, W. L. P.; RIBEIRO, G.; T.; LEMES, P. G. An Overview of Integrated Management of Leaf-Cutting Ants (Hymenoptera: Formicidae) in Brazilian Forest Plantations. **Forests**, v. 5, p. 439-454, 2014.

ZORZETTI, J.; SANTORO, P. H.; CONSTANSKI, K. C.; NEVES, P. M. O. J. Sensibilidade de conídios de *Beauveria bassiana* a fatores abióticos após sucessivos cultivos *in vitro*. **Ciências Agrárias**, v. 35, n. 4, p. 1773-1784, 2014.

3. DESENVOLVIMENTO

ARTIGO 1:

3.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

Artigo aceito na revista Acta Biológica Catarinense.

Caracterização morfofisiológica de fungos entomopatogênicos **Morphophysiological characterization of entomopathogenic fungi**

Mateus Alves SALDANHA^{1,2}, Ervandil Corrêa COSTA¹, Marlove Fátima Brião
MUNIZ¹, Alexsandra Cezimbra QUEVEDO¹ & Janaina Silva SARZI¹

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi realizar a caracterização morfofisiológica de isolados de *Beauveria bassiana*, *Cordyceps fumosorosea* e *Metarhizium anisopliae*, em diferentes meios de cultura. Para tanto, foram utilizados quatro isolados de fungos entomopatogênicos e avaliados o crescimento micelial, a esporulação, coloração e caracterização dimensional dos conídios em quatro meios de cultura. O isolado de *B. bassiana* apresentou maior crescimento micelial e esporulação no meio V8CaCO₃; o micélio aéreo se apresentou de cor branca em todos os meios. O isolado de *C. fumosorosea* apresentou maior crescimento micelial no meio de cultura completo e maior esporulação no meio BDA; o micélio aéreo variou de vermelho-claro a branco. Em relação aos isolados de *M. anisopliae*, o maior crescimento micelial ocorreu no meio V8CaCO₃ e as maiores produções de esporos no meio de cultura BDA e completo; a coloração do micélio aéreo variou entre branco e tons de amarelo e verde. Os maiores valores de IVCM foram observados quando utilizado o meio V8CaCO₃, e os menores, o meio ágar-água. Verifica-se que os meios de cultura influenciam nas características morfofisiológicas dos isolados de fungos entomopatogênicos. Considerando a viabilidade econômica, o meio de cultura BDA é o mais recomendado para a produção massal de fungos entomopatogênicos.

Palavras-chave - *Beauveria bassiana*. Controle biológico. *Cordyceps fumosorosea*. *Metarhizium anisopliae*.

ABSTRACT

The objective of the present work was to carry out the morphophysiological characterization of *Beauveria bassiana*, *Cordyceps fumosorosea* and *Metarhizium anisopliae* isolates in different culture media. Therefore, four isolates of entomopathogenic fungi were used and the mycelial growth, sporulation, color and dimensional characterization of conidia were evaluated in four culture media. The *B. bassiana* isolate showed greater mycelial growth and sporulation in V8CaCO₃ medium; aerial mycelium was white in all media. The isolate of *C. fumosorosea* showed greater mycelial growth in the complete culture medium and greater sporulation in PDA medium; aerial mycelium ranged from light red to white. Regarding *M. anisopliae* isolates, the greatest mycelial growth occurred in V8CaCO₃ medium and the highest spore production in PDA and complete culture medium; the aerial mycelium

¹ Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Defesa Fitossanitária. Av. Roraima, nº 1000, Cidade Universitária, Bairro Camobi – CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

² Autor para correspondência: mtsmateusalves@gmail.com.

color varied between white and shades of yellow and green. The highest values of IVCm were observed when the medium V8CaCO₃ was used, and the lowest, the agar-water medium. It is verified that the culture media influence the morphophysiological characteristics of the entomopathogenic fungi isolates. Considering its economic viability, the PDA culture medium is the most recommended for mass production of entomopathogenic fungi.

Key words - *Beauveria bassiana*. Biological control. *Cordyceps fumosorosea*. *Metarhizium anisopliae*.

INTRODUÇÃO

O setor florestal brasileiro está em constante mudança no que diz respeito ao manejo adequado de florestas, dado que nas últimas décadas, é notável sua importância econômica para o país. No Brasil, as florestas plantadas ocupam 7,83 milhões de hectares e são responsáveis por mais de 90% de toda a madeira utilizada para fins produtivos, contribuindo significativamente para a conservação da biodiversidade, recuperação de áreas degradadas, regulação dos recursos hídricos e geração de energia renovável (IBÁ, 2019).

Com o constante aumento de áreas com plantios homogêneos, utilizando-se de espécies exóticas de rápido crescimento, houve também um acréscimo significativo de problemas fitossanitários, especialmente relacionados a insetos-praga. Como método de controle, tem-se feito uso de produtos químicos (ORTIZ *et al.*, 2017), porém, tal alternativa tem apresentado grandes problemas, em virtude da contaminação ambiental, baixa especificidade, possibilidade de ressurgência da praga, seleção de insetos resistentes e dos riscos potenciais a saúde humana e animal (BARBOSA *et al.*, 2015).

Dessa maneira, tem-se observado expressivo crescimento no incentivo em pesquisas e no uso de produtos que causem menores impactos ambientais, aumentando o consumo de produtos biológico (FONTES *et al.*, 2020). O controle biológico é definido como o uso de técnicas baseadas no controle, utilizando inimigos naturais (ESCOBAR-RAMÍREZ *et al.*, 2019). No Brasil, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o uso de produtos biológicos aumentou mais de 70% no ano de 2018, deixando o país entre os primeiros no uso de controles biológicos do mundo (MAPA, 2020).

Com menor impacto ambiental, o controle biológico visa manter o agroecossistema mais próximo possível de um equilíbrio biológico, onde a densidade populacional da praga mantém-se abaixo do nível de dano econômico (ZANUNCIO *et al.*, 2018). Entre os microrganismos que causam doenças aos insetos, os fungos entomopatogênicos são os mais importantes sendo responsáveis

por cerca de 80% das enfermidades, sendo considerados ferramentas importantes no Manejo Integrado de Pragas (MIP) (LOPES *et al.*, 2018; VALADARES-INGLIS *et al.*, 2020). Assim, o controle biológico com entomopatógenos é considerado uma alternativa viável, segura e compatível com o ambiente para o controle de insetos-praga (CHÁVEZ *et al.*, 2016).

Os fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae) e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Hypocreales: Clavicipitaceae) são espécies importantes de fungos entomopatogênicos no controle de pragas em ambientes florestais, sendo base de diversos produtos comerciais. Já o fungo *Cordyceps fumosorosea* (Wize) (Hypocreales: Cordycipitaceae) ainda se apresenta em fase inicial de estudos como estratégia de controle de insetos-praga. Para tanto, são necessárias pesquisas objetivando a caracterização morfofisiológica destas espécies de fungos entomopatogênicos em diferentes meios de cultura, visto que ainda são poucos os trabalhos desenvolvidos nesta área, e os mesmos são de suma importância, pois, conforme Nozaki *et al.* (2004), alguns meios de cultura são mais favoráveis para crescimento e esporulação do que outros, por apresentarem carboidratos complexos que são adequados para a produção de hifas vegetativas ou esporos. Outro fator a se considerar são os custos de produção dos meios de cultura, tendo em vista que, visando a produção em larga escala de fungos entomopatogênicos para o controle biológico de insetos-praga, deve-se considerar a viabilidade econômica, ou seja, utilizar um meio de cultura de baixo custo e que garanta um bom desenvolvimento das características morfológicas dos isolados.

A produção de fungos entomopatogênicos representa uma etapa crítica e limitante no desenvolvimento de um programa de controle microbiano para um determinado inseto-praga (Sene *et al.*, 2010), sendo que o estudo de metodologias de produção é indispensável para tornar o controle biológico de pragas economicamente viável para ser aplicado em grandes áreas. Assim, o objetivo do presente trabalho foi realizar a caracterização morfofisiológica de isolados de *Beauveria bassiana*, *Cordyceps fumosorosea* e *Metarhizium anisopliae*, em diferentes meios de cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Fitopatologia “Dr^a Eloicy Minussi”, pertencente ao Departamento de Defesa Fitossanitária, Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria.

Repicagem dos isolados de fungos entomopatogênicos

Foram utilizados quatro isolados de fungos entomopatogênicos, sendo um de *Beauveria bassiana* (IBCB 632), um de *Cordyceps fumosorosea* (IBCB 130) e dois de *Metarhizium anisopliae* (IBCB 348 e IBCB 425), os quais foram obtidos junto ao Instituto Biológico de São Paulo, Coleção de Fungos Entomopatogênicos “Oldemar Cardin Abreu”.

Para a repicagem dos isolados, foram utilizadas placas de Petri esterilizadas, contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar), onde foi repicado no centro de cada placa uma pequena quantidade de estruturas do fungo. Após a inoculação, as placas foram mantidas em câmara climatizada do tipo B.O.D. a 25 ± 2 °C e em regime de luz alternado com fotoperíodo de 12 horas, durante um período de 7 dias para crescimento e esporulação dos fungos.

Para a caracterização morfofisiológica dos isolados de fungos entomopatogênicos, foram testados quatro meios de cultura, sendo eles: ágar-água (AA), suco de vegetais (V8CaCO₃ – 200 mL de suco de vegetais; 16 g de ágar; 3,2 g de CaCO₃ e 800 mL de água destilada), batata-dextrose-ágar (BDA – 39 g de produto comercial e 1000 mL de água) e meio completo (MC- 0,36 g de KH₂PO₄; 1,05 g de Na₂HPO₄·7H₂O; 0,60 g de MgSO₄·7H₂O; 1,00 g de KCl; 10,00 g de glucose; 1,58 g de NaNO₃; 5,00 g de extrato de levedura; 20,00 g de ágar e 1000 mL de água destilada) (RODRIGUES *et al.*, 2016).

Decorridos os sete dias de crescimento micelial nas placas de Petri contendo os isolados, foram preparadas suspensões de esporos. Para isso, adicionou-se 10 mL de água destilada estéril na placa de Petri e, com o auxílio de alça de Drigalski foi realizada a raspagem do micélio fúngico na superfície do meio, sendo a suspensão filtrada em uma dupla camada de gaze para um béquer e adicionado espalhante adesivo a 0,01% (Tween 40) para realizar a contagem dos esporos em câmara de Neubauer. Após a contagem de esporos a suspensão foi calibrada para uma concentração de 1×10^6 esporos por mL.

Com auxílio de um pipetador, foi transferida uma gota de 10 µL da suspensão de esporos no centro de cada placa de Petri, contendo os meios de cultura descritos

anteriormente. Posteriormente, as placas foram incubadas em câmaras do tipo B.O.D. em regime de temperatura e luz controlados ($25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas).

Avaliação do crescimento micelial e esporulação dos isolados de fungos entomopatogênicos

A avaliação do crescimento micelial constituiu na medição, a cada 24 horas, do diâmetro da colônia em sentidos diametralmente opostos, com auxílio de paquímetro digital, por um período de 15 dias. A partir desses dados, calculou-se o Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) para cada isolado em cada meio de cultura, a partir da fórmula de Maguire (1962): $IVCM = \sum ((D - D_a)/N)$, em que: IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial; D = diâmetro médio atual da colônia; D_a = diâmetro médio da colônia do dia anterior; N = número de dias após a incubação.

Para a avaliação da esporulação, foram adicionados 10 mL de água destilada esterilizada em cada placa de Petri, sendo, em seguida, realizada a raspagem da colônia com auxílio de alça de Drigalski para que houvesse a liberação dos esporos. A suspensão foi pipetada e filtrada em uma dupla camada de gaze para retenção dos fragmentos miceliais e meio de cultura. A contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio óptico, com aumento de 40 vezes.

Caracterização dimensional dos conídios e coloração das colônias dos isolados de fungos entomopatogênicos

Para a caracterização dimensional dos conídios, foram preparadas lâminas de microscopia, contendo uma pequena quantidade de esporos dos isolados e corante. A largura e o comprimento de 10 conídios por tratamento foram medidos com microscópio óptico, contendo um micrômetro acoplado, em um aumento de 40 vezes. Já a determinação da coloração das colônias foi visual, com auxílio de Carta de Munsell (MUNSELL, 2009), sendo observado a coloração na parte superior e inferior e o aspecto da colônia.

Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Para os isolados de *Metarhizium anisopliae*, foi utilizado um bifatorial, composto de dois fatores: quatro meios de cultura x dois isolados. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias ao teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o software SISVAR versão 5.6.86 (FERREIRA, 2014).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação ao isolado de *Beauveria bassiana* (IBCB 632), verificou-se que o maior crescimento micelial ocorreu no meio de cultura V8CaCO₃ (63,35 mm), seguido dos meios completo (52,02 mm), BDA (46,11 mm) e ágar-água (37,08 mm), havendo diferenças estatísticas no crescimento micelial em relação ao meio de cultura (Tabela 1).

Tabela 1 - Crescimento micelial (mm), índice de velocidade de crescimento micelial (mm/dia) e esporulação (esporos/mL) de *Beauveria bassiana* em diferentes meios de cultura, aos 15 dias de incubação*.

Meio de cultura	Crescimento micelial (mm)	IVCM (mm/dia)	Esporulação (esporos/mL)
AA	37,08 c	0,58 c	$4,43 \times 10^4$ c
BDA	46,11 b	0,97 b	$3,56 \times 10^6$ b
MC	52,03 b	0,98 b	$3,54 \times 10^6$ b
V8CaCO ₃	63,35 a	1,09 a	$5,86 \times 10^6$ a
Média geral	49,64	0,91	$3,25 \times 10^6$
CV (%)	6,6	4,98	18,91

*Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. CV= Coeficiente de variação; AA = ágar-água; BDA = batata-dextrose-ágar; V8CaCO₃ = suco de vegetais; MC = meio completo; IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial.

Ao analisar os valores de IVCM, constatou-se que o maior valor foi encontrado no meio V8CaCO₃ (1,09 mm/dia). Não foram encontradas diferenças significativas entre os meios BDA e completo, com valores de 0,97 e 0,98 mm/dia,

respectivamente. Diferindo estatisticamente dos demais, o menor valor foi encontrado no meio ágar-água, 0,58 mm/dia (Tabela 1).

Rodrigues *et al.* (2016) observaram, após 10 dias de crescimento em meio de cultura BDA, que *B. bassiana* teve variação de 15,47 mm a 32,96 mm no diâmetro das colônias. Já García *et al.* (2011), verificaram, após 10 dias de incubação em meio de cultura BDA, que o crescimento das colônias de *B. bassiana* foi de 20 mm, afirmando que os isolados apresentaram um crescimento lento e circular. Martins (2014) encontrou, após sete dias de incubação de isolados de *B. bassiana*, diâmetros médios entre 18 e 26 mm. Estes resultados corroboram com o presente estudo, visto que, em meio de cultura BDA, a média de crescimento micelial de *B. bassiana* aos dez dias de incubação foi de 30 mm.

Ainda analisando os resultados da Tabela 1, verificou-se que a respeito da esporulação, o isolado apresentou variabilidade na produção de esporos nos diferentes meios de cultura. O meio V8CaCO₃ obteve maior esporulação ($5,86 \times 10^6$ esporos/mL), não houve diferenças significativas entre os meios BDA e completo, sendo encontrados $3,56 \times 10^6$ e $3,54 \times 10^6$ esporos/mL, respectivamente. No meio de cultura ágar-água, o isolado apresentou o menor valor de esporulação ($4,43 \times 10^4$ esporos/mL), diferindo estatisticamente dos demais meios de cultura testados. Rodrigues *et al.* (2016) observaram que os valores encontrados variaram entre 2890×10^4 conídios/mL e 13910×10^4 conídios/mL para isolados de *B. bassiana*. Martins (2014), caracterizando isolados de *B. bassiana*, encontrou valores entre 0,2 a $26,2 \times 10^8$ conídios/colônia. Fomentini *et al.* (2015) encontraram valores entre 2,2 e 3,2 cm para o diâmetro da colônia e produção de 0,1 a 13×10^7 conídios/colônia. Observando esses resultados, é possível verificar que há variação na esporulação dos isolados, onde os valores de esporulação foram maiores em relação aos resultados obtidos no presente estudo.

Em relação ao isolado de *Cordyceps fumosorosea* (IBCB 130), verificou-se que o maior crescimento micelial se deu no meio de cultura completo (67,94 mm), seguido do meio V8CaCO₃ e BDA, com médias de crescimento de 67,43 mm e 63,34 mm, respectivamente. Diferindo estatisticamente dos demais, no meio ágar-água ocorreu o menor crescimento micelial, com média de 48,30 mm (Tabela 2).

Tabela 2 - Crescimento micelial (mm), índice de velocidade de crescimento micelial (mm/dia) e esporulação (esporos/mL) de *Cordyceps fumosorosea* em diferentes meios de cultura, aos 15 dias de incubação*.

Meio de cultura	Crescimento micelial (mm)	IVCM (mm/dia)	Esporulação (esporos/mL)
AA	48,30 b	0,62 b	6,14 x 10 ⁴ b
BDA	63,34 ab	1,07 a	8,05 x 10 ⁶ a
MC	67,94 a	1,15 a	2,39 x 10 ⁶ ab
V8CaCO ₃	67,34 a	1,21 a	6,81 x 10 ⁶ a
Média geral	61,73	1,01	4,33 x 10 ⁶
CV (%)	14,22	10,53	17,03

*Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. CV= Coeficiente de variação; AA = ágar-água; BDA = batata-dextrose-ágar; V8CaCO₃ = suco de vegetais; MC = meio completo; IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial.

O isolado de *C. fumosorosea* apresentou maior IVCM no meio V8CaCO₃ (1,21 mm/dia), porém, não diferiu estatisticamente dos meios BDA e completo, com 1,07 e 1,15 mm/dia, respectivamente, já o menor valor foi encontrado no meio ágar-água, com 0,62 mm/dia (Tabela 2).

Ainda analisando os resultados da Tabela 2, verificou-se que a maior esporulação de *C. fumosorosea* ocorreu no meio BDA (8,05 x 10⁶ esporos/mL), seguido pelo meio V8CaCO₃ e completo (6,81 x 10⁶ e 2,39 x 10⁶ esporos/mL, respectivamente). A menor produção de esporos se deu no meio ágar-água, com 6,14 x 10⁴ esporos/mL.

Verificando o crescimento micelial e esporulação de diferentes espécies de *Cordyceps* em meio de cultura SAB (Sabouraud-Ágar-Peptona), Lopes *et al.* (2021) encontraram para *C. fumosorosea* (isolado ESALQ 1296), aos 12 dias de incubação, média de crescimento de 44,40 mm e esporulação média de 2,82 x 10⁶ esporos/mL. Mesmo utilizando o meio de cultura SAB, este estudo corrobora com os resultados do presente trabalho, quando comparado com os valores de média geral de crescimento e esporulação aos 12 dias de incubação (49,38 mm e 3,46 x 10⁶ esporos/mL).

Em relação aos quatro meios de cultura testados, o diâmetro das colônias de *Metarhizium anisopliae* variou entre 14,73 mm (IBCB 425) e 69,47 mm (IBCB 348), apresentando valor médio de 48,41 mm (Tabela 3). Com relação ao isolado IBCB 348, o maior crescimento da colônia se deu no meio de cultura V8CaCO₃ (69,47 mm), seguido dos meios BDA (49,00 mm), completo (46,75 mm) e ágar-água (34,91 mm), havendo diferenças estatísticas no crescimento micelial em relação ao meio de cultura. Já para o isolado IBCB 425, não foram encontradas diferenças significativas entre os meios V8CaCO₃ e completo, com 60,11 mm e 59,83 mm, respectivamente, o meio ágar-água apresentou menor média de crescimento micelial (14,73 mm), diferindo estatisticamente dos demais. Em todos os meios de cultura testados, verificaram-se diferenças significativas em relação ao crescimento micelial entre os isolados (Tabela 3).

Tabela 3 - Crescimento micelial (mm), índice de velocidade de crescimento micelial (mm/dia) e esporulação (esporos/mL) de *Metarhizium anisopliae* em diferentes meios de cultura, aos 15 dias de incubação*.

Isolado	AA	BDA	MC	V8CaCO ₃	Média geral	CV (%)
Crescimento micelial (mm)						
IBCB 348	34,91 Ca *	49,00 Bb	46,75 Bb	69,47 Aa	48,41	4,14
IBCB 425	14,73 Cb	52,46 Ba	59,83 Aa	60,11 Ab		
Índice de velocidade de crescimento micelial (mm/dia)						
IBCB 348	0,49 Ca	1,01 Aa	0,91 Ba	1,04 Aa	0,76	5,15
IBCB 425	0,21 Cb	0,74 Bb	0,82 Bb	0,90 Ab		
Esporulação (esporos/mL)						
IBCB 348	4,51 x 10 ⁴ Ca	6,82 x 10 ⁶ Aa	2,35 x 10 ⁶ Ba	6,10 x 10 ⁶ Aa	2,72 x 10 ⁶	16,75
IBCB 425	5,96 x 10 ⁴ Ba	1,20 x 10 ⁶ Bb	3,50 x 10 ⁶ Aa	1,71 x 10 ⁶ ABb		

*Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. CV= Coeficiente de variação; AA = ágar-água; BDA = batata-dextrose-água; V8CaCO₃ = suco de vegetais; MC = meio completo; IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial.

Os resultados deste estudo corroboram com o trabalho de caracterização morfológica de *M. anisopliae* realizado por Bezerra (2012), que observou, em meio de cultura BDA, após 14 dias de incubação, que o tamanho das colônias variou

entre 29,66 mm e 51,33 mm de diâmetro, com média de 43,12 mm. Já García *et al.* (2011) observaram, após 10 dias de crescimento de *M. anisopliae*, diâmetro de 25 mm, apresentando uma coloração que variou do verde-oliva ao verde escuro. Adicionalmente, Fernandes *et al.* (2010), ao analisarem o tamanho das colônias de isolados de *M. anisopliae*, encontraram médias de diâmetros inferiores a 70 mm.

Em relação aos isolados de *M. anisopliae*, verificou-se que o maior IVCM variou entre 0,21 mm/dia (IBCB 425) e 1,04 mm/dia (IBCB 348), com média geral de 0,76 mm/dia (Tabela 3). A respeito do isolado IBCB 348, o maior IVCM ocorreu no meio V8CaCO₃ (1,04 mm/dia), não diferindo estatisticamente quando comparado com o meio BDA (1,01 mm/dia). Em contrapartida, o menor valor pode ser observado no meio ágar-água, sendo este de 0,49 mm/dia.

Da mesma forma que o isolado IBCB 348, o isolado IBCB 425 apresentou maior IVCM no meio V8CaCO₃ (0,90 mm/dia). Não foram encontradas diferenças significativas entre os meios BDA e completo (0,74 e 0,82 mm/dia, respectivamente) e, novamente o menor valor de IVCM foi observado no meio ágar-água, com 0,21 mm/dia. Em todos os meios de cultura testados, houveram diferenças significativas em relação ao valor de IVCM entre os isolados.

Os valores de esporulação de *Metarhizium anisopliae* em diferentes meios de cultura variaram entre 4,51 x 10⁴ esporos/mL (IBCB 348) e 6,82 x 10⁶ esporos/mL (IBCB 348), sendo o valor médio de 2,72 x 10⁶ esporos/mL (Tabela 3). O isolado IBCB 348 apresentou maior esporulação nos meios BDA e V8CaCO₃, com 6,82 x 10⁶ e 6,10 x 10⁶ esporos/mL, respectivamente, diferindo estatisticamente dos demais, sendo que a menor esporulação se deu no meio ágar-água, com 4,51 x 10⁴ esporos/mL. Com relação ao isolado IBCB 425, a maior esporulação se deu no meio completo (3,50 x 10⁶ esporos/mL), seguido pelo meio V8CaCO₃ (1,71 x 10⁶ esporos/mL), e a menor produção de esporos se deu no meio ágar-água (5,96 x 10⁴ esporos/mL), não havendo diferença significativa entre este e o meio BDA (1,20 x 10⁶ esporos/mL).

Analisando os valores de crescimento micelial e esporulação de todos os isolados, verificou-se que quando submetidos ao meio ágar-água, foram encontrados os menores resultados. Tal fato pode ser justificado pela falta de nutrientes que o meio possui, o que ocasiona um menor crescimento e esporulação dos fungos (CANO *et al.*, 2020). Em contrapartida, ao utilizar os demais meios (BDA, completo e V8CaCO₃), foram obtidos maiores valores de crescimento micelial e

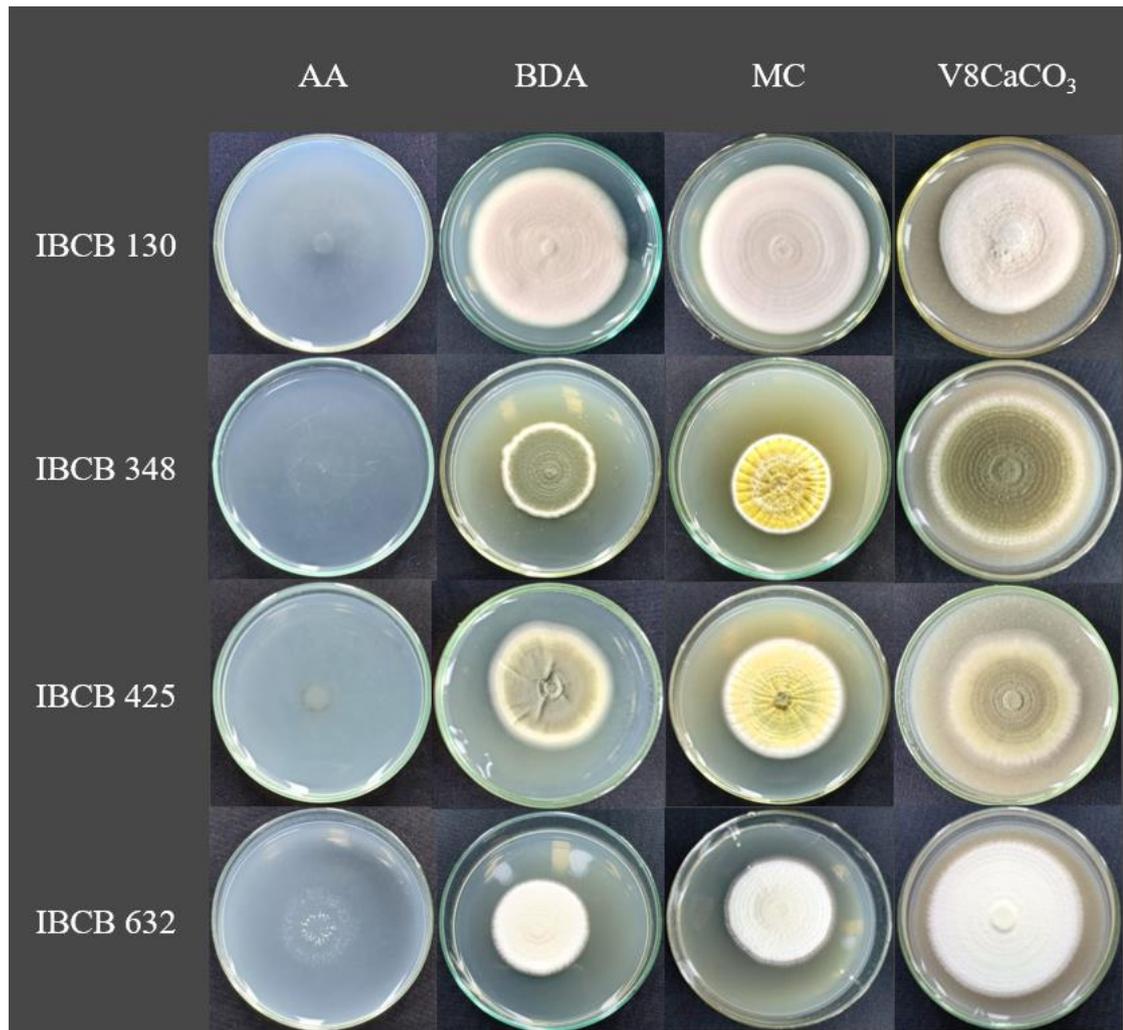
esporulação dos isolados. O maior desenvolvimento dos isolados nestes meios de cultura se dá devido as fontes de carboidratos existentes nos mesmos, tendo em vista que este nutriente é de suma importância para o crescimento e esporulação de fungos entomopatogênicos (ABATI, 2015).

Tendo em vista que para a produção massal de fungos entomopatogênicos para o controle biológico, a esporulação abundante do microrganismo é um fator fundamental para a sua implementação no Manejo Integrado de Pragas, os meios BDA, completo e V8CaCO₃ suprem essa necessidade. Porém, ao se considerar os fatores econômicos necessários para a viabilidade da produção de fungos entomopatogênicos em larga escala, verifica-se que o meio de cultura BDA é o mais indicado, considerando seu menor custo de produção.

Com relação a caracterização dimensional dos conídios, o isolado de *Beauveria bassiana* apresentou largura e comprimento médio de conídios de 2,7 µm e 3,1 µm, respectivamente. O isolado de *Cordyceps fumosorosea* apresentou largura média de 1,9 µm e comprimento médio de 2,1 µm. Para os isolados de *Metarhizium anisopliae*, foi observada largura média dos conídios de 2,5 µm e 4,3 µm para os isolados IBCB 348 e IBCB 425, respectivamente e, em relação ao comprimento, os conídios apresentaram média de 5,6 µm para o isolado IBCB 348 e 4,5 µm para o isolado IBCB 425.

Para o isolado de *Beauveria bassiana* as colônias apresentaram micélio aéreo de coloração branca em todos os meios de cultura avaliados (Figura 1); já a coloração do reverso da placa de Petri apresentou variação entre amarelo e marrom. Em relação ao aspecto das colônias, o isolado apresentou como característica o aspecto aveludado (Tabela 4). Corroborando com o presente trabalho, Rodrigues *et al.* (2016) verificaram que as colônias de *Beauveria bassiana* apresentaram coloração esbranquiçada, com pequenas regiões variando em tonalidade para branco-amareladas.

Figura 1 - Aspecto das colônias de isolados de *Beauveria bassiana*, *Cordyceps fumosorosea* e *Metarhizium anisopliae* em diferentes meios de cultura, após 15 dias de incubação.



Em que: IBCB 130 = isolado de *Cordyceps fumosorosea*; IBCB 348 e IBCB 425 = isolados de *Metarhizium anisopliae*; IBCB 632 = isolado de *Beauveria bassiana*; AA = ágar-água; BDA = batata-dextrose-ágar; MC = meio completo; V8CaCO₃ = suco de vegetais.

Tabela 4 - Coloração e aspecto das colônias de *Beauveria bassiana* em diferentes meios de cultura*.

Meio de cultura	Coloração da colônia	Coloração reverso	Aspecto da colônia
BDA	branco	amarelo-claro	aveludado
V8CaCO ₃	branco	marrom-claro	aveludado
MC	branco	amarelo-claro	aveludado
AA	branco	branco	aveludado

*De acordo com Munsell (2009). AA = ágar-água; BDA = batata-dextrose-ágar; V8CaCO₃ = suco de vegetais; MC = meio completo.

Em relação ao isolado de *Cordyceps fumosorosea*, as colônias apresentaram coloração que variou de vermelho-claro ao branco (Figura 1); já o reverso da placa de Petri variou entre tons de vermelho e branco. No que diz respeito ao aspecto das colônias, verificou-se que em todos os meios de cultura utilizados, o isolado apresentou como característica o aspecto aveludado (Tabela 5). Em contrapartida, Lopes *et al.* (2021) observaram as colônias de *Cordyceps fumosorosea* em meio SAB com aspecto cotonoso e cor branca, tal fato pode ser explicado pelos diferentes meios de cultura utilizados.

Tabela 5 - Coloração e aspecto das colônias de *Cordyceps fumosorosea* em diferentes meios de cultura*.

Meio de cultura	Coloração da colônia	Coloração reverso	Aspecto da colônia
BDA	vermelho-claro	vermelho-claro	aveludado
V8CaCO ₃	vermelho-claro	vermelho-claro	aveludado
MC	vermelho-claro	vermelho-brilhante	aveludado
AA	branco	branco	aveludado

*De acordo com Munsell (2009). AA = ágar-água; BDA = batata-dextrose-ágar; V8CaCO₃ = suco de vegetais; MC = meio completo.

Os isolados de *Metarhizium anisopliae* apresentaram micélio aéreo da colônia que variou entre tons de verde, amarelo e branco (Figura 1). Já a coloração do reverso da placa de Petri apresentou tons de amarelo, verde-oliva e branco. As colônias de *Metarhizium anisopliae* apresentaram como principal característica o aspecto aveludado em todos os meios de cultura testados (Tabela 6). Corroborando com o presente estudo, Jones (2017) verificou em isolados de *Metarhizium* spp., que inicialmente as colônias apresentaram coloração branca, tornando-se amarelas com o início da produção de conídios que se concentraram mais ao centro e, com o amadurecimento, conferiram às colônias colorações que variaram em tonalidades de verde-oliva. O autor verificou ainda que o reverso das colônias apresentou colorações que variaram de amarelo claro a alaranjado, e que, em geral, as colônias apresentaram aspecto pulverulento e crescimento de aparência entre lisa e zonada. É importante destacar que a variação na coloração das colônias no reverso das

placas de Petri se dá principalmente devido à influência dos diferentes meios de cultura.

Tabela 6 - Coloração e aspecto das colônias de *Metarhizium anisopliae* em diferentes meios de cultura*.

Isolado	Meio de cultura	Coloração da colônia	Coloração reverso	Aspecto da colônia
IBCB				
348	BDA	verde-acinzentado	amarelo-claro	aveludado
IBCB			verde-oliva-	
348	V8CaCO ₃	verde-acinzentado	acinzentado	aveludado
IBCB				
348	MC	amarelo	amarelo	aveludado
IBCB				
348	AA	branco	branco	aveludado
IBCB				
425	BDA	verde-acinzentado	amarelo-claro	aveludado
IBCB			verde-oliva-	
425	V8CaCO ₃	verde-acinzentado	acinzentado	aveludado
IBCB				
425	MC	amarelo	amarelo	aveludado
IBCB				
425	AA	branco	branco	aveludado

*De acordo com Munsell (2009). AA = ágar-água; BDA = batata-dextrose-ágar; V8CaCO₃ = suco de vegetais; MC = meio completo.

Cabe ressaltar que a coloração da colônia e do reverso se apresentou na cor branca, quando avaliado o meio de cultura ágar-água, em todos os isolados estudados. Novamente, deve-se considerar que este meio de cultura possui uma menor quantidade de nutrientes, com isso, interferiu no desenvolvimento dos fungos e conseqüentemente, impediu que os mesmos atingissem a coloração característica que pode ser observada nos demais meios de cultura utilizados neste experimento.

CONCLUSÕES

Os meios de cultura influenciam nas características morfofisiológicas dos isolados de *B. bassiana*, *C. fumosorosea* e *M. anisopliae*.

Considerando a viabilidade econômica, o meio de cultura BDA é o mais recomendado para a produção massal de fungos entomopatogênicos para o controle biológico de insetos-praga.

REFERÊNCIAS

- Abati, K. Produção do fungo entomopatogênico *Metarhizium rileyi* (Farlow) por fermentação líquida e sólida. [Dissertação de Mestrado]. Piracicaba: Universidade de São Paulo; 2015.
- Barbosa, R. H.; Kassab, S. O.; Pereira, F. F.; Rossoni, C. Controle químico e biológico de *Mahanarva fimbriolata* Stal, 1854 (Hemiptera: Cercopidae) para regiões produtoras de cana-de-açúcar de Mato Grosso do Sul. *Ambiência*. 2015; 12(1): 247-255. DOI: <https://doi.org/10.5935/ambiencia.2015.01.15nt>.
- Bezerra, S. Q. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* s.l. para o controle biológico de *Rhipicephalus microplus* a partir da caracterização morfológica e molecular e testes de patogenicidade. [Tese de Doutorado]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2012.
- Cano, E. F. R.; Nimet, M. S.; Batistella, M. A.; Maiorki, F. M.; Gibbert, F. J.; Mascaro, M. H. N. Crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. em diferentes meios de cultura. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*. 2020; 3(4): 3119 – 3126. DOI: <https://doi.org/10.34188/bjaerv3n4-032>.
- Chávez, B. Y.; Rojas, J. C.; Barrera, J. F.; Gómez, J. Evaluación de la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Pachycoris torridus* en Laboratorio. *Southwestern Entomologist*. 2019; 41(3): 783-790. DOI: <https://doi.org/10.3958/059.041.0320>.
- Escobar-Ramírez, S.; Grassa, I.; Armbrrecht, I.; Tscharnk, T. Biological control of the coffee berry borer: Main natural enemies, controlsuccess, and landscape influence. *Biological Control*. 2019; 136. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.05.011>.
- Fernandes, É. K. K.; Keyser, C. A.; Rangel, D. E. M.; Miller, M. P.; Roberts, D. W. Characterization of *Metarhizium* species and varieties based on molecular analysis, heat tolerance and cold activity. *Journal of Applied Microbiology*. 2010; 108(1): 115- 128. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04422.x>.
- Ferreira, D. F. Sisvar: A Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e Agrotecnologia*. 2014; 38(2): 109-112. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>.
- Fomentini, M. A.; Alves, L.F.A; Schapovaloff, M.E.; Mamprim, A.K.; Bonini, A.K.; Pinto, F.G. da S. Characterization and activity of entomopathogenic fungi isolates against “Paraguay tea ampul” (*Gyropsylla spegazziniana*) (Lizer & Trelles) (Hemiptera: Psyllidae). *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*. 2015; 36(6): 3553 – 3566. DOI: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n6p3553>.
- Fontes, E. M. G.; Pires, C. S. S.; Suji, E. R. Estratégias de uso e histórico. In: Fontes, E. M. G., Valadares-Ingles, M. C. (Ed). –Brasília, DF: Embrapa, 2020. p. 21-44.
- García, M. A. G.; Cappello, S. G.; Leshner, J. M. G.; Molina, R. F. M. Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatogénos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. *Horizonte sanitario*. 2011; 10(2): 21-28.

IBÁ – Indústria Brasileira De Árvores. Relatório 2019. Disponível em: < <https://iba.org/eng/datafiles/publicacoes/relatorios/iba-relatorioanual2019.pdf>>. Acesso em: Jun. 22 2021.

Jones, G. A. Seleção de isolados de *Metarhizium* spp. para o controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*: ensaios in vitro da virulência e conidiogênese. [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2017.

Lopes, R. S. da; Oliveira, L. G. da; Costa, A. F. da; Correia, M. T. S.; Lima, E. A. L. A.; Lima, V. L. M. Efeito dos extratos de *Agave sisalana* sobre espécies de *Cordyceps*. Revista de biologia e ciências da terra. 2021; 21(2): 22-32.

Lopes, R. B.; Souza, D. A.; Rocha, L. F. N.; Montalva, C.; Luz, C.; Humber, R. A.; Faria, M. *Metarhizium alvesi* sp. nov.: a new member of the *Metarhizium anisopliae* species complex. Journal of Invertebrate Pathology. 2018; 151: 165-168. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.12.001>.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: < <https://agricultura-br.com/>>. Acesso em: Jun. 10 2021.

Martins, C. C. Seleção e caracterização de isolados do fungo *Beauveria bassiana* visando o controle do ácaro branco *Polyphagotarsonemus latus* (Banks, 1904) (Acari: Tarsonemidae). [Dissertação de Mestrado]. Cascavel: Universidade Estadual do Oeste do Paraná; 2014.

Munsell, A. H. Munsell Soil Color Charts, Macbeth Division of Kollinorgen, Instruments Corporations, 2009.

Nozaki, M. H.; Camargo, M. E.; Barreto, M. Caracterização de *Diaporthe citri* em diferentes meios de cultura, condições de temperatura e luminosidade. Fitopatologia Brasileira. 2004; 29(4): 429-432.

Ortiz, A. G.; Filho, O. P.; Santos, A.; Souza, M. D.; Favares, L. G.; Nascimento, D. A. Resposta do forrageamento de *Acromyrmex rugosus* (Smith, 1858) e *Acromyrmex balzani* (Emery, 1890) (Hymenoptera: Formicidae) a mudas de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. com diferentes restrições nutricionais. Revista Espacios. 2017; 38(44).

Rodrigues, C. J. B.; FREITAS, M. C.; Perinotto, W. M.; Fiorotti, J. P.; Quinelato, S.; Camargo, M. G.; Angelo, I. C.; Bittencourt, V. R.E. P. Estudo morfológico de isolados de *Beauveria bassiana* antes e após reisolamento em *Rhipicephalus microplus*. Revista Brasileira de Medicina Veterinária. 2016; 38(3): 91-97.

Sene, L.; Alves, L. F. A.; Lobrigatte, M. F. P.; Thomazoni, D. Produção de conídios de *Metarhizium anisopliae* em meio sólido à base de resíduos agroindustriais. Arquivos do Instituto Biológico. 2010; 77(3): 449-456.

Valadares-Ingliš, M. C.; Lopes, R. B.; Faria, M. R. Controles de artópodes-praga com fungos entomopatogênicos. In: Fontes, E. M.G., Valadares-Ingliš, M. C (Ed), Brasília, DF: Embrapa, 2020. p. 201-236.

Zanuncio, J. C.; Lacerda, M. C.; Cruz, R. A.; Brugger, B. P.; Pereira, A. I. A.; Wilcken, C. F.; Serrão, J. E.; Sedyama, C. S. Glyphosate-based herbicides toxicity on life history parameters of zoophytophagous *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). Ecotoxicology and environmental safety. 2018; 147: 245-250. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.055>.

ARTIGO 2

3.2 PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS A OPERÁRIAS DE *Acromyrmex heyeri* (Forel, 1899) (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

Artigo submetido à Revista Floresta.

PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS A OPERÁRIAS DE *Acromyrmex heyeri* (FOREL, 1899) (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

Mateus Alves Saldanha, Ervandil Corrêa Costa, Aleksandra Cezimbra Quevedo, Leandra Pedron, Janaina Silva Sarzi, Marlove Fátima Brião Muniz

Resumo:

As formigas cortadeiras se destacam dentre os principais problemas fitossanitários que atingem cultivos agrícolas e plantios florestais. O controle químico é o método mais comumente utilizado para o manejo destes insetos-praga, sendo necessário o desenvolvimento de novas técnicas menos danosas ao meio ambiente. Assim, o objetivo do presente estudo foi verificar a ação de isolados de *Beauveria bassiana*, *Cordyceps fumosorosea* e *Metarhizium anisopliae* sobre a mortalidade de *Acromyrmex heyeri*, *in vitro*. Para tanto, foram utilizados sete isolados de fungos entomopatogênicos, sendo três isolados de *Beauveria bassiana* (IBCB 66, IBCB 170 e IBCB 632), um isolado de *Cordyceps fumosorosea* (IBCB 130) e três isolados de *Metarhizium anisopliae* (IBCB 348, IBCB 383 e IBCB 425), e cinco concentrações de esporos ($1,0 \times 10^4$; $1,0 \times 10^5$; $1,0 \times 10^6$; $1,0 \times 10^7$ e $1,0 \times 10^8$ esporos.mL⁻¹) para cada isolado fúngico. O tratamento controle consistiu da aplicação de água destilada autoclavada e Tween 40 0,01 %, sem a adição de patógenos fúngicos. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. A estimativa das concentrações letais de CL₅₀ e CL₉₀ foi realizada utilizando a análise de Probit. Observou-se que os isolados de *B. bassiana*, *C. fumosorosea* e *M. anisopliae* foram patogênicos às formigas cortadeiras com as cinco concentrações de esporos utilizadas, sendo que, com o aumento da concentração, obteve-se maior mortalidade dos espécimes. Dessa maneira, verificou-se que os fungos entomopatogênicos avaliados neste estudo mostraram-se eficientes como agentes de controle biológico de *Acromyrmex heyeri*.

Palavras-chave: *Beauveria bassiana*; controle biológico; *Cordyceps fumosorosea*; formigas cortadeiras; *Metarhizium anisopliae*.

PATHOGENICITY OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI ISOLATES TO WORKERS OF *ACROMYRMEX HEYERI* (FOREL, 1899) (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

Abstract:

Leaf-cutting ants stand out among the main phytosanitary problems that affect agricultural crops and forest plantations. Chemical control is the most commonly used method for the management of these insect pests, requiring the development of new techniques that are less harmful to the environment. So, the aim of the present study was to verify the action of isolates of *Beauveria bassiana*, *Cordyceps fumosorosea* and *Metarhizium anisopliae* on *in vitro* mortality of *Acromyrmex heyeri*. For this purpose, seven isolates of entomopathogenic fungi were used, being three isolates of *Beauveria bassiana* (IBCB 66, IBCB 170 and IBCB 632), one isolate of *Cordyceps fumosorosea* (IBCB 130) and three isolates of *Metarhizium anisopliae* (IBCB 348, IBCB 383 and IBCB 425), and five concentrations of spores (1.0×10^4 ; 1.0×10^5 ; 1.0×10^6 ; 1.0×10^7 and 1.0×10^8 spores.mL⁻¹) for each fungal isolate. The control treatment consisted of the application of autoclaved distilled water and 0.01% Tween 40, without the addition of fungal pathogens. The experiments were carried out in a completely randomized design with five replications. Estimation of lethal concentrations of LC₅₀ and LC₉₀ was performed using Probit analysis. It was observed that the isolates of *B. bassiana*, *C. fumosorosea* and *M. anisopliae* were pathogenic to leaf-cutting ants with the five concentrations of spores used, and with increasing concentration, there was a higher mortality of the specimens. Thus, it was found that the entomopathogenic fungi evaluated in this study proved to be efficient as agents for the biological control of *Acromyrmex heyeri*.

Key-words: *Beauveria bassiana*; biological control; *Cordyceps fumosorosea*; leaf-cutting ants; *Metarhizium anisopliae*

INTRODUÇÃO

As formigas pertencem à família Formicidae, com mais de 16 mil espécies válidas, 17 subfamílias, 39 tribos e 337 gêneros, sendo animais que estão presentes em todos os ambientes terrestres (Lucky et al., 2013; Bolton, 2020). Desempenham funções ecológicas importantes, interagindo formando cadeias alimentares complexas, sendo que qualquer modificação nesta estrutura pode reduzir a quantidade de espécies, a sua diversidade e o funcionamento de outros invertebrados (WAGG et al., 2014).

Consideradas um dos principais problemas fitossanitários em cultivos agrícolas e plantios florestais, as formigas cortadeiras são insetos pertencentes aos gêneros *Atta* (saúvas) e *Acromyrmex* (quenquéns), sua importância econômica é destacada pelo fato delas cortarem material vegetal fresco que serve de substrato para o fungo simbionte mutualista *Leucoagaricus gongylophorus* (Basidiomycota: Agaricales) (DELLA LUCIA; SOUZA, 2011), podendo promover prejuízos econômicos severos (NICKELE *et al.*, 2013; BACCARO *et al.*, 2015).

Formigas do gênero *Acromyrmex* (34 espécies) estão amplamente distribuídas na região neotropical e em todo o território brasileiro, apresentando forrageamento durante o ano todo, enquanto *Acromyrmex heyeri* (Forel, 1899), comumente nomeada de formiga-de-monte, é uma espécie de formiga cortadeira com distribuição restrita à América do Sul, sendo encontrada em pastagens e nas bordas de fragmentos florestais (BARRERA *et al.*, 2015; SARUBBI; RAMÍREZ, 2020).

O controle de insetos com organização social, com colônias apresentando sobreposição de gerações, cuidado parental e divisão de castas, associado com hábito de corte, se torna difícil, uma vez que não basta eliminar a operária que está forrageando (DELLA LUCIA *et al.*, 2014). Assim como formas de evitar que a ação das formigas cortadeiras causem perdas significativas, principalmente nas áreas agrícolas e cultivos florestais, comumente são empregados os métodos de controle químico, como o uso de iscas atrativas. Porém, tal fato é preocupante, já que o Brasil é apontado como maior consumidor de produtos químicos na agricultura, gerando resiliência de resíduos no solo e, consequentemente, a contaminação do ambiente (FAN *et al.*, 2018).

Atualmente, tem-se observado uma preocupação no desenvolvimento de pesquisas em métodos de controle que visem maior efetividade e menores impactos ambientais, sendo o consumo de produtos biológicos uma alternativa promissora, já que o mesmo ocorre naturalmente em qualquer ecossistema. Porém, deve-se considerar que o homem pode interferir, facilitando sua ação, através de um ou mais formas de manipulação dos organismos envolvidos (FONTES *et al.*, 2020). Desta forma, o uso de fungos entomopatogênicos pode ser uma alternativa viável para o controle biológico de formigas cortadeiras. Tendo em vista esses aspectos, o efetivo conhecimento sobre a dinâmica, desde a especificidade até a colonização fúngica numa população-alvo, relacionada à transmissão horizontal de propágulos fúngicos, irá contribuir para um controle mais efetivo da praga visada.

Diversos trabalhos evidenciam o efeito de microrganismos no controle biológico como *Metarhizium anisopliae* contra as formigas-de-fogo *Solenopsis invicta* (QIU *et al.*, 2019) e *Beauveria bassiana* contra formiga cortadeira (FOLGARAIT *et al.*, 2020). No entanto, várias etapas são necessárias até a obtenção de um produto, entre elas isolamento do organismo do ambiente, seleção de isolados eficientes no controle, otimização da produção de testes a campo e testes dos efeitos destes organismos no solo e demais organismos presentes no ambiente (UNFER *et al.*, 2019).

Porém, destaca-se que há produtos biológicos comercializados à base dos fungos entomopatogênicos mencionados, a exemplo, Boveril® à base de *Beauveria bassiana* (CEPA ESALQ PL63 - Registro no MAPA 4902) para controle de *Tetranychus urticae*, *Gonipterus scutellatus*, *Hypothenemus hampei* e *Bemisia tabaci*, e o Metarril®, à base de *Metarhizium anisopliae* (CEPA ESALQ E9 -Registro no MAPA 6605), para controle de *Mahanarva fimbriolata*, ambos os produtos são comercializados pela empresa Koppert Brasil (KOPPERT, 2020). No caso de *Cordyceps fumosorosea*, produtos comerciais à base deste fungo já são utilizados principalmente na América do Norte, México, Colômbia e Europa para o controle de mosca branca, pulgões e tripses (FARIA; WRAIGHT, 2007). No entanto estes microrganismos não são utilizados para o controle biológico de formigas cortadeiras.

Dessa forma, verifica-se que o controle biológico com o uso de fungos entomopatogênicos certamente é uma área promissora de pesquisa, mas atualmente está clara a necessidade de conhecimentos biológicos para que estratégias de controle de formigas cortadeiras possam ser de fato aplicadas. A perspectiva da real patogenicidade dos fungos entomopatogênicos contra as formigas cortadeiras, bem como o desenvolvimento de novas técnicas para a aplicação destes produtos biológicos podem contribuir para um controle mais efetivo, bem como reduzir os danos causados por formigas cortadeiras em cultivos agrícolas e florestais. Assim, o objetivo do presente estudo foi verificar a ação de isolados de *Beauveria bassiana*, *Cordyceps fumosorosea* e *Metarhizium anisopliae* sobre a mortalidade de *Acromyrmex heyeri*, *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Entomologia Florestal e no Laboratório de Fitopatologia “Dr^a Elocy Minussi”, pertencentes ao Departamento de Defesa Fitossanitária, Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria.

Coleta e identificação dos insetos alvos

O material foi coletado em uma área de pastagem, entre um cultivo jovem de acácia-negra e um plantio de eucalipto, pertencentes ao Centro Estadual de Diagnóstico e Pesquisa Florestal (Santa Maria, Rio Grande do Sul), no dia 23 de fevereiro de 2021. A área próxima ao ninho se encontrava em intensa atividade de

fornagem das formigas. Foram coletados espécimes de operárias de uma colônia. O material biológico foi obtido no horário das 14:00 as 15:00, período de intensa atividade de forrageamento das operárias (SANTOS *et al.*, 2020).

Os espécimes de formigas cortadeiras foram coletados com pinças e colocados em um recipiente esterilizado com tampa e encaminhadas para o Laboratório de Entomologia Florestal, pertencente ao Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria. Para o procedimento de identificação, alguns exemplares foram montados, e a partir da observação de caracteres morfológicos em microscópio espectroscópio, identificou-se o material biológico em nível de gênero. A identificação em nível de espécie confirmou-se com a Dr^a Ísis Caroline Siqueira dos Santos.

Procedência e manutenção dos isolados de fungos entomopatogênicos

Para este estudo, foram utilizados sete isolados de fungos entomopatogênicos, sendo três isolados de *Beauveria bassiana* (IBCB 66, IBCB 170 e IBCB 632), um isolado de *Cordyceps fumosorosea* (IBCB 130) e três isolados de *Metarhizium anisopliae* (IBCB 348, IBCB 383 e IBCB 425), os quais foram cedidos pelo Instituto Biológico de São Paulo, Coleção de Fungos Entomopatogênicos “Oldemar Cardin Abreu”.

Para a repicagem dos isolados de fungos entomopatogênicos foram utilizadas placas de Petri (90 mm), contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar), onde foi repicado no centro de cada placa uma pequena quantidade de micélio dos fungos. Após a inoculação, as placas foram mantidas em câmara climatizada do tipo B.O.D. a 25 ± 2 °C em regime de luz alternado com fotoperíodo de 12 horas, durante um período de dez dias para crescimento e esporulação dos fungos.

Preparo das suspensões de esporos

Decorridos os dez dias de crescimento micelial, nas placas de Petri contendo os isolados, foram preparadas suspensões com os esporos. Foram adicionados 10 mL de água destilada estéril na placa de Petri e, com o auxílio de alça de Drigalski foi realizada a raspagem do micélio fúngico na superfície do meio, sendo a suspensão filtrada em dupla camada de gaze para um béquer e adicionado espalhante adesivo a 0,01% (Tween 40) para realizar a contagem dos esporos em câmara de Neubauer. Após a contagem de esporos, a suspensão foi calibrada para as concentrações de: $1,0 \times 10^4$; $1,0 \times 10^5$; $1,0 \times 10^6$; $1,0 \times 10^7$ e $1,0 \times 10^8$ esporos.mL⁻¹, para cada isolado fúngico.

Teste de patogenicidade

Para cada isolado fúngico, foi realizado um experimento com 250 espécimes de formigas cortadeiras, correspondendo a cinco repetições de 10 formigas para cada tratamento (T1 = suspensão de $1,0 \times 10^4$ esporos.mL⁻¹; T2 = suspensão de $1,0 \times 10^5$ esporos.mL⁻¹; T3 = suspensão de $1,0 \times 10^6$ esporos.mL⁻¹; T4 = suspensão de $1,0 \times 10^7$ esporos.mL⁻¹; T5 = suspensão de $1,0 \times 10^8$ esporos.mL⁻¹). O tratamento controle foi feito utilizando-se apenas água destilada autoclavada e Tween 40 0,01 %, sem a adição de patógenos fúngicos.

As formigas foram transferidas individualmente para caixas do tipo *gerbox* (11 x 11 x 3,5 cm), previamente esterilizadas com álcool 70 %, contendo papel filtro com 1 mL das suspensões de esporos descritas anteriormente e bolas de algodão umedecidas com uma solução de mel a 10 %. As caixas foram mantidas à temperatura de 25 ± 2 °C e umidade relativa de 70 ± 10 %, sendo avaliadas a cada 24 horas durante dez dias.

A fim de confirmar se a mortalidade das formigas foi ocasionada pelos fungos estudados, as formigas mortas foram retiradas diariamente das caixas *gerbox* e armazenadas em câmara úmida à temperatura de 25 ± 2 °C e umidade relativa de 70 ± 10 %, por sete dias, para verificar a possível extrusão do patógeno fúngico.

Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias ao teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o software SISVAR versão 5.6.86 (FERREIRA, 2014), para a obtenção do percentual de controle dos isolados de fungos entomopatogênicos nas diferentes concentrações de esporos utilizadas.

Para avaliar a suscetibilidade de formigas cortadeiras aos diferentes isolados de fungos entomopatogênicos, os dados de concentração-mortalidade foram submetidos a um teste qui-quadrado (χ^2), a fim de verificar se os mesmos se ajustavam às suposições do modelo Probit. Em seguida, a partir de análise de Probit, foram estimadas as concentrações letais de CL₅₀ e CL₉₀ e os respectivos intervalos de confiança a 95 % (SAS INSTITUTE, 2002).

RESULTADOS

No início do bioensaio, as formigas mostravam-se agitadas, caminhando rapidamente em várias direções. Ao longo dos dias, começaram a exibir outros tipos de comportamentos, como, por exemplo, o ato de cortar os papéis filtro presentes nas placas.



Figura 1. Bioensaio com formigas cortadeiras da espécie *Acromyrmex heyeri*, com destaque para o comportamento exibido pelas formigas durante a realização do ensaio em laboratório.

Figure 1. Bioassay with leaf-cutting ants of the species *Acromyrmex heyeri*, highlighting the behavior exhibited by the ants during the test in the laboratory.

Observou-se que os isolados de *B. bassiana*, *C. fumosorosea* e *M. anisopliae* foram patogênicos às formigas cortadeiras com as cinco concentrações de esporos utilizadas ($1,0 \times 10^4$; $1,0 \times 10^5$; $1,0 \times 10^6$; $1,0 \times 10^7$ e $1,0 \times 10^8$ esporos.mL⁻¹). A confirmação da mortalidade dos espécimes de formigas cortadeiras pelos fungos entomopatogênicos foi a partir da observação da extrusão do patógeno nos cadáveres (FIGURA 2).



Figura 2. Extrusão de fungos entomopatogênicos em cadáveres de *Acromyrmex heyeri*. (A) *Beauveria bassiana*. (B) *Cordyceps fumosorosea*. (C) *Metharizium anisopliae*.

Figure 2. Extrusion of entomopathogenic fungi in corpses of *Acromyrmex heyeri*. (A) *Beauveria bassiana*. (B) *Cordyceps fumosorosea*. (C) *Metharizium anisopliae*.

A respeito dos isolados de *B. bassiana*, verificou-se que as maiores mortalidades de formigas cortadeiras ocorreram quando utilizadas concentrações mais elevadas de esporos dos fungos entomopatogênicos (Tabela 1). O isolado IBCB 632 apresentou mortalidade de 92 % quando submetido à concentração de $1,0 \times 10^8$ esporos.mL⁻¹, porém, não diferiu estatisticamente do valor encontrado ao se utilizar a concentração de 1×10^7 esporos.mL⁻¹ (78 %). Não houve diferença significativa ao se utilizar a concentração de 1×10^4 esporos.mL⁻¹ e o controle, com valores de 30 e 24 %, respectivamente.

Tabela 1. Percentual de controle (%) de espécimes de *Acromyrmex heyeri* por isolados de *Beauveria bassiana* em diferentes concentrações de esporos.

Table 1. Control percentage (%) of *Acromyrmex heyeri* specimens by *Beauveria bassiana* isolates at different spore concentrations.

Concentrações (esporos.mL ⁻¹)	Mortalidade (%)		
	IBCB 632	IBCB 170	IBCB 66

1 x 10 ⁴	30 c*	34 cd	36 cd
1 x 10 ⁵	46 bc	58 bc	50 bc
1 x 10 ⁶	64 ab	56 bc	68 b
1 x 10 ⁷	78 a	82 ab	74 ab
1 x 10 ⁸	92 a	90 a	100 a
Controle	24 c	24 d	24 d
M.G.	55,7	57,7	58,7
C.V.(%)	26,75	25,97	31,96

*Médias seguidas por mesma letra na linha não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. CV= Coeficiente de variação.

O isolado IBCB 170 apresentou percentual de controle de 90 % quando submetido à concentração de 1,0 x 10⁸ esporos.mL⁻¹, diferindo estatisticamente dos demais valores encontrados. Da mesma forma, o isolado IBCB 66 obteve, ao se utilizar a concentração máxima de esporos, 100 % de mortalidade dos espécimes.

Com relação aos isolados de *M. anisopliae*, os maiores percentuais de controle de espécimes de formigas cortadeiras ocorreram quando houve aumento na concentração de esporos de fungos entomopatogênicos, sendo que o isolado IBCB 387 apresentou a maior mortalidade (100 %) ao se utilizar a concentração de 1,0 x 10⁸ esporos.mL⁻¹ (Tabela 2).

Tabela 2. Percentual de controle (%) de espécimes de *Acromyrmex heyeri* por isolados de *Metarhizium anisopliae* em diferentes concentrações de esporos.

Table 2. Control percentage (%) of *Acromyrmex heyeri* specimens by *Metarhizium anisopliae* isolates at different spore concentrations.

Concentrações (esporos.mL ⁻¹)	Mortalidade (%)		
	IBCB 348	IBCB 425	IBCB 387
1 x 10 ⁴	28 cd*	36 c	26 d
1 x 10 ⁵	42 cb	62 bc	44 cd
1 x 10 ⁶	56 bc	56 bc	64 bc
1 x 10 ⁷	82 ab	80 ab	92 ab
1 x 10 ⁸	96 a	98 a	100 a
Controle	24 d	24 c	24 d
M.G.	54,7	59,4	58,4
C.V.(%)	26,4	34,95	25,14

*Médias seguidas por mesma letra na linha não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. CV= Coeficiente de variação.

Os isolados IBCB 348 e IBCB 425 apresentaram mortalidade de 96 e 98 %, respectivamente, para a concentração de 1,0 x 10⁸ esporos.mL⁻¹, diferindo estatisticamente das demais concentrações. Da mesma forma que os isolados de *B. bassiana*, não foram encontradas diferenças significativas entre a concentração de 1,0 x 10⁴ esporos.mL⁻¹ e o tratamento controle.

A respeito do isolado de *C. fumosorosea*, foi verificada que a maior mortalidade de formigas cortadeiras ocorreu quando utilizada a concentração de 1,0 x 10⁸ esporos.mL⁻¹, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. Da mesma forma que os isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, foi verificada diminuição na mortalidade dos espécimes quando utilizadas menores concentrações de esporos (Tabela 3).

Tabela 3. Percentual de controle (%) de espécimes de *Acromyrmex heyeri* por isolado de *Cordyceps fumosorosea* em diferentes concentrações de esporos.

Table 3. Control percentage (%) of *Acromyrmex heyeri* specimens by *Cordyceps fumosorosea* isolate at different spore concentrations.

Concentrações (esporos.mL ⁻¹)	Mortalidade (%)
1 x 10 ⁴	32 cd*
1 x 10 ⁵	50 cd
1 x 10 ⁶	58 bc
1 x 10 ⁷	88 ab
1 x 10 ⁸	100 a

Controle	24 d
M.G.	58,7
C.V. (%)	26,86

*Médias seguidas por mesma letra na linha não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. CV= Coeficiente de variação.

Pelas análises de Probit, foram estimadas as concentrações letais médias de mortalidade, ocorridas a partir das diferentes concentrações de esporos utilizadas. As concentrações necessárias para causar 50 % da mortalidade de operárias de *A. heyeri* após 10 dias de exposição aos isolados de fungos entomopatogênicos variaram entre $1,58 \times 10^5$ esporos.mL⁻¹ (isolado IBCB 170) e $6,94 \times 10^6$ esporos.mL⁻¹ (isolado IBCB 425). Já a respeito das concentrações necessárias para matar 90 % dos espécimes de formigas cortadeiras, os valores variaram entre $1,84 \times 10^6$ esporos.mL⁻¹ (isolado IBCB 130) e $1,10 \times 10^8$ esporos.mL⁻¹ (isolado IBCB 632) (Tabela 4).

Tabela 4. Concentração - letal (CL₅₀ e CL₉₀; esporos.mL⁻¹) de isolados de *Beauveria bassiana*, *Cordyceps fumosorosea* e *Metarhizium anisopliae* contra espécimes de *Acromyrmex heyeri*.

Table 4. Concentration - lethal (LC₅₀ and LC₉₀; spores.mL⁻¹) of *Beauveria bassiana*, *Cordyceps fumosorosea* and *Metarhizium anisopliae* isolates against *Acromyrmex heyeri* specimens.

Isolado	n	Inclinação ± EP	LC ₅₀ (95% IC)	LC ₉₀ (95% IC)	χ ²	df
IBCB 632	250	0.54 ± 0.21	4.71×10^5 ($2.53 \times 10^3 - 7.27 \times 10^6$)	1.10×10^8 ($6.85 \times 10^6 - 1.53 \times 10^9$)	6.43	3
IBCB 170	250	0.40 ± 0.14	1.58×10^5 ($1.74 \times 10^4 - 9.89 \times 10^5$)	9.01×10^7 ($2.57 \times 10^6 - 8.00 \times 10^8$)	7.77	3
IBCB 66	250	0.89 ± 0.25	1.92×10^6 ($3.21 \times 10^3 - 4.44 \times 10^7$)	5.22×10^7 ($1.99 \times 10^7 - 3.03 \times 10^8$)	2.60	3
IBCB 348	250	0.86 ± 0.22	1.60×10^6 ($1.00 \times 10^5 - 5.09 \times 10^6$)	4.98×10^7 ($1.84 \times 10^7 - 2.97 \times 10^8$)	9.69	3
IBCB 425	250	1.38 ± 0.52	6.94×10^6 ($2.31 \times 10^5 - 1.64 \times 10^7$)	2.39×10^7 ($4.25 \times 10^6 - 2.88 \times 10^8$)	7.31	3
IBCB 383	250	1.11 ± 0.27	7.42×10^5 ($9.46 \times 10^4 - 1.89 \times 10^6$)	1.06×10^7 ($4.72 \times 10^6 - 3.76 \times 10^7$)	9.23	3
IBCB 130	250	1.32 ± 0.50	1.95×10^6 ($1.53 \times 10^4 - 4.90 \times 10^6$)	1.84×10^6 ($8.35 \times 10^6 - 2.29 \times 10^8$)	6.88	3

Onde: LC₅₀: concentração de fungos entomopatogênicos (esporos.mL⁻¹) necessária para matar 50 % de formigas-cortadeiras em observação por um período de 10 dias. De forma similar, LC₉₀ é a concentração de fungos entomopatogênicos necessária para matar 90 % das formigas-cortadeiras testadas. $\chi^2 = P > 0.05$ no teste de ajuste de qualidade. df = Graus de liberdade.

DISCUSSÃO

O ato de cortar os papéis filtro presente nas caixas *gerbox*, pode estar relacionado à própria biologia das formigas cortadeiras, as quais, quando em seu ambiente natural, apresentam o hábito de cortar folhas para alimentar o fungo que cultivam (HAEDER *et al.*, 2009).

Observou-se que, nos tratamentos controle, não houve crescimento fúngico sobre os cadáveres das formigas cortadeiras, indicando que a mortalidade nesses grupos, não foi resultado da infecção pelos fungos, mas se deu, possivelmente, em decorrência do estresse provocado pelo isolamento social ou, até mesmo, devido à senescência das formigas.

Conforme pode ser observado na Tabela 1, ao se utilizar menores concentrações de esporos, verificou-se que houve redução na mortalidade dos espécimes de formigas cortadeiras. No tratamento controle a mortalidade não diferiu estatisticamente dos valores encontrados quando utilizada a concentração de $1,0 \times 10^4$ esporos.mL⁻¹. O mesmo pode ser observado por Santos *et al.* (2020), onde com o aumento crescente de esporos de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, foi verificada maior percentagem de infecção pelos fungos entomopatogênicos em espécimes de *A. heyeri*.

Todas as concentrações de esporos utilizadas neste trabalho foram capazes de assegurar a infecção e o progresso da doença nos espécimes de formigas cortadeiras. A concentração de esporos teve uma resposta linear positiva com a mortalidade, dado que uma maior concentração ocasionou maior mortalidade. Isso pode estar relacionado à quantidade de esporos viáveis que conseguem se posicionar na cutícula do inseto e que mais tarde irão germinar, desta forma, eles podem ter maior oportunidade de infectar o inseto (RAMÍREZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2019).

Pode-se destacar que, os fungos entomopatogênicos possuem grande espectro de ação, podendo colonizar diversas espécies, assim como ser utilizados como agentes no controle biológico de espécies de insetos potencialmente causadores de prejuízos econômicos. Estes microrganismos podem ser bioprospectados de

diversos ambientes, como o solo, assim como do próprio inseto que se deseja o controle (GOFFRÉ *et al.*, 2018; SCHAPOVALOFF *et al.*, 2015).

Os fungos dos gêneros *Beauveria* e *Metarhizium* estão entre os principais gêneros fúngicos que atuam como mecanismos reguladores de populações de insetos em diversos ecossistemas, sendo que, *B. bassiana* e *M. anisopliae* são consideradas duas espécies fúngicas amplamente atualizadas em estudos no controle de insetos praga em diversas culturas agrícolas e florestais (CASTILLO *et al.*, 2012; POTRICH *et al.*, 2009). Já o fungo *Cordyceps fumosorosea* se apresenta em fase inicial de estudos, sendo ainda inexistentes pesquisas visando o controle de formigas cortadeiras. Porém, considerando os resultados do presente estudo, sua utilização é promissora, tendo em vista que o mesmo ocasionou elevada mortalidade dos espécimes nas diferentes concentrações de esporos utilizadas, bem como, obteve o menor valor estimado de CL₉₀ (Tabela 4).

Novos estudos em laboratório e campo, envolvendo diferentes espécies e isolados, concentrações de esporos, castas de formigas e formas de aplicação, necessitam ser conduzidos para melhor aferir a eficiência dos fungos como agentes controladores desses insetos em condições de campo, viabilizando sua utilização em programas de manejo integrado de pragas.

CONCLUSÃO

Os isolados fúngicos de *B. bassiana*, *C. fumosorosea* e *M. anisopliae* proporcionaram controle de *A. heyeri* em níveis de 26 a 100%.

REFERÊNCIAS

BACCARO, F. B.; FEITOSA, R. M.; FERNÁNDEZ, F.; FERNANDES, I. O.; IZZO, T. J.; DE SOUZA, J. L. P.; SOLAR, R. R. C. **Guia Para Os Gêneros De Formigas Do Brasil**. Editora INPA, 2015, 338p.

BARRERA, C. A.; BUFFA, L. M.; VALLADARES, G. Do leaf-cutting ants benefit from forest fragmentation? Insights from community and species-specific responses in a fragmented dry forest. **Insect Conservation and Diversity**, v. 8, p.456 - 463, 2015.

BOLTON, B. **Formicidae**. 2020. Disponível em: <https://antcat.org/>. Acesso em: 01 dez 2021.

CASTILLO, C. E.; CAÑIZALEZ, L. M.; VALERA, R.; GODOY, J. C.; GUEDEZ, C.; OLIVAR, R.; MORILLO, S. Caracterización morfológica de *Beauveria bassiana*, aislada de diferentes insectos en Trujillo - Venezuela. **Revista Academia**, v. 11, n. 23, p. 275 - 281, 2012.

DELLA LUCIA, T.M.C.; SOUZA, D. J. Importância e história de vida das formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T.M.C. **Formigas-cortadeiras: da Bioecologia ao manejo**. Viçosa: MG, Ed. UFV, 2011, 421p.

DELLA LUCIA, T. M.; GANDRA, L. C.; GUEDES, R. N. Managing leaf-cutting ants: Peculiarities, trends and challenges: Managing leaf-cutting ants. **Pest Management Science**, v. 70, n. 1, p. 14 – 23, 2014.

FAN, J.; XIE, Y.; XUE, J.; LIU, R. The effect of *Beauveria brongniartii* and its secondary metabolites on the detoxification enzymes of the pine caterpillar, *Dendrolimus tabulaeformis*. **Journal of Insect Science**, v. 13, n. 44, p. 1 - 13, 2013.

FARIA, M. R.; WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, v. 43, p. 237 - 256, 2007.

FERREIRA, D. F. Sisvar: A Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 38, n. 2, p. 109 - 112, 2014.

FOLGARAIT, P. J.; GOFFRÉ, D.; OSORIO, A. G. *Beauveria bassiana* for the control of leaf cutter ants: strain and host differences. **Biocontrol Science and Technology**, v. 30, n. 9, p. 996 - 1005, 2020.

FONTES, E. M. G.; PIRES, C. S. S.; SUJI, E. R. **Estratégias de uso e histórico**. In: FONTES, E. M.G., VALADARES-INGLIS, M.C (eds). –Brasília, DF: Embrapa, 2020.

GOFFRÉ, D.; CAVALLO, E. C.; CAVALITTO, S. F.; P. J. FOLGARAIT. Selection and yield optimisation of a *Beauveria bassiana* isolate for the biological control of leaf cutter ants. **Biocontrol Science and Technology**, v. 28, n. 7, p. 672 - 687, 2018.

HAEDER, S.; WIRTH, R.; HERZ, H.; SPITELLER, D. Candicidin-producing *Streptomyces* support leaf-cutting ants to protect their fungus garden against the pathogenic fungus *Escovopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 12, p. 4742 - 4746, 2009.

KOPPERT. **Produtos e soluções**. 2020. Disponível em: <https://www.koppert.com.br/produtos-e-solucoes/>. Acesso em 06 dez 2020.

LUCKY, A.; TRAUTWEIN, M. D.; GUÉNARD, B. S.; WEISER, M. D.; DUNN, R. R. Tracing the Rise of Ants Out of the Ground. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e84012, 2013.

NICKELE, M. A.; PIE, M. R.; REIS FILHO, W.; PENTEADO, S. DO R. C. Formigas cultivadoras de fungos: Estado da arte e direcionamento para pesquisas futuras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 73, p. 53 – 72, 2013.

POTRICH, M.; ALVES, L. F. A.; HAAS, J.; SILVA, E. R. L.; DAROS, A.; PIETROWSKI, V.; NEVES, P. M. O. J. Seletividade de *Beauveria bassiana* e a *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 6, p. 822 - 826, 2009.

RAMÍREZ-SÁNCHEZ, C. J.; MORALES-FLORES, F. J.; ALATORRE-ROSAS, R.; MENA-COVARRUBIAS, J.; MÉNDEZ-GALLEGOS, S. J. Effectiveness of entomopathogenic fungi on the mortality of *Dactylopius opuntiae* (Hemiptera: Dactylopiidae) under laboratory conditions. **Revista Mexicana de Ciências Agrícolas**, n. 22, 2019.

SANTOS, I. C. S.; CASTRO, I. A. DE; PORTELA, V. O.; SIQUEIRA, E. L. S.; ANTONIOLLI, Z. I. Biocontrol of Ants of the *Acromyrmex* Genus with fungus entomopathogenic. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, p. e3089108494, 2020.

SARUBBI, H. J.; RAMÍREZ, M. B. Pest insects in natural and sown pastures of Paraguay. **Tropical Grasslands-Forrajés Tropicales**, v. 8, n. 2, p. 158 – 161. 2020.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide statistics**. Cary, 2002.

SCHAPOVALOFF, M. E.; ALVES, L. F. A.; URRUTIA, M. I.; LASTRA, C. C. L. Ocorrência natural de hongos entomopatógenos en suelos cultivados con yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) en Misiones, Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 47, n. 2, p. 138 - 142. 2015.

QIU, H.-L., FOX, E. G. P.; QIN, C. S.; ZHAO, D. Y.; YANG, H.; XU, J. I.Z. Microcapsuled entomopathogenic fungus against fire ants, *Solenopsis invicta*. **Biological Control**, v. 134, p. 141 - 149, 2019.

UNFER, R. K.; PORTELA, V. O.; SANTANA, N. A.; MORO, L.; SANTOS, Í. C. S.; CASTRO, I. A. D., FREIBERG, J. A.; JACQUES, R. J. S. Métodos de preservação de fungos em laboratório. In C. A. D. SANTOS (Org.), **Grandes Temas Em Agronomia**. Uniedusul Editora. 2019.

WAGG, C.; BENDER, S. F.; WIDMER, F.; VAN DER HEIJDEN, M. G. A. Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 14, p. 5266 – 5270. 2014.

ARTIGO 3:**3.3 COMPATIBILIDADE DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS COM O INSETICIDA FIPRONIL PARA O CONTROLE DE FORMIGAS CORTADEIRAS**

Artigo submetido à Revista Brasileira de Ciências Agrárias.

Compatibilidade de fungos entomopatogênicos com o inseticida Fipronil para o controle de formigas cortadeiras

Mateus Alves Saldanha, Ervandil Corrêa Costa, Marlove Fátima Brião Muniz, Alexsandra Cezimbra Quevedo

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do inseticida Fipronil sobre o crescimento vegetativo e a esporulação de isolados de fungos entomopatogênicos, *in vitro*, classificando o mesmo quanto a sua toxicidade sobre os isolados. Para tanto, foram utilizados sete isolados, sendo três de *B. bassiana*, um de *C. fumosorosea* e três de *M. anisopliae*, e quatro concentrações de Fipronil (0,2, 0,4, 0,6 e 0,8 g/L), adicionadas em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar). Após 15 dias, efetuou-se a mensuração do diâmetro das colônias e a contagem dos esporos. Ao se utilizar a concentração de 0,8 g/L, verificou-se redução no crescimento vegetativo dos isolados. Para os isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae*, houve diminuição na produção de esporos quando adicionadas concentrações superiores a 0,4 g/L de inseticida; para *C. fumosorosea*, essa diminuição ocorreu quando adicionadas concentrações superiores a 0,6 g/L. O inseticida Fipronil foi classificado como “compatível” quanto à toxicidade *in vitro* sobre os isolados e com isso, confirmou-se a possibilidade do uso consorciado do inseticida Fipronil com os isolados de fungos entomopatogênicos testados para o controle de formigas cortadeiras.

Palavras-chave: *Beauveria bassiana*; controle biológico; *Cordyceps fumosorosea*; insetos-praga; *Metarhizium anisopliae*

Compatibility of entomopathogenic fungi with the insecticide Fipronil for leaf-cutting ant control**Abstract**

The aim of the present study was to evaluate the effect of the insecticide Fipronil on the vegetative growth and sporulation of entomopathogenic fungi isolates, *in vitro*, classifying it in terms of its toxicity on the isolates. For this purpose, seven isolates were used, three of *B. bassiana*, one of *C. fumosorosea* and three of *M. anisopliae*, and four concentrations of

Fipronil (0.2, 0.4, 0.6 and 0.8 g/ L), added to PDA culture medium (potato-dextrose-agar). After 15 days, the colony diameter and spore count were measured. When using the concentration of 0.8 g/L, there was a reduction in the vegetative growth of the isolates. For the isolates of *B. bassiana* and *M. anisopliae*, there was a decrease in spore production when concentrations above 0.4 g/L of insecticide were added; for *C. fumosorosea*, this decrease occurred when concentrations above 0.6 g/L were added. The insecticide Fipronil was classified as "compatible" in terms of in vitro toxicity on the isolates, and with this, the possibility of using the insecticide Fipronil together with the isolates of entomopathogenic fungi tested for the control of leaf-cutting ants was confirmed.

Keywords: *Beauveria bassiana*; biological control; *Cordyceps fumosorosea*; pest insects; *Metarhizium anisopliae*

INTRODUÇÃO

No Brasil, o setor de florestas plantadas tem sido um importante indicador de desenvolvimento econômico, social e ambiental. Em 2019, a área total de árvores plantadas totalizou 9,0 milhões de hectares, um crescimento de 2,4% em relação a 2018 (8,79 milhões de hectares). Desse total, a maioria (77%) é representada pelo cultivo de eucalipto, com 6,97 milhões de hectares, e 18% de pinus, com 1,64 milhão de hectares (IBÁ, 2020). Com o aumento de áreas com plantios destas espécies, tem-se o incentivo de mudanças econômicas locais, oferecendo novas oportunidades de trabalho e gerando renda para a população, bem como contribuição com a adaptação e mitigação das mudanças climáticas e na provisão de serviços ecossistêmicos (IBÁ, 2020).

No entanto, com o crescimento gradativo de áreas com plantios homogêneos, houve também um acréscimo significativo nos problemas fitossanitários, especialmente com insetos (Machado & Costa, 2017). Dentre os principais insetos-praga, merecem destaque as formigas-cortadeiras, visto que provocam danos aos cultivos ao cortarem material vegetal, em sua maioria folhas, e utilizá-lo como substrato para o cultivo de um fungo simbiote, o qual constitui o principal alimento das formigas (Bezerra, 2018). O controle de formigas cortadeiras tem sido realizado por meio da utilização de inseticidas químicos, sendo os à base de Fipronil mais comumente utilizados (Ortiz et al., 2017).

O Fipronil é um inseticida do grupo químico fenil pirazol (Britto et al., 2016). É um composto aromático, sendo sua classificação toxicológica de Classe II e tem uso agrícola com aplicação de solo, foliar, semente, muda e água de irrigação, dependendo da cultura (ANVISA, 2019). Atua no sistema nervoso central dos insetos, mais especificamente nos receptores do ácido gama aminobutírico (GABA) associados a canais de cloreto, bloqueando

a passagem de íons cloreto, eliminando, desse modo, a inibição normal dos impulsos nervosos, provocando um aumento da atividade neural e, por conseguinte, a paralisia e a morte do organismo (Chaguri, 2016).

O método de controle químico tem apresentado problemas significativos, em virtude da contaminação ambiental, baixa especificidade, possibilidade de ressurgência da praga, seleção de insetos resistentes e dos riscos potenciais a saúde humana e animal (Barbosa et al., 2015). Dessa forma, há necessidade de pesquisas por medidas alternativas de controle que impactem menos o ambiente, como a utilização do controle biológico (Pessoa et al., 2020b). Nesse sentido, os fungos entomopatogênicos são empregados como uma alternativa viável para o manejo de pragas florestais (Wilcken, 2016).

Testes de compatibilidade *in vitro* de inseticidas com fungos entomopatogênicos descrevem os possíveis efeitos negativos ou positivos que podem ocorrer quando são aplicados em associação com outros produtos, especialmente nos casos em que é realizada a mistura, visto que os produtos fitossanitários químicos também podem atuar de forma deletéria sobre esses microrganismos, inibindo o crescimento vegetativo, a conidiogênese e a esporulação, podendo até causar mutações genéticas, as quais podem levar a redução da patogenicidade e virulência (Alves & Lopes, 2008; Barbosa Júnior, 2020). Os resultados dos testes de compatibilidade *in vitro* podem ser base para o desenvolvimento de estratégias de Manejo Integrado de Pragas (MIP), podendo-se associar o uso de fungos entomopatogênicos e inseticidas para o controle de insetos-praga (Fiedler & Sosnowska, 2017).

Pesquisas com o objetivo de verificar o sinergismo de fungos entomopatogênicos e inseticidas no controle de insetos-praga têm sido desenvolvidas e apresentado resultados promissores da associação destes dois métodos de controle (Ashraf et al., 2017; Shewale & Mohite, 2018). Desta forma, verifica-se a possibilidade da utilização consorciada de agentes de controle biológico e inseticidas para o manejo de insetos-praga (Pessoa et al., 2020b). Essa associação é capaz de auxiliar na redução da população e incidência das pragas, otimizando então o seu potencial como agentes de controle, devido à presença de substâncias contidas nos produtos fitossanitários químicos que atuam como estressantes, favorecendo então a infecção de fungos que realizam o controle biológico de pragas (Wilcken et al., 2010).

Permitir a ação de agentes de controle biológico, de maneira natural ou aplicada, é de grande importância para o MIP (Pessoa et al., 2020a). Esses agentes são ferramentas importantes, utilizados como alternativa para reduzir os vários problemas causados pelo uso

indiscriminado de inseticidas (Lopes et al., 2018). Visando uma alternativa para o controle de formigas-cortadeiras, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do inseticida Fipronil sobre o crescimento vegetativo e a esporulação de isolados de *Beauveria bassiana*, *Cordyceps fumosorosea* e *Metarhizium anisopliae*, *in vitro*, classificando-o quanto a sua toxicidade sobre os fungos entomopatogênicos.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Fitopatologia “Dr^a Elocy Minussi”, pertencente ao Departamento de Defesa Fitossanitária, Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul.

Preparo e manutenção dos fungos entomopatogênicos utilizados

Foram utilizados sete isolados de fungos entomopatogênicos, sendo três isolados de *Beauveria bassiana* (IBCB 66, IBCB 170 e IBCB 632), um isolado de *Cordyceps fumosorosea* (IBCB 130) e três isolados de *Metarhizium anisopliae* (IBCB 348, IBSP 383 e IBCB 425), os quais foram cedidos pelo Instituto Biológico de São Paulo, Coleção de fungos Entomopatogênicos “Oldemar Cardin Abreu”.

Para a repicagem dos isolados de fungos entomopatogênicos foram utilizadas placas de Petri esterilizadas, contendo meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar), onde foi repicado no centro de cada placa uma pequena quantidade de micélio do fungo. Após a inoculação, as placas foram mantidas em câmara climatizada do tipo B.O.D a 25 ± 2 °C em regime de luz alternado com fotoperíodo de 12 h, por um período de sete dias para crescimento e esporulação dos fungos.

Decorridos os sete dias de crescimento micelial nas placas de Petri contendo os isolados, procedeu-se a preparação das suspensões de esporos. Foram adicionados 10 mL de água destilada estéril na placa de Petri e, com o auxílio de alça de Drigalski foi realizada a raspagem do micélio fúngico na superfície do meio, sendo a suspensão filtrada em dupla camada de gaze para um béquer e adicionado espalhante adesivo a 0,01% (Tween 40) para realizar a contagem dos esporos em câmara de Neubauer. Após a contagem de esporos a suspensão foi calibrada para uma concentração de 1×10^6 esporos por mL.

Cultivo dos fungos entomopatogênicos em meio de cultura contendo Fipronil

O meio de cultura BDA foi preparado e autoclavado a 121 °C durante 20 minutos, aproximadamente. Após esfriar por alguns minutos em temperatura ambiente, foi adicionado

o antibiótico penicilina ao meio. Em seguida, foram adicionadas quatro diferentes concentrações de inseticida à base de Fipronil (0,01% pp) (0,2, 0,4, 0,6 e 0,8 g/L), sendo este previamente filtrado utilizando-se filtros de 0,22 µm de diâmetro com o intuito de remover contaminantes. Os controles negativos foram feitos cultivando-se os isolados em meio BDA contendo apenas penicilina, sem o inseticida. Os frascos contendo o meio BDA, penicilina e o inseticida, foram agitados manualmente durante um minuto para homogeneização desses componentes e, depois, vertido em placas de Petri estéreis.

Com auxílio de um pipetador, foi transferido 10 µL da suspensão de esporos (1×10^6 esporos por mL) preparadas previamente, no centro de cada placa de Petri. Posteriormente, as placas foram incubadas em câmaras do tipo B.O.D. em regime de temperatura e luz controlados (25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h), por um período de 15 dias.

Avaliação do crescimento micelial e esporulação dos fungos entomopatogênicos

Transcorridos os 15 dias de incubação, realizou-se a avaliação do crescimento micelial e esporulação dos isolados de fungos entomopatogênicos. O crescimento micelial de cada isolado nas diferentes concentrações do inseticida Fipronil foi mensurado com auxílio de paquímetro digital, em dois sentidos diametralmente opostos da colônia, para a obtenção das médias dos valores de crescimento micelial.

Para a avaliação da esporulação dos isolados, foram adicionados 10 mL de água destilada esterilizada em cada placa de Petri, sendo, em seguida, realizada a raspagem da colônia com auxílio de alça de Drigalski para a liberação dos esporos. A suspensão foi pipetada e filtrada em dupla camada de gaze para retenção dos fragmentos miceliais e meio de cultura. A contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio óptico, com aumento de 40 vezes.

Classificação do inseticida Fipronil quanto à toxicidade sobre diferentes isolados de fungos entomopatogênicos

Para a classificação do inseticida quanto a toxicidade sobre os isolados de *B. bassiana*, *C. fumosorosea* e *M. anisopliae*, *in vitro*, foi utilizado o modelo proposto por Alves et al. (1998), pelo qual são calculados os valores percentuais com relação a testemunha (100%), conforme a equação a seguir: $T = 20(CV) + 80(ESP)/100$, onde T = valor corrigido do crescimento vegetativo e esporulação para classificação do produto, CV = porcentagem de crescimento vegetativo com relação ao controle, e ESP = porcentagem de esporulação com relação ao controle.

A partir dos valores de “T”, o inseticida foi classificado como *muito tóxico* (0 a 30), *tóxico* (31 a 45), *moderadamente tóxico* (46 a 60) ou *compatível* (> 60) (Alves et al., 1998).

Análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Para os isolados de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* foram utilizados um bifatorial, composto de dois fatores: quatro concentrações x três isolados. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias ao teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o software SISVAR versão 5.6.86 (Ferreira, 2014).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir do ensaio *in vitro*, observou-se que, em relação aos isolados de *B. bassiana* tratados com Fipronil, houve redução no crescimento vegetativo dos mesmos em todas as concentrações analisadas, em comparação às respectivas testemunhas (Tabela 1).

Tabela 1. Crescimento micelial (mm) de isolados de *Beauveria bassiana* em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), tratados com diferentes concentrações (g/L) do inseticida Fipronil, aos 15 dias de incubação.

Isolado	Concentrações				
	Controle	0,2 g/L	0,4 g/L	0,6 g/L	0,8 g/L
IBCB 66	54,14 a*	44,67 b	42,99 b	44,32 b	42,30 b
IBCB 170	52,80 a	48,48 ab	46,21 b	43,13 c	42,37 c
IBCB 632	52,94 a	46,94 b	44,85 bc	43,55 bc	41,82 c
Média geral	46,09				
CV (%)	5,31				

*Médias seguidas por mesma letra na linha não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. CV= Coeficiente de variação.

Não houve diferença significativa entre os isolados. Com relação ao crescimento micelial do isolado IBCB 66, a maior redução se deu na concentração de 0,8 g/L; este valor, quando comparado à respectiva testemunha, teve redução no crescimento de 21,87%. O mesmo ocorreu com os isolados IBCB 170 e IBCB 632, onde houve maior redução do crescimento micelial na concentração de 0,8 g/L, tendo redução de 19,75 e 21%, respectivamente.

Avaliando o efeito do inseticida Fipronil sobre o crescimento vegetativo e a esporulação de diferentes isolados de fungos entomopatogênicos, Bezerra (2018) verificou

que os isolados tratados com inseticida na concentração de 0,8 g/L apresentaram uma redução no crescimento vegetativo em comparação às respectivas testemunhas, sendo que o isolado de *B. bassiana* apresentou a maior redução do crescimento vegetativo entre todos os isolados de fungos entomopatogênicos testados, cerca de $80,9 \pm 0,98\%$. Este valor foi superior ao encontrado no presente estudo, que para essa mesma concentração de Fipronil, foi obtida uma redução média de crescimento vegetativo de 20,88%.

O ensaio *in vitro* revelou que houve redução na produção de conídios dos isolados de *B. bassiana*. A maior redução na esporulação ocorreu na concentração de 0,8 g/L de Fipronil, apresentando uma redução de 28,18, 32,81 e 33,58%, respectivamente, para os isolados IBCB 66, IBCB 170 e IBCB 632 (Tabela 2). As concentrações de 0,2, 0,4 e 0,8 g/L, não ocasionaram diferenças significativas em relação a esporulação dos isolados. Já observando os valores da concentração de 0,6 g/L, verificou-se que houve diferença significativa em relação a esporulação entre os isolados, sendo que a maior esporulação ocorreu no isolado IBCB 170 e a menor, no isolado IBCB 632.

Tabela 2. Esporulação ($\times 10^6$ mL⁻¹) de isolados de *Beuaveria bassiana* em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), tratados com diferentes concentrações (g/L) do inseticida Fipronil, aos 15 dias de incubação.

Isolado	Concentrações				
	Controle	0,2 g/L	0,4 g/L	0,6 g/L	0,8 g/L
IBCB 66	6,21 Aa*	5,02 Aa	4,35 Ba	4,35 Bab	4,46 Ba
IBCB 170	6,43 Aa	5,26 Aa	4,75 Ba	4,66 Ba	4,32 Ba
IBCB 632	5,33 Aa	4,35 Ab	3,96 ABa	3,42 Bb	3,54 Ba
Média geral	4,67				
CV (%)	14,78				

*Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. CV= Coeficiente de variação.

Corroborando com os resultados do presente estudo, Fregonesi et al. (2016), analisando a toxicidade de agroquímicos em isolados de *B. bassiana*, observaram, aos 15 dias de incubação, quando incorporado o ingrediente ativo Fipronil ao meio de cultura BDA, valores médios de crescimento micelial variando entre 44,25 e 50,75 mm, e esporulação variando entre $1,40 \times 10^9$ e $4,97 \times 10^9$ esporos/mL. Tais valores se assemelham aos resultados obtidos na presente pesquisa, onde a média geral de crescimento micelial de *B. bassiana* foi de 46,09 mm, e esporulação média foi de $4,67 \times 10^6$ mL⁻¹.

O crescimento micelial de *M. anisopliae* quando submetido a diferentes concentrações de Fipronil podem ser observados na Tabela 3. Analisando os resultados obtidos pelo isolado IBCB 348, percebeu-se que a maior redução no crescimento micelial se deu quando o mesmo foi submetido a concentração de 0,8 g/L do inseticida, tendo uma redução de 15,98 % em relação ao respectivo controle.

Tabela 3. Crescimento micelial (mm) de isolados de *Metarhizium anisopliae* em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), tratados com diferentes concentrações (g/L) do inseticida Fipronil, aos 15 dias de incubação.

Isolado	Concentrações				
	Controle	0,2 g/L	0,4 g/L	0,6 g/L	0,8 g/L
IBCB 348	55,48 a*	49,71 ab	48,56 b	49,10 b	46,61 b
IBCB 383	54,67 a	48,85 ab	48,53 ab	44,56 b	45,02 b
IBCB 425	50,24 ab	54,03 a	52,42 ab	46,70 b	46,45 b
Média geral	49,39				
CV (%)	6,35				

*Médias seguidas por mesma letra na linha não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. CV= Coeficiente de variação.

Observando os resultados de crescimento micelial do isolado IBCB 383, verificou-se que a maior redução no crescimento foi quando o mesmo foi exposto a concentração de 0,6 g/L, o que representou uma redução de 18,49% quando comparado ao respectivo controle, porém, foi observado que não houve diferença significativa quando comparado com a média de crescimento micelial na concentração de 0,8 g/L. Diferindo dos demais isolados de *M. anisopliae*, o IBCB 425 apresentou maior crescimento micelial quando exposto a concentração de 0,2 g/L, porém, não diferiu estatisticamente ao ser comparado com o respectivo controle e quando exposto a concentração de 0,4 g/L. Assim como os isolados de *B. bassiana*, verificou-se que não houveram diferenças significativas entre os tratamentos utilizados e os isolados (Tabela 3).

A esporulação foi reduzida em comparação aos respectivos controles para alguns isolados de *M. anisopliae* submetidos às concentrações do inseticida Fipronil (Tabela 4). O isolado IBCB 348 não apresentou diferenças significativas entre as concentrações de Fipronil utilizadas. Para este mesmo isolado, verificou-se que a concentração de 0,4 g/L apresentou a menor produção de esporos, representando uma redução de 22,61% quando comparada com o respectivo controle.

Tabela 4. Esporulação ($\times 10^6$. mL⁻¹) de isolados de *Metarhizium anisopliae* em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), tratados com diferentes concentrações (g/L) do inseticida Fipronil, aos 15 dias de incubação.

Isolado	Concentrações				
	Controle	0,2 g/L	0,4 g/L	0,6 g/L	0,8 g/L
IBCB 348	7,12 Aa*	5,77 Aa	5,51 Aa	6,11 Aa	5,84 Aa
IBCB 383	5,63 Aa	6,29 Aa	4,52 ABa	5,19 Aa	3,32 Bb
IBCB 425	6,43 Aa	5,65 Aa	5,00 Aa	5,76 Aa	3,63 Bb
Média geral	5,38				
CV (%)	16,79				

*Médias seguidas por mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. CV= Coeficiente de variação.

Em relação ao isolado IBCB 383, a maior produção de conídios se deu na concentração de 0,2 g/L, não diferindo do tratamento controle. Em contrapartida, a maior redução na produção de conídios se deu quando o isolado foi submetido à 0,8 g/L, o que representou uma redução de 41,03% quando comparado ao respectivo controle. Já o isolado IBCB 425, a concentração de 0,8 g/L apresentou a menor produção de conídios, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos, e apresentando uma redução de 56,45% quando comparada ao respectivo controle. Verificou-se que houve diferenças significativas na concentração de 0,8 g/L, visto que o isolado IBCB 348 apresentou a maior produção de esporos, diferindo estatisticamente dos isolados IBCB 383 e IBCB 425. Para os demais tratamentos (0,2, 0,4 e 0,6 g/L, e controle) não foram encontradas diferenças significativas entre os mesmos e os isolados.

Nesse sentido, Bezerra (2018) verificou que o isolado de *M. anisopliae* (URM 4920), tratado com inseticida Fipronil na concentração de 0,8 g/L não apresentou uma redução na produção de conídios quando comparado a testemunha. Tal variação pode estar relacionada ao fato que se tratam de isolados diferentes, que tendem a apresentar desenvolvimentos distintos, mesmo quando submetidos a condições semelhantes de ambiente.

Para *C. fumosorosea* (IBCB 130), houve redução no crescimento micelial com o aumento da concentração do inseticida Fipronil (Tabela 5). A menor média de crescimento micelial foi obtida quando o isolado foi submetido a concentração de 0,8 g/L, o que representou uma redução de 18,24% quando comparado ao controle.

Tabela 5. Crescimento micelial (mm) e esporulação ($\times 10^6$. mL⁻¹) de isolados de *Cordyceps fumosorosea* em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), tratados com diferentes concentrações (g/L) do inseticida Fipronil, aos 15 dias de incubação.

Concentração	Crescimento micelial (mm)	Esporulação ($\times 10^6$. mL ⁻¹)
Controle	58,88 a*	6,24 a
0,2 g/L	53,05 a	5,47 ab
0,4 g/L	49,59 a	5,03 b
0,6 g/L	48,86 b	4,75 bc
0,8 g/L	48,14 b	3,69 c
Média geral	51,71	5,04 $\times 10^6$
CV (%)	4,40	11,98

*Médias seguidas por mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. CV= Coeficiente de variação.

Em relação à esporulação, verificou-se que houve diferenças entre os tratamentos, sendo que a menor produção de esporos ocorreu a 0,8 g/L, o que representou uma redução de 40,86% quando comparada ao respectivo controle (Tabela 5). Conforme observado por Rojas (2015), no Brasil não existem produtos registrados à base de *C. fumosorosea* e poucos estudos foram realizados com esta espécie de fungo entomopatogênico. Porém, os resultados deste estudo demonstram perspectiva de compatibilidade *C. fumosorosea* e o inseticida Fipronil, levando em consideração as concentrações a serem utilizadas, de modo que não venham a interferir significativamente no desenvolvimento do isolado fúngico, e conseqüentemente, em sua ação patogênica sobre os insetos.

Os sete isolados de fungos entomopatogênicos tratados com Fipronil, na concentração de 0,8 g/L, apresentaram redução no crescimento vegetativo. Uma possível explicação para estes resultados é citada por Oliveira et al. (2002). Esses autores sugerem que a metabolização do meio contendo a formulação pelos fungos, pode gerar resíduos tóxicos que, ao se acumularem, podem bloquear vias de compostos importantes para o crescimento fúngico.

Os resultados de crescimento micelial e esporulação dos isolados de *B. bassiana* (IBCB 66, IBCB 170 e IBCB 632) e *M. anisopliae* (IBCB 348, IBCB 383 e IBCB 425), verifica-se uma variabilidade nos valores encontrados, quando comparados isolados da mesma espécie. Tal variabilidade pode estar relacionada ao fato de que a toxicidade dos produtos químicos sobre fungos entomopatogênicos varia em virtude da espécie ou da linhagem fúngica, bem como da natureza química do ingrediente ativo, do modo de ação ou formulação do produto (Silva et al., 2013).

A partir dos resultados obtidos, em relação ao crescimento vegetativo e à esporulação, o inseticida Fipronil foi classificado quanto a sua toxicidade *in vitro* sobre cada um dos isolados de fungos entomopatogênicos nas diferentes concentrações utilizadas (Tabela 6).

Tabela 6. Valores calculados do índice "T" e classificação do inseticida Fipronil, em diferentes concentrações, quanto à toxicidade *in vitro* sobre isolados de *Beauveria bassiana* (IBCB 66, IBCB 170, IBCB 632), *Cordyceps fumosorosea* (IBCB 130) e *Metarhizium anisopliae* (IBCB 348, IBCB 383, IBCB 425).

Isolados	Concentração (g/L)	Valores de "T"	Classificação*
IBCB 66	0,2	81	Compatível
	0,4	75	Compatível
	0,6	72	Compatível
	0,8	73	Compatível
IBCB 170	0,2	83	Compatível
	0,4	76	Compatível
	0,6	74	Compatível
	0,8	69	Compatível
IBCB 632	0,2	84	Compatível
	0,4	77	Compatível
	0,6	69	Compatível
	0,8	68	Compatível
IBCB 130	0,2	125	Compatível
	0,4	82	Compatível
	0,6	78	Compatível
	0,8	64	Compatível
IBCB 348	0,2	83	Compatível
	0,4	80	Compatível
	0,6	86	Compatível
	0,8	82	Compatível
IBCB 383	0,2	107	Compatível
	0,4	82	Compatível
	0,6	90	Compatível
	0,8	64	Compatível

IBCB 425	0,2	92	Compatível
	0,4	83	Compatível
	0,6	90	Compatível
	0,8	64	Compatível

*Classificação em conformidade com Alves et al., 1998.

Esses resultados corroboram com outros estudos como Fregonesi et al. (2016), que classificou inseticida à base de Fipronil como compatível em isolados de *B. bassiana*, afirmando que o mesmo pode ser utilizado em associação; e Bezerra (2018), que encontrou valores do fator *T* semelhantes para *B. bassiana* e *M. anisopliae*, classificando o inseticida Fipronil como compatível para os isolados de fungos entomopatogênicos.

Inserido nessa discussão, Pessoa et al. (2020b) comentam que o fungo, numa atividade comparável ao que ocorre com seres vivos em geral, faz uso de todo o seu esforço reprodutivo quando em presença de um princípio tóxico que altera seu ambiente, e prejudica o seu desenvolvimento, resultando assim, em maior crescimento vegetativo e conidiogênese. Ainda, Alves & Lopes (2008) afirmam que o microrganismo, num mecanismo de resistência fisiológica, pode metabolizar os princípios tóxicos do ingrediente ativo, utilizando as moléculas resultantes desse processo, liberadas no meio de cultura, como nutrientes secundários, promovendo seu crescimento vegetativo e a conidiogênese. Estas informações justificam o fato de que no presente estudo, apesar de ser observado um decréscimo na esporulação de alguns isolados tratados com Fipronil em comparação as respectivas testemunhas, esses valores não se mostraram estatisticamente significativos.

Na metodologia proposta por Alves et al. (1998), os produtos químicos são adicionados em concentrações pré-estabelecidas ao meio de cultura fundido, ou seja, ainda não solidificado e a fórmula para a classificação dos mesmos quanto à toxicidade *in vitro* sobre fungos entomopatogênicos, baseia-se no cálculo do fator *T*. Os valores elevados do fator “*T*” (> 60 = compatível) encontrados no presente estudo, foram determinados pelo bom desempenho na produção de conídios, considerando-se que a fórmula proposta por Alves et al. (1998), atribui 80% de participação para esse parâmetro na composição final do valor.

Os estudos *in vitro* têm a vantagem de expor ao máximo o microrganismo à ação do produto químico, fato que não ocorre em condições de campo, onde vários fatores servem de obstáculo a essa exposição. Assim, constatada a inocuidade de um produto em laboratório, espera-se que o mesmo seja compatível em campo (Oliveira et al., 2018). Por outro lado, a

alta toxicidade de um produto *in vitro* nem sempre indica a sua elevada toxidez em campo, mas sim a possibilidade da ocorrência de danos dessa natureza (Moino Junior & Alves, 1998).

No contexto do MIP todas as táticas de controle são utilizadas e a estratégia de aplicação de fungos entomopatogênicos associado a inseticida, deve-se dar prioridade ao uso dos produtos que apresentam compatibilidade, levando em consideração que estes entomopatógenos podem adaptar-se ao ambiente, apresentando posteriormente ação de enzootia e epizootia contribuindo para o controle biológico natural (Costa et al., 2018). São escassos na literatura estudos referentes ao efeito do inseticida Fipronil sobre fungos entomopatogênicos, principalmente ao se tratar das espécies de *Beauveria bassiana*, *Cordyceps fumosorosea* e *Metarhizium anisopliae*. Dessa maneira, outras pesquisas visando verificar a compatibilidade entre este inseticida e fungos entomopatogênicos se fazem necessárias, tendo em vista um manejo mais adequado do controle de formigas-cortadeiras, considerando a biologia dos organismos envolvidos, sendo mais eficazes e menos danosas ao meio ambiente.

CONCLUSÕES

O crescimento vegetativo e a esporulação dos isolados de fungos entomopatogênicos estudados é reduzido com a utilização concentrações entre 0,4 e 0,8 g/L do inseticida Fipronil.

O inseticida Fipronil é classificado como “compatível” quanto à toxicidade *in vitro* sobre os isolados dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana*, *C. fumosorosea* e *M. anisopliae* estudados.

REFERÊNCIAS

- Alves, S. B.; Moino Jr., A.; Almeida, J. E. M. Produtos fitossanitários e entomopatógenos. In: Alves, S. B. Controle microbiano de insetos. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998, p. 217-238.
- Alves, S. B.; Lopes, R. B. Controle microbiano de pragas na América Latina. FEALQ: Piracicaba, 2008.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. F43 Fipronil. <<https://www.gov.br/anvisa/ptbr/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/f/4351json-file-1/view>>. 29 jul. 2021.
- Ashraf, M.; Farooq, M.; Shakeel, M.; Din, N.; Hussain, S.; Saeed, N.; Rajput, N. A. Influence of entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*, alone and in combination with diatomaceous earth and thiamethoxam on mortality, progeny production, mycosis, and sporulation of the stored grain insect pests. Environmental Science and Pollution Research, v. 24, p. 28165-28174, 2017. <<https://doi.org/10.1007/s11356-017-0383-6>>.

Barbosa Junior, G. B. Viabilidade no uso de fungos entomopatogênicos no sistema de cultivo de soja. Mato Grosso do Sul: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Chapadão do Sul, 2020. 37p. Dissertação Mestrado.

Barbosa, R. H.; Kassab, S. O.; Pereira, F. F.; Rossoni, C. Controle químico e biológico de *Mahanarva fimbriolata* Stal, 1854 (Hemiptera: Cercopidae) para regiões produtoras de cana-de-açúcar de Mato Grosso do Sul. *Ambiência*, v. 11, n. 1, p. 247-255, 2015. < 10.5935/ambiencia.2015.01.15nt>.

Bezerra, N. S. Eficiência de fungos entomopatogênicos sobre formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae). Paraíba: Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2018. 96p. Dissertação Mestrado.

Britto, J. S.; Forti, L. C.; Oliveira, M A.; Zanetti, R.; Wilcken, C. F.; Zanuncio, J. C.; Loeck, A. E.; Caldato, N.; Nagamoto, N. S.; Lemes, P. G.; Camargo, R. S. Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. *International Journal of Research in Environmental Studies*, v. 3, p. 11-92, 2016. < <http://repositorio.ufla.br/handle/1/36760>>.

Chaguri, J. L. Efeitos da exposição ao pesticida fipronil nas alterações pressóricas em ratos acordados. Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. 2016. 49p. Dissertação Mestrado.

Costa, M. A; Loureiro, E. S; Pessoa, L. G. A; Dias, P. M. Compatibilidade de inseticidas utilizados na cultura do eucalipto com *Metarhizium rileyi* (Farlow) (= *Nomuraea rileyi*). *Revista de Agricultura Neotropical*, v. 5, n. 3, p.44-48, 2018. <<https://doi.org/10.32404/rean.v5i3.2149>>.

Ferreira, D. F. Sisvar: A Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014. < <https://doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>>.

Fiedler, Ž.; Sosnowska, D. Side effects of fungicides and insecticides on entomopathogenic fungi *in vitro*. *Journal of Plant Protection Research*, v. 57, n. 4, 2017. < 10.1515/jppr-2017-0048>.

Fregonesi, A. F.; Mochi, D. A.; Monteiro, A. C. Compatibilidade de isolados de *Beauveria bassiana* a inseticidas, herbicidas e maturadores em condições de laboratório. *Arquivos do Instituto biológico*, v. 83, p. 1-8, 2016. <<https://doi.org/10.1590/1808-1657000242014>>.

IBA – INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. Relatório 2020. < <https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-iba-2020.pdf> >. 29 jul. 2021.

Lopes, R. B.; Souza, D. A.; Rocha, L. F. N.; Montalva, C.; Luz, C.; Humber, R. A.; Faria, M. *Metarhizium alvesiisp.* nov.: a new member of the *Metarhizium anisoplia* species complex.

Journal of Invertebrate Pathology, v. 151, p. 165-168, 2018. <
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.12.001>>.

Machado, L. M.; Costa, E. C. Altura de voo de escolitíneos (Coleoptera, Scolytinae) em povoamento de *Pinus taeda* L. no Sul do Brasil. Ciência Florestal, v. 27, n. 2, p. 669-678, 2017. <
<https://doi.org/10.5902/1980509827751>>.

Moino Junior, A.; Alves, S. B. Efeito de Imidacloprid e Fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen). Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, v. 27, p. 611-619, 1998. <
<https://doi.org/10.1590/S0301-80591998000400014>>.

Oliveira, R. C.; Neves, P. M. O. J.; Guzzo, E. C.; Alves, V. S. Compatibilidade de fungos entomopatogênicos com agroquímicos. Semina: Ciências Agrárias, v. 23, n. 2, p. 211- 216, 2002. <
<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/2098/1801>>.

Oliveira, R. P.; Pessoa, L. G. A.; Loureiro, E. S.; Oliveira, M. P. Compatibilidade de inseticidas utilizados no controle da mosca branca em soja com *Beauveria bassiana*. Revista de Agricultura Neotropical, v. 5, n. 4, p. 88-93, 2018. <
<https://doi.org/10.32404/rean.v5i4.2416>>.

Ortiz, A. G.; Filho, O. P.; Santos, A.; Souza, M. D.; Favares, L. G.; Nascimento, D. A. Resposta do forrageamento de *Acromyrmex rugosus* (Smith, 1858) e *Acromyrmex balzani* (Emery, 1890) (Hymenoptera: Formicidae) a mudas de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. com diferentes restrições nutricionais. Revista Espacios, v. 38, n. 44, 2017.
<https://www.revistaespacios.com/a17v38n44/a17v38n44p01.pdf>.

Pessoa, L. G. A.; Dutra, K. R.; Loureiro, E. S.; Adão, D. V.; Oliveira, G. S.; Dias, P. H. O tipo de exposição interfere na compatibilidade de herbicidas com *Metarhizium rileyi*? Research, Society and Development, v. 9, n. 6, e138963400, 2020a. <10.33448/rsd-v9i6.3400>.

Pessoa, L. G. A.; Souza, T. M. N.; Loureiro, E. S. Compatibilidade de inseticidas utilizados no manejo de pragas em eucalipto com *Beauveria bassiana* (Cordycipitaceae). Research, Society and Development, v. 9, n.8, e322985148, 2020b. < 10.33448/rsd-v9i8.5148>.

Rojas, V. M. A. Caracterização do fungo entomopatogênico *Isaria fumosorosea* quanto à produção de conídios, efeitos da radiação ultravioleta-B, temperatura alta e persistência em formulações do tipo dispersão oleosa. 2015. 100 Piracicaba: Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. 2015. 100p. Dissertação Mestrado.

Shewale, C. P.; Mohite, P. B. Combined efficacy of entomopathogenes and insecticides against white grub, *Leucopholis lepidophora* (Blanchard) infesting sugarcane. Journal of Entomology and Zoology Studies, v. 6, p. 1824-1827, 2018. <
<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20203001310>>.

Silva, R. A.; Quintela, E. D.; Mascarin, G. M.; Barrigossi, J. A. F.; Lião, L. M. Compatibility of conventional agrochemicals used in rice crops with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Scientia Agricola*, v. 70, n. 3, p. 152-160, 2013. < <https://doi.org/10.1590/S0103-90162013000300003>>.

Wilcken, C. F. Controle biológico de pragas florestais. *Revista Opiniões*, v. 43, p. 40-41, 2016. < <https://florestal.revistaopinioes.com.br/revista/detalhes/14-controle-biologico-de-pragas-florestais/>>.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A prospecção de agentes para o biocontrole de formigas cortadeiras é uma linha de pesquisa importante dentro do contexto econômico, tendo em vista que estes insetos-praga causam danos significativos aos cultivos florestais. Além disso, a busca por métodos que viabilizem o controle biológico é importante ao meio ambiente, já que os produtos químicos, atualmente utilizados, acumulam-se na natureza e não são biodegradados sob condições ambientais. No presente estudo, avaliou-se os fungos entomopatogênicos, importantes agentes de controle biológico a diversos grupos de insetos. A associação de fungos entomopatogênicos e inseticidas químicos para o controle de insetos-praga é uma estratégia de Manejo Integrado, visto que diversifica os modos de ação sobre os alvos. Entretanto, considera-se pertinente ainda investigar o efeito do inseticida Fipronil sobre as características morfológicas dos isolados utilizados nos bioensaios.

No trabalho em discussão, permite-se concluir que os isolados de *Beauveria bassiana* (IBCB 66, IBCB 170 e IBCB 632), *Cordyceps fumosorosea* (IBCB 130) e *Metarhizium anisopliae* (IBCB 348, IBCB 383 e IBCB 425) são particularmente promissores ao desenvolvimento de bioinseticidas. Cabe destacar que para *C. fumosorosea* são inexistentes na literatura estudos sobre sua patogenicidade em formigas cortadeiras, sendo que os resultados do presente estudo representam subsídios iniciais para futuras pesquisas. Adicionalmente, observou-se potencialidade do uso consorciado do inseticida Fipronil com os fungos entomopatogênicos explorados neste estudo. Ainda, considerando o contexto do Manejo Integrado de Pragas, verificou-se que o meio de cultura BDA é o mais recomendado para a produção massal de fungos entomopatogênicos, tendo em vista que, além de menor custo, garante a esporulação abundante dos microrganismos.

A utilização dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana*, *C. fumosorosea* e *M. anisopliae* se apresentou como uma alternativa potencial para o manejo de populações de *Acromyrmex heyeri*. Porém, cabe destacar que essa potencialidade deve ser verificada em condições de campo, bem como, a realização de ensaios com outras espécies de formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*.

A utilização de produtos químicos, além de serem tóxicos ao meio ambiente e ao aplicador, eleva os custos de produção e não tem surtido efeito adequado em inúmeras situações. Nesse sentido, novos estudos na linha de pesquisa de controle biológico de formigas cortadeiras com fungos entomopatogênicos são necessários, considerando a

diversidade de espécies de fungos entomopatogênicos e sua virulência, bem como a condução de metodologias de manejo a campo, considerando os fatores bióticos e sua interferência na viabilidade dos microrganismos utilizados.

Dessa maneira, verifica-se que o controle biológico atende a necessidade crescente do Manejo Integrado de Pragas, ou seja, controlar os insetos-praga com a manutenção das condições ambientais que permitam a manutenção do ecossistema como um todo. Em adição, a utilização do controle biológico não objetiva o extermínio das formigas cortadeiras, mas sim uma redução populacional para minimizar os danos econômicos e ambientais ocasionados pela mortalidade das plantas.