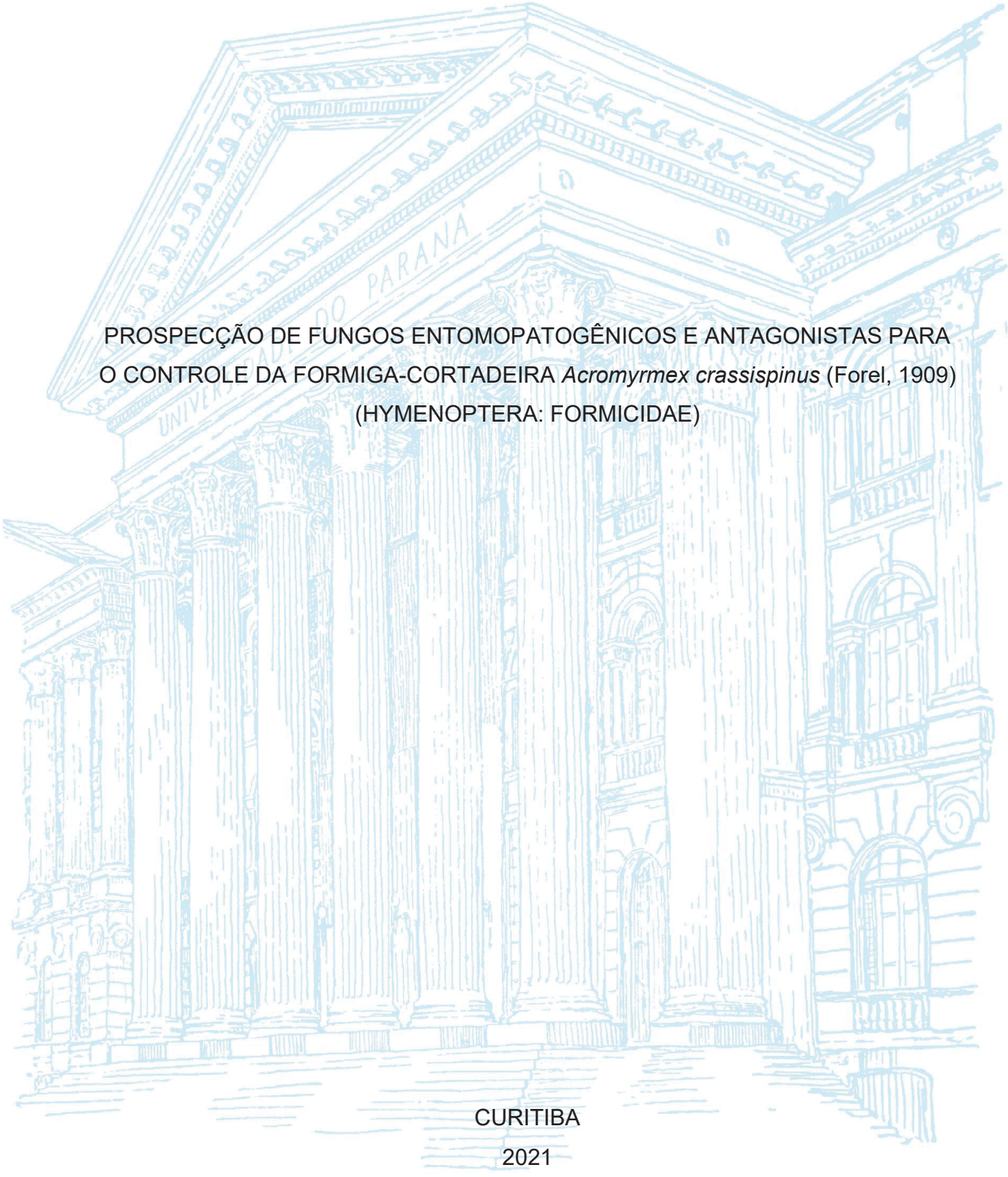
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THIELE SIDES CAMARGO



PROSPECÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E ANTAGONISTAS PARA O CONTROLE DA FORMIGA-CORTADEIRA *Acromyrmex crassispinus* (Forel, 1909) (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

CURITIBA

2021

THIELE SIDES CAMARGO

PROSPECÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E ANTAGONISTAS PARA O CONTROLE DA FORMIGA-CORTADEIRA *Acromyrmex crassispinus* (Forel, 1909) (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Silvicultura.

Orientador: Prof. Dr. Celso Garcia Auer

Coorientadores:

Dra. Mariane Aparecida Nickele
Dr. Wilson Reis Filho
Dra. Susete do Rocio Chiarello Penteado
Dra. Elisiane de Castro Queiroz

CURITIBA

2021

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Florestais e da Madeira - UFPR

Camargo, Thiele Sides
Prospecção de fungos entomopatogênicos e antagonistas para o controle da formiga-cortadeira Acromyrmex crassispinus (Forel, 1909) (Hymenoptera: Formicidae) / Thiele Sides Camargo. - Curitiba, 2021.
1 recurso on-line : PDF.

Orientador: Prof. Dr. Celso Garcia Auer
Coorientadores: Dra. Mariane Aparecida Nickele
Dr. Wilson Reis Filho
Dra. Susete do Rocio Chiarello Penteado
Dra. Elisiane de Castro Queiroz
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal. Defesa: Curitiba, 14/04/2021.

1. Formiga-cortadeira - Controle biológico. 2. Insetos florestais - Controle biológico. 3. Saúva (Formiga). 4. Himenóptero. 5. Entomologia. 6. Fungos entomopatogênicos. I. Auer, Celso Garcia. II. Nickele, Mariane Aparecida. III. Reis Filho, Wilson. IV. Penteado, Susete do Rocio Chiarello. V. Queiroz, Elisiane de Castro. VI. Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias. VII. Título.

CDD - 595.79
CDU - 634.0.453
630.45

Bibliotecária: Marilene do Rocio Veiga – CRB9/424

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA FLORESTAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **THIELE SIDES CAMARGO** intitulada: **Prospecção de fungos entomopatogênicos e antagonistas para o controle da formiga-cortadeira *Acromyrmex crassispinus* (Forel, 1909) (Hymenoptera: Formicidae)**, sob orientação do Prof. Dr. CELSO GARCIA AUER, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 14 de Abril de 2021.

Assinatura Eletrônica
14/04/2021 19:26:26.0
CELSO GARCIA AUER
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
15/04/2021 08:27:35.0
IDA CHAPAVAL PIMENTEL
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
14/04/2021 17:06:31.0
ROGERIO BIAGGIONI LOPES
Avaliador Externo (EMBRAPA RECURSOS GENéTICOS E BIOTECNOLOGIA)

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.
Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 89461
Para autenticar este documento/assinatura, acesse https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp e insira o codigo 89461

Aos meus pais, César Augusto Martins Camargo e Cláudia Luciane Sides,
que sempre acreditaram e me apoiaram nesta trajetória. **DEDICO**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter estado comigo em todos os momentos e ter permitido que chegasse até aqui, colocando pessoas maravilhosas em meu caminho que me possibilitaram, cada um à sua forma, realizar este sonho.

Ao meu orientador e amigo, Professor Dr. Celso Garcia Auer, pela oportunidade e por todos os ensinamentos, contribuindo grandiosamente com minha formação acadêmica, abrindo a mim as portas deste curioso e magnífico mundo microscópico.

Aos meus coorientadores, Dr. Wilson Reis Filho, Dra. Susete do Rocio Chiarello Penteado, Dra. Mariane Aparecida Nickele e Dra. Elisiane de Castro Queiroz, por todos os ensinamentos, pelo apoio, amizade e paciência, sim, muita paciência foi necessária, desde a busca de rainhas e colônias no campo, manutenção dos ninhos, repicagens incansáveis e até a contagem de centenas de formigas e milhares de esporos, vocês estiveram sempre presentes, e mais do que isso, sua dedicação e o profissionalismo foram a inspiração e o incentivo para que este trabalho tivesse sua conclusão, levarei seus exemplos comigo.

Aos meus pais, César Augusto Martins Camargo e Cláudia Luciane Sides, por todo o amor, apoio e dedicação em minha criação, por sempre acreditaram e me fortalecerem em momentos difíceis. Sem vocês nada disso seria possível.

Aos meus avós Orêncio Sides, Idalina Sides, Francisco Camargo e Dorvalina Martins, pela trajetória de vida e ensinamentos passados aos meus pais e a mim.

As minhas irmãs, Tharla e Isadora, agradeço pelo carinho; e aos meus sobrinhos Emanuel e Gael desejo, que assim como eu, tenham a oportunidade de estudar em instituições públicas de ensino de qualidade no futuro.

Ao meu companheiro Rafael Barbosa, pelo apoio e paciência nos momentos difíceis, por nunca ter deixado de acreditar em mim, mesmo fisicamente distante, sempre esteve ao meu lado em todos os momentos; aos amigos, Lidiane e Marcio, pelo apoio e exemplo como acadêmicos e educadores; e aos meus filhos felinos, companheiros na escrita: Kennedy, Floriana e Tobias.

Aos laboratoristas da Embrapa Florestas, Caroline Bührer e Davi Viega e aos colegas Jade, João Arthur, Natália e Gabriela, pelo companheirismo, conversas descontraídas, caronas e lanches compartilhados, enfim, pela amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida para a realização deste estudo.

À Embrapa Florestas e ao FUNCEMA, pelo auxílio e uso de suas instalações e equipamentos; e à empresa Arauco Forest Brasil S.A., pela cessão das áreas de coleta em Campo do Tenente – PR, em especial ao técnico Délcio, pelo apoio e experiência de campo.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento e conclusão de minha dissertação, meus sinceros agradecimentos.

“Em um universo que já tem 10 ou 15 bilhões de anos, estamos constantemente esbarrando em surpresas. Em algum lugar, algo incrível está esperando para ser descoberto”.

(Carl Sagan)

RESUMO

As formigas-cortadeiras são consideradas insetos-praga em diversos países das Américas. Seu hábito de cortar material vegetal, atribuiu a elas responsabilidade sobre significantes danos a inúmeras culturas e sérios prejuízos econômicos para os setores agrícola e florestal. Na região Sul do Brasil, a espécie *Acromymex crassispinus* é considerada a formiga-cortadeira mais abundante e nociva aos plantios florestais. Atualmente, a forma de controle mais utilizada no combate desta praga é o uso de isca formicida, no entanto, o princípio ativo presente em sua formulação é considerado danoso ao meio ambiente. Este estudo teve por objetivo prospectar fungos entomopatogênicos e antagonistas ao fungo simbionte das formigas-cortadeiras, naturalmente associados à espécie *A. crassispinus,* possibilitando assim o desenvolvimento de uma nova tecnologia que permita seu controle de forma efetiva e sustentável no futuro. Para isso, foram realizadas coletas dos fungos em ninhos situados em um plantio de pinus no município de Campo do Tenente, PR. Os ninhos foram submetidos, previamente, a dois tratamentos com isca-tóxica à base de sulfluramida (2,5 e 5 g), para que se tornassem mais suscetíveis ao desenvolvimento desses microrganismos. Após a coleta, amostras de jardins de fungos e insetos mortos foram levadas para isolamento de fungos em laboratório. As colônias fúngicas resultantes foram purificadas e identificadas por sequenciamento genético. Foram identificados 195 isolados fúngicos, distribuídos em 29 famílias, 36 gêneros e 53 espécies, que apresentaram diversos papéis ecológicos. Os gêneros mais frequentes foram *Trichoderma* (49,2%), *Penicillium* (13,8%), *Chaetomium* (6,2%) e *Fusarium* (3,6%). Não foi constatada diferença significativa na composição de espécies entre os tratamentos de iscas aplicados, entretanto constatou-se que a aplicação de subdoses de isca formicida pode favorecer o desenvolvimento de fungos antagônicos às formigas-cortadeiras. Foram realizados bioensaios de patogenicidade com possíveis fungos entomopatogênicos a *A. crassispinus* e com fungos antagonistas ao seu fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus*. As distribuições de sobrevivência das operárias de *A. crassispinus* diferiram significativamente entre os tratamentos com fungos ($p < 0,001$). As comparações por pares demonstraram que três isolados fúngicos mostraram-se patogênicos a operárias de *A. crassispinus,* diferindo estatisticamente dos tratamentos controle (*Rhizomucor variabilis* F10T1IA (Água+Tween, $p < 0,001$; Água, $p < 0,001$), *Trichoderma atroviride* F4T2VC (Água+Tween, $p < 0,001$; Água, $p < 0,001$) e *Fusarium oxysporum* F25T3IB (Água+Tween, $p = 0,005$; Água, $p = 0,001$). Onze isolados inibiram significativamente o crescimento micelial de *L. gongylophorus* ($p < 0,001$), destacando-se *Escovopsis weberi* N5T3IIA com a maior inibição do crescimento (69,7%). Este estudo trouxe informações inéditas acerca do controle biológico de *A. crassispinus in vitro*. Comprovou-se o potencial de isolados fúngicos como entomopatogênicos e antagonistas de seu fungo simbionte. Assim, novos estudos precisam ser conduzidos sobre a eficiência destes agentes em laboratório e a campo.

Palavras-chave: controle biológico, entomologia florestal, entomopatógenos, *Leucoagaricus gongylophorus*, micoparasita, quenquém-de-cisco.

ABSTRACT

Leafcutter ants are considered a pest insect in several countries in the Americas. Their habit of cutting plant material has attributed to them responsibility for significant damage to numerous crops and serious economic losses to the agricultural and forestry sectors. In Southern Brazil, the species *Acromymex crassispinus* is considered the most abundant and harmful leaf-cutting ant to forest plantations. Currently, the most common form of control used to combat this pest is the use of toxic baits; however, the active ingredient present in its formulation is considered harmful to the environment. This study aimed to prospect entomopathogenic fungi and antagonists to the symbiont fungus of leaf-cutting ants, naturally associated with the species *A. crassispinus*, thus enabling the development of a new technology that allows its control in an effective and sustainable way. For this purpose, the fungi were collected from nests located in a pine plantation in Campo do Tenente, PR. The nests were previously submitted to two treatments with toxic bait based on sulfluramide (2.5 and 5 g), to make them more susceptible to the development of these organisms. After collection, samples of fungus gardens and dead insects were taken for fungal isolation in the laboratory. Fungal colonies were purified and identified by genetic sequencing. 195 fungal isolates were identified, distributed in 29 families, 36 genera and 53 species, which presented several ecological roles. The most frequent genera were *Trichoderma* (49.2%), *Penicillium* (13.8%), *Chaetomium* (6.2%) and *Fusarium* (3.6%). No significant difference in species composition was found between the applied bait treatments, however it was found that the application of subdoses of ant bait may favor the development of antagonistic fungi to leafcutter ants. Pathogenicity bioassays with possible entomopathogenic fungi to *A. crassispinus* and its symbiont fungus *Leucoagaricus gongylophorus* were performed. Analyses of survival of *A. crassispinus* workers differed significantly among fungus treatments ($p < 0.001$). Pairwise comparisons demonstrated that three fungal isolates were shown to be pathogenic to *A. crassispinus* workers, differing statistically from control treatments (*Rhizomucor variabilis* F10T1IA (Water+Tween, $p < 0.001$; Water, $p < 0.001$), *Trichoderma atroviride* F4T2VC (Water+Tween, $p < 0.001$; Water, $p < 0.001$) and *Fusarium oxysporum* F25T3IB (Water+Tween, $p = 0.005$; Water, $p = 0.001$). A total of 11 isolates significantly inhibited the mycelial growth of *L. gongylophorus* ($p < 0.001$). Among these, *Escovopsis weberi* N5T3IIA provided the highest inhibition of the symbiont fungus of *A. crassispinus* (69.7%). This study brought new information about the biological control *in vitro* of *A. crassispinus*. The potential of fungal isolates as entomopathogenics and antagonists of their symbiotic fungus was proven. However, new studies need to be conducted on the efficiency of these agents in the laboratory and in the field.

Key-words: biological control, forest entomology, entomopathogens, *Leucoagaricus gongylophorus*, mycoparasite, quenquém-de-cisco.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

COMUNIDADE FÚNGICA ASSOCIADA A *Acromyrmex crassispinus* (FOREL, 1909) (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) E PROSPECÇÃO DE POTENCIAIS AGENTES BIOLÓGICOS PARA SEU CONTROLE.....26

FIGURA 1 – CRESCIMENTO MICELIAL DE UM FUNGO ANTAGONISTA SOBRE O JARDIM DE FUNGO DE *Acromyrmex crassispinus* APÓS A APLICAÇÃO DE SUBDOSE DE ISCA FORMICIDA. 34

CAPÍTULO II

CONTROLE BIOLÓGICO DE *Acromyrmex crassispinus* COM FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E ANTAGONISTAS DE SEU FUNGO SIMBIONTE: UM ESTUDO PRELIMINAR 51

FIGURA 1 – CULTURAS PAREADAS DO FUNGO SIMBIONTE DE *Acromyrmex crassispinus*, (*Leucoagaricus gongylophorus,* À DIREITA) AOS 14 DIAS, E POTENCIAIS ISOLADOS ANTAGONISTAS.....64

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO I

COMUNIDADE FÚNGICA ASSOCIADA A *Acromyrmex crassispinus* (FOREL, 1909) (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) E PROSPECÇÃO DE POTENCIAIS AGENTES BIOLÓGICOS PARA SEU CONTROLE.....26

GRÁFICO 1 – DIAGRAMA DE VENN REPRESENTANDO O PERCENTUAL DE OCORRÊNCIA DE ESPÉCIES FÚNGICAS ASSOCIADAS A NINHOS DE *Acromyrmex crassispinus* SUBMETIDOS A TRÊS TRATAMENTOS (T1=CONTROLE, T2=2,5 g DE ISCA-FORMICIDA E T3=5 g DE ISCA-FORMICIDA).....36

GRÁFICO 2 – REPRESENTATIVIDADE PERCENTUAL DOS GÊNEROS DE FUNGOS MAIS ABUNDANTES ASSOCIADOS A *Acromyrmex crassispinus*. 36

GRÁFICO 3 – CURVA DE INTERPOLAÇÃO/EXTRAPOLAÇÃO DE RIQUEZA DE ESPÉCIES EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE INDIVÍDUOS COLETADOS. 44

GRÁFICO 4 – ESCALA MULTIDIMENSIONAL NÃO MÉTRICA (NMDS) COM BASE EM UMA MATRIZ DE DISSIMILARIDADE DE BRAY-CURTIS PARA COMUNIDADES FÚNGICAS ASSOCIADAS AOS NINHOS DE *Acromyrmex crassispinus* SUBMETIDOS A TRÊS TRATAMENTOS. 44

GRÁFICO 5 – DISTRIBUIÇÃO DE ISOLADOS FÚNGICOS POR GRUPOS FUNCIONAIS DE ACORDO COM ORIGEM, COLETA E TRATAMENTOS APLICADOS, ONDE A=ANTAGONISTAS, P=FITOPATOGÊNICOS, E=ENTOMOPATOGÊNICOS, PODENDO SER COMBINADOS, E O=OUTRA CLASSIFICAÇÃO (SAPROFÍTICOS/CLASSIFICAÇÃO DESCONHECIDA).....45

CAPÍTULO II

CONTROLE BIOLÓGICO DE *Acromyrmex crassispinus* COM FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E ANTAGONISTAS DE SEU FUNGO SIMBIONTE: UM ESTUDO PRELIMINAR 59

GRÁFICO 1 – CURVAS DE PROBABILIDADE DA SOBREVIVÊNCIA DE OPERÁRIAS *DE Acromyrmex crassispinus* SUBMETIDAS A

DIFERENTES ISOLADOS FÚNGICOS COM POTENCIAL ENTOMOPATOGÊNICO. 59
GRÁFICO 2 – SOBREVIVÊNCIA MEDIANA (TL50) DE OPERÁRIAS DE *Acromyrmex crassispinus* SUBMETIDAS A DIFERENTES ISOLADOS FÚNGICOS COM POTENCIAL ENTOMOPATOGÊNICO. 60

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

COMUNIDADE FÚNGICA ASSOCIADA A *Acromyrmex crassispinus* (Forel, 1909) (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) E PROSPECÇÃO DE POTENCIAIS AGENTES BIOLÓGICOS PARA SEU CONTROLE.....26

TABELA 1 – LISTA DE ESPÉCIES DE FUNGOS ASSOCIADOS A *Acromyrmex crassispinus* E OCORRÊNCIA EM CADA TRATAMENTO E ORIGEM. 37

CAPÍTULO II

CONTROLE BIOLÓGICO DE *Acromyrmex crassispinus* COM FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E ANTAGONISTAS DE SEU FUNGO SIMBIONTE: UM ESTUDO PRELIMINAR 51

TABELA 1 – ISOLADOS FÚNGICOS TESTADOS QUANTO A SUA PATOGENICIDADE A *Acromyrmex crassispinus* E ANTAGONISMO AO SEU FUNGO SIMBIONTE *Leucoagaricus gongylophorus*. 55

TABELA 2 – PERCENTUAL MÉDIO DE MORTALIDADE *in vitro* DE OPERÁRIAS DE *Acromyrmex crassispinus* SUBMETIDAS A DIFERENTES ISOLADOS FÚNGICOS COM POTENCIAL ENTOMOPATOGÊNICO, NOS PRIMEIROS DEZ DIAS APÓS AS APLICAÇÕES. 61

TABELA 3 – CRESCIMENTO MICELIAL DE *Leucoagaricus gongylophorus*, CULTIVADO PELAS FORMIGAS-CORTADEIRAS *Acromyrmex crassispinus*, NA PRESENÇA DE DIFERENTES FUNGOS FILAMENTOSOS. 63

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL....16
1.1 OBJETIVOS 18
Objetivo geral 18
Objetivos específicos 18
2 REVISÃO DE LITERATURA 19
2.1 CARACTERIZAÇÃO, IMPORTÂNCIA E MORFOLOGIA DAS FORMIGAS-CORTADEIRAS, COM ÊNFASE EM *Acromyrmex crassispinus*....19
2.2 BIOECOLOGIA, FUNGICULTURA E DEFESA DOS NINHOS DE FORMIGAS-CORTADEIRAS 20
2.3 MÉTODOS DE CONTROLE DE FORMIGAS-CORTADEIRAS E PERSPECTIVAS QUANTO À UTILIZAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E ANTAGONISTAS 24
CAPÍTULO I
COMUNIDADE FÚNGICA ASSOCIADA A *Acromyrmex crassispinus* (FOREL, 1909) (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) E PROSPECÇÃO DE POTENCIAIS AGENTES BIOLÓGICOS PARA SEU CONTROLE....26
1 INTRODUÇÃO 28
2 MATERIAL E MÉTODOS 29
2.1 ÁREA DE ESTUDO E DEMARCAÇÃO DE NINHOS E TRATAMENTOS 29
2.2 COLETA DE JARDINS DE FUNGO E INSETOS....30
2.3 CULTIVO E ISOLAMENTO DAS COLÔNIAS FÚNGICAS....30
2.4 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS....31
2.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E CONSERVAÇÃO DOS ISOLADOS 31
2.5.1 Purificação de DNA 32
2.5.2 PCR convencional....32
2.5.3 Sequenciamento Sanger....32
2.5.4 Análise dos dados 33
3. RESULTADOS....33
3.1 DESCRIÇÃO DAS COMUNIDADES FÚNGICAS ASSOCIADAS A *Acromyrmex crassispinus* E ASPECTOS ECOLÓGICOS....33
3.2 DIVERSIDADE E COMPOSIÇÃO DE ESPÉCIES DE FUNGOS ASSOCIADOS A *Acromyrmex crassispinus*....43

4 DISCUSSÃO **45**
5 CONCLUSÕES **49**
CAPÍTULO II
CONTROLE BIOLÓGICO DE *Acromyrmex crassispinus* COM FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E ANTAGONISTAS DE SEU FUNGO SIMBIONTE: UM ESTUDO PRELIMINAR **51**
1 INTRODUÇÃO **53**
2 MATERIAL E MÉTODOS **54**
2.1 OBTENÇÃO DOS INSETOS 54
2.2 ORIGEM DOS ISOLADOS 54
2.3 BIOENSAIOS DE PATOGENICIDADE COM POSSÍVEIS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS A *Acromyrmex crassispinus* E ANÁLISES EMPREGADAS 56
2.4 BIOENSAIOS COM POSSÍVEIS FUNGOS ANTAGONISTAS DO FUNGO SIMBIONTE DE *Acromyrmex crassispinus* E ANÁLISES EMPREGADAS 57
3 RESULTADOS **58**
3.1 BIOENSAIOS COM POSSÍVEIS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS A *Acromyrmex crassispinus* 58
3.2 BIOENSAIOS COM POSSÍVEIS FUNGOS ANTAGONISTAS DO FUNGO SIMBIONTE DE *Acromyrmex crassispinus* E ANÁLISES EMPREGADAS 62
4 DISCUSSÃO **66**
5 CONCLUSÃO **70**
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS **70**
REFERÊNCIAS GERAIS **71**
APÊNDICE 1 – INFORMAÇÕES ACERCA DOS ISOLADOS COLETADOS DE NINHOS DE *Acromyrmex crassispinus*: CÓDIGO DO ISOLADO, ESPÉCIE, ORIGEM, LOCAL DE COLETA E CÓDIGO DE ACESSO GENBANK. **81**

1 INTRODUÇÃO GERAL

As formigas-cortadeiras são consideradas insetos-praga em diversos países do continente americano. Seu hábito de cortar material vegetal, geralmente folhas, atribuiu a elas responsabilidade sobre significantes danos a inúmeras culturas e sérios prejuízos à economia de alguns países, dentre eles, o Brasil (WILSON, 1976). As formigas-cortadeiras possuem ampla distribuição em todo o território nacional e são conhecidas popularmente como saúvas e quenquéns, *Atta* (Fabricius,1804) e *Acromyrmex* (Mayr, 1865), respectivamente, sendo estes os dois principais gêneros e considerados importantes pragas para plantios agrícolas e florestais (ANJOS et al., 1993). No Brasil, a saúva como praga apresenta grande notoriedade histórica (SILVA, 2010), entretanto, em algumas regiões do país as quenquéns podem ser consideradas tão ou mais importantes que as saúvas para a agricultura (DE GASPERI, 1963, 1975; JURUENA, 1980), ocasionando prejuízos em lavouras, pomares e em áreas de reflorestamento (DELLA LUCIA, 1993; LINK et al., 2000).

Acromyrmex crassispinus (Forel, 1909) ou quenquém-de-cisco é considerada uma das espécies mais abundantes e prejudiciais às culturas, devido à elevada frequência de ninhos ocorrentes em algumas regiões e pela alta diversidade de plantas utilizadas como fonte de alimento ao seu fungo simbionte (JURUENA, 1980; LINK et al., 1997), além disso é considerada a formiga-cortadeira mais comum na região Sul do Brasil (GONÇALVES, 1961; RANDO e FORTI, 2005; NICKELE et al., 2009). O principal método empregado para o controle desta praga envolve a aplicação sistemática de produtos químicos, como por exemplo, o uso de iscas-tóxicas contendo sulfluramida ou/e fipronil em sua formulação (CARDOSO, 2010). Entretanto, esses compostos químicos não são biodegradáveis e acabam se acumulando no ambiente, podendo contaminar o solo, a água e produzir efeitos tóxicos para organismos não alvos (GOOSEY, 2010). Além disso, órgãos certificadores, como o Forest Stewardship Council (principal órgão certificador de florestas no mundo), contestam o uso da sulfluramida no controle de formigas-cortadeiras (ZANÚNCIO et al., 2016). Sendo assim, torna-se necessária a busca por um método de controle que seja eficiente, menos tóxico e mais específico (CANALI, 2017), além do desenvolvimento de tecnologias alternativas para o controle da praga, contribuindo assim para que haja

uma produção verdadeiramente sustentável, tanto de culturas agrícolas, quanto florestais.

Para tal finalidade, o controle biológico é uma área de pesquisa que se mostra bastante promissora e o uso de fungos entomopatogênicos, por exemplo, é uma alternativa viável devido à facilidade de produção, aplicação e eficácia, podendo ser utilizado isoladamente ou em conjunto com outros métodos existentes (LOURENÇÃO et al., 1993).

O controle biológico por meio do uso de fungos entomopatogênicos é visto como uma das alternativas mais promissoras no combate às formigas-cortadeiras, (DIEHL-FLEIG et al., 1988; RIBEIRO et al., 2012). Espécies de fungos como *Beauveria* spp. e *Metarhizum* spp. são entomopatogênicos generalistas, sendo virulentos a diversos insetos, inclusive aos sociais, como as formigas. Diversos pesquisadores têm comprovado a patogenicidade desses fungos para o controle de formigas-cortadeiras (DIEHL-FLEIG; SILVA, 1992; HUGHES, et al., 2004; BUSARELLO, 2008; CASTILHO et al., 2010). Todavia, poucos trabalhos têm sido realizados em busca de agentes para o controle de formigas-cortadeiras pertencentes ao gênero *Acromyrmex*.

Estudos que visam o conhecimento do potencial patogênico dos fungos em formigas-cortadeiras trazem informações sobre os inimigos naturais desses insetos e geram subsídios para que técnicas alternativas de controle sejam desenvolvidas, trazendo benefícios para a economia dos agricultores, das empresas florestais e ao meio ambiente (RODRIGUES, 2004). Portanto, esta pesquisa tem como objetivo prospectar fungos entomopatogênicos e antagonistas associados à formiga-cortadeira *A. crassispinus*, e testar a sua patogenicidade, fornecendo assim as bases para o desenvolvimento de tecnologias para seu controle.

1.1 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Prospectar fungos entomopatogênicos e fungos antagonistas do fungo simbionte de *Acromyrmex crassispinus* para utilização no controle biológico desta praga.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Isolar e identificar as espécies de fungos que ocorrem em colônias da formiga-cortadeira *A. crassispinus,* em condições de campo.

b) Verificar as espécies de fungos com potencial entomopatogênico para operárias de *A. crassispinus*, em condições de laboratório;

c) Verificar as espécies de fungos com potencial antagonista do fungo simbionte cultivado por *A. crassispinus*, em condições de laboratório;

d) Eleger as espécies de fungos mais promissoras para o controle biológico de *A. crassispinus*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARACTERIZAÇÃO, IMPORTÂNCIA E MORFOLOGIA DAS FORMIGAS-CORTADEIRAS, COM ÊNFASE EM *Acromyrmex crassispinus*

As formigas são insetos sociais, distribuídas em diversos grupos taxonômicos e apresentam muitas características divergentes entre si, como a vasta diversidade de hábitos alimentares. Dentre as formigas da tribo Attini, o "grupo *Atta"* se especializou em uma dieta essencialmente fungívora (WARD et al., 2015). Porém, mais do que o hábito de se alimentar de fungos, essas formigas apresentam o hábito de cultivar os fungos utilizando diversos materiais como substrato. As formigas-cortadeiras utilizam principalmente material vegetal fresco, obtido através do corte de plantas, para o cultivo do seu fungo simbionte. *Acromyrmex* e *Atta*, são os dois principais gêneros de formigas-cortadeiras, correspondendo aos nomes populares de quenquéns e saúvas, respectivamente.

As formigas-cortadeiras são consideradas insetos nativos da fauna da América do Sul, estendendo-se até parte da América do Norte, compreendendo as zonas tropicais e subtropicais (WEBER, 1966). No Brasil, elas ocorrem em todo território, nos mais diversos biomas e apresentam intensa atividade, atuando sobre muitas espécies vegetais ao longo de todas as estações (CARDOSO, 2010). Em muitas regiões do país, as formigas-cortadeiras pertencentes ao gênero *Atta* receberam grande notoriedade pelos enormes prejuízos resultantes de sua atividade de forrageamento ao longo da história agrícola brasileira (SILVA, 2010). Porém, muitos pesquisadores relataram que em algumas regiões do país, as quenquéns (*Acromyrmex*) são predominantes (DE GASPERI, 1963, 1975; JURUENA, 1980, NICKELE et al., 2009).

Na região Sul do Brasil, *Acromyrmex crassispinus* (Forel, 1909) é considerada a quenquém mais abundante e nociva aos cultivos, devido à alta densidade de ninhos fundados e por apresentar hábito generalista quanto à escolha de plantas para o corte (JURUENA, 1980; LINK et al., 1997). Essa espécie pode ser considerada a praga de maior importância econômica para plantios de pínus, devido às proporções de danos ocasionados aos plantios jovens (REIS FILHO e OLIVEIRA, 2002; NICKELE et al., 2009; 2012; 2020).

Morfologicamente, as formigas pertencentes ao gênero *Acromyrmex* caracterizam-se por apresentar quatro ou cinco pares de espinhos dorsais e primeiro segmento do gáster rugoso (GONÇALVES, 1961; LOECK e GRUTZMACHER, 2001). A espécie *A. crassispinus* possui características determinantes para sua identificação, dentre elas, tegumento sem reticulação conspícua quando observado em microscópio estereoscópico, com aumento de 40 vezes e com espinhos mesonotais anteriores iguais ou pouco menores que os pronotais laterais (LOECK e GRUTZMACHER, 2005).

Quanto à arquitetura de seus ninhos, as espécies do gênero *Acromyrmex* geralmente constroem ninhos, com apenas uma ou poucas câmaras, dificultando sua localização e controle, fato esse que contribui para uma maior densidade de formigueiros (MOREIRA et al., 2001). A espécie *A. crassispinus* constrói ninhos superficiais, contendo apenas uma câmara, coberta por ciscos, por esse motivo essa espécie recebeu o nome popular de quenquém-de-cisco (GONÇALVES, 1961).

2.2 BIOECOLOGIA, FUNGICULTURA E DEFESA DOS NINHOS DE FORMIGAS-CORTADEIRAS

As formigas-cortadeiras são insetos sociais que ao longo de sua evolução desenvolveram complexas relações entre si e com os demais organismos a elas associados. As sociedades de formigas-cortadeiras são altamente organizadas, podendo ser classificadas em diferentes castas, ou seja, grupos de indivíduos morfologicamente semelhantes, com mesma idade e estado fisiológico, exercendo uma mesma função na sociedade (CHAVES-DA-COSTA, 2017). Ainda, o gênero *Acromyrmex* apresenta diferentes graus de polimorfismo dentre insetos de um mesmo ninho, o que remete à esta noção de castas (WILSON, 1971).

As castas dividem-se basicamente em casta reprodutiva e casta de operárias. Portanto, o conjunto de formigas operárias enquadram-se em uma casta distinta da rainha (HÖLLDOBLER e WILSON, 2011; SOUZA et al., 2011). Dentre as atividades exercidas pelas operárias, o forrageamento e a cultura do jardim de fungo são as de maior relevância para o pleno crescimento da colônia. A atividade externa de *A. crassispinus* ocorre em maior intensidade no mês de dezembro, ocorrendo uma redução da atividade no mês de janeiro, podendo ser explicada pela existência de

uma maior proporção de duas castas específicas, as quais possuem atividades que as fazem permanecem no interior dos ninhos. Entre os meses de fevereiro e abril, as castas incumbidas do forrageamento são as mais favorecidas pelo período, ocorrendo assim uma alta atividade (REIS FILHO e OLIVEIRA, 2002). Desse modo, a divisão de trabalho é dada pelo recrutamento de indivíduos de certo tamanho, aumentando a probabilidade de que realizem um determinado conjunto de tarefas de forma eficiente em benefício da colônia (WILSON, 1980; ANJOS et al., 1998). Além disso, em ninhos adultos é possível que sejam encontrados grupos de indivíduos temporários, compostos por machos alados e fêmeas aladas, que são criados e liberados anualmente pela colônia, para que novos ninhos sejam fundados (ANJOS et al., 1998).

No interior das câmaras dos ninhos ocorre o cultivo do fungo simbionte, onde também estão alojados a rainha e as formas jovens das formigas (GONÇALVES, 1961; MARICONI, 1970). O fungo simbionte cultivado no jardim de fungos consiste na principal fonte de alimento das formigas, e para as espécies de *Atta* e *Acromyrmex*, prevalece o cultivo de fungos do gênero *Leucoagaricus* (Locq. ex Singer, 1948). Esse fungo vive exclusivamente associado às formigas-cortadeiras e assim, um obrigatoriamente necessita do outro para sobreviver (ANJOS et al., 1998; MOREIRA et al., 2011).

A fungicultura, ou seja, cultivo do fungo simbionte, é realizada pelas operárias menores, logo após o corte e carregamento de partículas de material vegetal realizado pelas operárias maiores. O material passa por um processo de higienização e preparo, sendo mastigado e degradado, recebendo um tratamento de substâncias químicas presentes em sua “saliva”, além de fluido fecal, até a sua incorporação no fungo simbionte (DINIZ e BUENO, 2010). A atividade de forrageamento, por sua vez, ocorre através da formação de trilhas bem definidas e pela excreção de feromônios específicos para essa atividade. Operárias denominadas escoteiras saem do ninho e procuram plantas das quais possam retirar material para o cultivo de seu fungo e, após a seleção da planta, as operárias marcam as trilhas com feromônios, recrutando inúmeras operárias cortadeiras, que darão início a obtenção e transporte de recursos para seu ninho (ANJOS et al., 1998). No percurso de forrageamento e cultivo do fungo, naturalmente são encontrados diversos organismos atuando em contraponto às

formigas-cortadeiras, a exemplo dos predadores naturais e microrganismos patogênicos associados às essas formigas.

O jardim de fungo está continuamente exposto a diversos microrganismos presentes no substrato coletado externamente pelas formigas e no próprio solo. As formigas cultivadoras de fungos contêm pelo menos quatro microrganismos associados a elas em tempo integral: o fungo simbionte (WEBER, 1972), o fungo parasita *Escovopsis* (J. J. Muchovej e Della Lucia, 1990) (CURRIE et al., 1999a), a bactéria *Pseudonocardia* (Henssen, 1957) entre outras bactérias filamentosas (CURRIE et al., 1999a, KOST et al., 2007) e as leveduras negras *Phialophora* (Nêspera, 1915) (ATTILI-ANGELIS et al., 2014). O fungo simbionte cultivado pelas formigas-cortadeiras é *Leucoagaricus gongylophorus* Möeller (Singer) 1986 (WEBER, 1972), que pertence à Ordem Agaricales (Basidiomycota). O fungo possui a característica de produzir corpos de frutificação (cogumelos), no entanto essas estruturas raramente se formam em ninhos, pois as formigas acabam suprimindo o crescimento dessas frutificações. Esta supressão não impossibilita que o fungo também se beneficie com essa relação, visto que em retribuição, as formigas fornecem substrato para seu crescimento, proteção contra parasitas/competidores e asseguram a sua reprodução através da transferência vertical por meio de novas rainhas que fundarão seus próprios ninhos.

Muitos microrganismos que entram em contato com os ninhos podem atuar como antagonistas do fungo simbionte (RODRIGUES et al., 2008) ou serem patogênicos às operárias. Fungos geralmente encontrados no solo, pertencentes aos gêneros *Cunninghamella* (Matr, 1903), *Fusarium* (Link, 1809) e *Trichoderma* (Pers., 1794), podem inibir o crescimento do fungo simbionte *in vitro*, podendo ser tão agressivos quanto o parasita especializado ao jardim de fungos do gênero *Escovopsis* (SILVA et al., 2006). Este fungo é o mais frequente parasita dos ninhos da maioria dos gêneros de formigas cultivadoras de fungos, sendo altamente patogênico e capaz de destruir os jardins de fungos ocasionando a morte da colônia (CURRIE et al., 1999a). *Escovopsis* é considerado um micoparasita que secreta substâncias capazes de degradarem as células do fungo mutualista, absorvendo os nutrientes liberados (REYNOLDS e CURRIE, 2004). A transmissão de *Escovopsis* dá-se de forma horizontal, ocorrendo através de outros organismos visitantes dos ninhos das formigas-cortadeiras (CURRIE et al., 1999a).

Os jardins de fungos dos atíneos estão sob constante pressão de parasitismo por microrganismos que são competitivamente superiores ao fungo cultivado pelas formigas. Além disso, é de se esperar que características como a similaridade genética e elevada frequência de interações sociais entre indivíduos de uma mesma colônia, somadas às condições ambientais dos ninhos, tornem as formigas-cortadeiras alvos fáceis para organismos oportunistas (AUGUSTIN et al., 2011).

Alguns autores consideram que o fungo simbionte das formigas-cortadeiras é incapaz de apresentar defesas a outros microrganismos, e na ausência das formigas, podem sucumbir rapidamente (FISHER et al., 1996; ORTIZ e ORDUZ, 2000). Claramente, as estratégias de defesa das formigas-cortadeiras demonstram-se bastante efetivas, porém estas ainda não são completamente conhecidas. Acredita-se que as táticas de defesa empregadas pelas formigas-cortadeiras para controlar organismos associados aos seus ninhos podem ser divididas em dois grupos: um relacionado com as defesas frente aos contaminantes inespecíficos e outro grupo envolvendo mecanismos de defesa contra microrganismos especializados (CURRIE, 2001). Contaminantes inespecíficos são aqueles frequentemente em contato com as formigas, porém não estando intrinsicamente associados a elas, e considera-se que estes sejam controlados através da excreção de antibióticos presentes em glândulas mandibulares e metapleurais das próprias formigas (RODRIGUES, 2008). Além disso, as formigas mantêm a organização de seus ninhos pelo descarte de materiais que poderão ser fontes de contaminação, como partes vegetais exauridas, cadáveres de operárias, larvas, pupas e porções de seu fungo envelhecidas. Esse descarte é feito em uma câmara especial (câmara de lixo), hábito comum ao gênero *Atta*, ou em área externa ao ninho (CANALI, 2017).

Dentre os patógenos que podem ser encontrados nesses materiais estão fungos como *Trichoderma viride* (Pers., 1794), *Aspergillus flavus* (Link, 1809), *Fusarium* spp. e *Escovopsis* spp. (RODRIGUES, 2008; AUGUSTIN et al., 2011).

Quanto ao grupo de contaminantes específicos, como *Escovopsis,* as bactérias filamentosas presentes nos jardins-de-fungo das formigas-cortadeiras são responsáveis pelo controle desse micoparasita através da produção de substâncias que inibem seu crescimento, além de apresentarem papel protetor contra diversas doenças entomopatogênicas das formigas (CURRIE et al., 1999b; SCHULTZ, 1999, MUELLER, 2012).

Portanto, para que esses organismos consigam ocasionar um desequilíbrio e consequentemente desestruturar a colônia, é necessário que esses patógenos contornem os inúmeros mecanismos de defesa apresentados pelas formigas. Um maior entendimento sobre os sistemas de defesa das formigas-cortadeiras poderia obter informações que auxiliariam no desenvolvimento de uma nova estratégia de controle destes insetos-praga. Além disso, estudos aprofundados sobre como ocorre a proteção do fungo simbionte pelas formigas poderia gerar subsídios para a fabricação de novos antibióticos (AUGUSTIN, 2011).

2.3 MÉTODOS DE CONTROLE DE FORMIGAS-CORTADEIRAS E PERSPECTIVAS QUANTO À UTILIZAÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E ANTAGONISTAS

Atualmente, o controle das formigas-cortadeiras é realizado principalmente através do uso de iscas granuladas. Essas iscas contêm substâncias químicas em sua formulação que são tóxicas a esses insetos. A aplicação das iscas geralmente é realizada de maneira sistemática, mas pode ser feita de forma localizada, distribuindo-as somente onde os ninhos forem encontrados (REIS FILHO et al., 2015).

Os inseticidas mais utilizados no controle de formigas são o fipronil, a deltametrina e a sulfluramida, porém esses compostos não são biodegradáveis e podem causar efeitos tóxicos às espécies não alvo e poluir o solo e a água (YING e KOOKANA, 2006; GOOSEY, 2010). Portanto, pressões econômicas e ambientais têm feito com que produtores agrícolas e florestais busquem formas de otimização do controle químico, incentivando o desenvolvimento de novas tecnologias mais efetivas e sustentáveis para o controle de formigas-cortadeiras (NICKELE et al., 2013).

Outros métodos de controle podem ser empregados de forma integrada no combate às formigas-cortadeiras, como o controle cultural, controle mecânico, controle biológico, uso de plantas resistentes ou tóxicas e o uso de feromônios. No entanto, o controle químico é o único que possui tecnologia desenvolvida para uso em grande escala (ARAÚJO et al., 2003, BRITTO et al., 2016).

Na natureza, são inúmeros os organismos capazes de regular o crescimento populacional desses insetos, como predadores, parasitóides e microrganismos patogênicos, evidenciando que o controle biológico para esse grupo pode vir a ser a

alternativa de combate tão almejada. Atualmente, os resultados mais promissores encontrados em pesquisas que buscam o desenvolvimento de métodos de controle biológico foram obtidos através de isolados da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1915) (PINTO et al., 2003) e com fungos entomopatogênicos pertencentes aos gêneros *Beauveria* (Vuill., 1912), *Metarhizium* (Sorokīn, 1879) e *Trichoderma* (LOPEZ e ORDUZ, 2003; FOLGARAIT et al., 2020; STEFANELLI et al., 2021). Nos bioensaios em laboratório, os fungos *Beauveria*, *Metarhizium, Ophiocordyceps* (Petch, 1931) e *Trichoderma* mostraram-se patogênicos às formigas-cortadeiras do gênero *Atta* (SILVA et al., 2006; AUGUSTIN et al., 2011). Além dos fungos entomopatogênicos, os micoparasitas *Escovopsis* spp. e *Escovopsioides* spp., mostraram-se capazes de inibir significativamente o crescimento micelial do fungo *L. gongylophorus* (SILVA et al., 2006; HAIFIG, 2014). Apesar de todos esses resultados promissores em relação ao controle microbiano de formigas-cortadeiras, o método ainda não tem sido utilizado em cultivos (BRITTO et al., 2016), devendo-se à falta de tecnologias que permitam sua aplicação e que garantam sua efetividade no controle das formigas-cortadeiras.

A continuidade de pesquisas nessa área poderá abrir novas possibilidades no combate de formigas-cortadeiras (ARAÚJO et al., 2003), visto que as espécies que compõem a micofauna associada aos ninhos ainda não foram totalmente exploradas (HAIFIG, 2014), revelando a necessidade de que sejam realizados mais levantamentos, com diferentes espécies de formigas-cortadeiras, com o objetivo de encontrar novos inimigos naturais, capazes de contornar as barreiras de defesa das formigas-cortadeiras, possibilitando assim o desenvolvimento de uma tecnologia de controle mais sustentável e eficiente.

CAPÍTULO I

COMUNIDADE FÚNGICA ASSOCIADA A *Acromyrmex crassispinus* (FOREL, 1909) (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) E PROSPECÇÃO DE POTENCIAIS AGENTES BIOLÓGICOS PARA SEU CONTROLE

RESUMO

A formiga-cortadeira *Acromyrmex crassispinus* é considerada uma importante praga em plantios florestais no Brasil. Este trabalho teve por objetivo estudar a diversidade e composição de espécies fúngicas associadas a este inseto e seu fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus*, com ênfase na prospecção de possíveis agentes de controle biológico. Para isso, foram realizadas coletas dos fungos em ninhos situados em um plantio de pínus no município de Campo do Tenente, PR. Os ninhos foram submetidos, previamente, a dois tratamentos com isca-tóxica à base de sulfluramida (2,5 e 5 g), para que se tornassem mais suscetíveis ao desenvolvimento desses microrganismos. As coletas foram realizadas aos 7 e aos 15 dias, após as aplicações. As amostras de jardins de fungos e insetos mortos foram cultivadas em laboratório, colônias fúngicas resultantes foram purificadas e identificadas por sequenciamento genético. Foram identificados 195 isolados fúngicos, distribuídos em 29 famílias, 36 gêneros e 53 espécies, que apresentam diversos papéis ecológicos. Os gêneros mais frequentes foram *Trichoderma* (49,2%), *Penicillium* (13,8%), *Chaetomium* (6,2%) e *Fusarium* (3,6%). Não foi constatada diferença significativa na composição de espécies entre os tratamentos aplicados (ANOSIM: r = 0,01104, p = 0,3517), entretanto constatou-se que a aplicação de subdoses de isca formicida pode favorecer o desenvolvimento de fungos antagônicos às formigas-cortadeiras, bem como sua coleta, quando realizada aos 7 dias após a aplicação. Este é o primeiro estudo realizado voltado à prospecção de fungos com potencial antagônico e entomopatogênico a *A. crassispinus* e seu fungo simbionte no Brasil, relatando-se pela primeira vez a ocorrência de possíveis agentes de controle biológico associados a essa espécie: *Escovopsis weberi*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizomucor variabilis*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningiopsis* e *Trichoderma spirale*. Entretanto, estudos ainda precisam ser elaborados acerca da eficiência destes no controle de formigas-cortadeiras.

Palavras-chave: antagonistas, entomopatogênicos, diversidade de fungos, quenquém-de-cisco.

FUNGAL COMMUNITY ASSOCIATED WITH *Acromyrmex crassispinus* (Forel, 1909) (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) AND A SURVEY FOR POTENTIAL BIOLOGICAL CONTROL AGENTS

ABSTRACT

The leaf-cutting ant *Acromyrmex crassispinus* is considered an important pest in forest plantations in Brazil. This work aimed to study the diversity and composition of the fungal species associated with this insect and its symbiotic fungus, with an emphasis on prospecting for possible biological control agents. For this purpose, the fungi were collected from nests located in a pine plantation in Campo do Tenente, PR. The nests were previously submitted to two treatments with toxic bait based on sulfluramide (2.5 and 5 g), to make them more susceptible to the development of these organisms. Collections were performed at 7 and 15 days after applications. After collection, samples of fungus gardens and dead insects were cultivated in the laboratory. Fungal colonies were purified and identified by genetic sequencing. 195 fungal isolates were identified, distributed in 29 families, 36 genera and 53 species, which presented several ecological roles. There was no significant difference in species composition among the treatments applied (ANOSIM: r= 0,01104, p = 0,3517), however, it was observed that the application of sub-doses of toxic baits can favor the development of antagonistic fungi to leaf-cutting ants, as well as their collection, when performed seven days after application. This is the first study conducted to prospect fungi with antagonistic and entomopathogenic potential to *A. crassispinus* and its symbiont fungus in Brazil, reporting for the first time the occurrence of possible biological control agents associated with this species: *Escovopsis weberi*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizomucor variabilis*, *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningiopsis* and *Trichoderma spirale*. However, studies still need to be conducted on their efficiency in controlling leaf-cutting ants.

Keywords: antagonists, entomopathogenic, fungal diversity, quenquém-de-cisco.

1 INTRODUÇÃO

A microfauna associada aos ninhos de formigas-cortadeiras tem sido objeto de estudo de muitos cientistas, visto a complexidade das relações ecológicas observadas entre insetos, fungos e bactérias que ocorrem no interior das colônias (MÖELLER, 1893, FISHER et al., 1994; CURRIE et al., 1999a; RODRIGUES et al., 2005; RODRIGUES et al., 2009; GOFFRÉ e FOLGARAIT, 2018). Dentre essas relações, a mais conhecida é a simbiose entre o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* e formigas dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, na qual o fungo é cultivado pela colônia por meio da incorporação de material vegetal fresco, oriundo do corte de plantas. Este material é transportado para o interior dos ninhos e utilizado como substrato para o crescimento de *L. gongylophorus,* que por sua vez, desenvolve estruturas fúngicas ricas em açúcares denominadas gongilídios, fonte de alimento para as formigas (PAGNOCCA et al., 2011).

Em contraponto, relações antagônicas às formigas-cortadeiras e seu fungo simbionte também são relatadas, sendo que o principal exemplo é o micoparasitismo especializado sobre *L. gongylophorus* por espécies pertencentes ao gênero *Escovopsis,* fungo encontrado apenas em jardins de fungo cultivados por estes insetos (REYNOLDS e CURRIE, 2004).

Estudos acerca da estrutura e comunidade fúngica associada aos ninhos de formigas sugerem a existência de relações mutualísticas ainda desconhecidas pela ciência, estabelecidas entre as diferentes espécies de formigas-cortadeiras e microrganismos (RODRIGUES et al., 2009). Acredita-se que as diferentes espécies que compõem a microbiota de ninhos de formigas-cortadeiras auxiliam na degradação do material vegetal pelo fungo simbionte (BACCI et al., 1995; CARREIRO, 2000; CARREIRO et al., 2002; RODRIGUES et al., 2005) e ainda, na proteção das formigas contra infecções por fungos entomopatogênicos e micoparasitas (SANTOS et al., 2004; MUELLER, 2012).

Em razão disto, alguns destes estudos visam, além do levantamento da diversidade de espécies, explorar o potencial de utilização desses microrganismos quando constatados antagônicos às formigas-cortadeiras, como agentes de controle biológico desta praga, causadora de significativos danos para diversos cultivos (HUGHES et al. 2004; CARLOS et al., 2011; MARFETÁN e FOLGARAIT, 2017).

Contudo, estudos acerca da composição de espécies fúngicas associadas ao gênero *Acromyrmex* ainda são escassos em comparação ao gênero *Atta*, e até o momento, nenhuma pesquisa foi realizada com a espécie *Acromyrmex crassispinus*, considerada a principal espécie de formiga-cortadeira em plantios florestais, na região Sul do Brasil (RANDO e FORTI, 2005).

Dessa forma, este estudo teve por objetivo estudar a diversidade e composição de espécies fúngicas associadas a este inseto e seu fungo simbionte, com ênfase na prospecção de possíveis agentes de controle biológico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ÁREA DE ESTUDO E DEMARCAÇÃO DE NINHOS E TRATAMENTOS

Para a elaboração do estudo foram demarcados 30 ninhos adultos de *A. crassispinus,* em um plantio de *Pinus taeda* com três anos de idade, situado no município de Campo do Tenente (Paraná, Brasil, 25°59'27.7" S 49°38'15.0"W). O município situa-se na Microrregião Homogênea de Rio Negro, no segundo Planalto Paranaense, apresentando altitude média de 802 m acima do nível do mar e predomínio de solos Litólicos e Cambissolos. De acordo com o sistema de classificação de Köeppen, esta região apresenta clima subtropical úmido mesotérmico, com umidade relativa do ar média de 82,5% e temperatura média anual de 17 ºC (MCTPR, 2021).

Os ninhos foram submetidos a três tratamentos, compostos por dez ninhos cada, o tratamento controle T1, o qual não recebeu doses de isca formicida, o tratamento T2, submetido à aplicação de 2,5 g de isca formicida e o tratamento T3, submetido à aplicação de 5 g de isca formicida. A aplicação de subdoses de isca formicida foi empregada com o intuito de aumentar a suscetibilidade das colônias ao ataque de fungos entomopatogênicos e antagonistas e foram realizadas no mês de maio de 2019.

Para a confirmação da espécie de formiga, foram coletadas operárias maiores de cada ninho, as quais foram transferidas para frascos com álcool 70% e estas foram submetidas à montagem e identificação ao nível específico no Laboratório de

Entomologia Florestal da Embrapa Florestas, pelo uso de chaves de identificação propostas por Gonçalves (1961) e Forti et al. (2006).

2.2 COLETA DE JARDINS DE FUNGO E INSETOS

As avaliações ocorreram aos 7 e 15 dias, após a aplicação das iscas, quando foi realizada a abertura dos ninhos e a coleta de porções de aproximadamente 250 cm^3 do fungo simbionte em conjunto aos insetos, com o auxílio de uma pá-de-jardinagem recoberta por saco plástico estéril. Estas amostras foram acondicionadas em recipientes plásticos de 350 mL vedados e transportadas ao Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas.

Na primeira coleta (7 dias) e na segunda (15 dias) todos os ninhos foram cuidadosamente abertos para registrar a sobrevivência, por meio da atividade ou inatividade dos insetos, aos 7 e 15 dias após a aplicação das iscas. A coleta de amostras foi realizada em 5 ninhos de cada tratamento na primeira coleta e nos outros 5 ninhos de cada tratamento na segunda coleta, para evitar o estresse da retirada de parte da colônia ou possível remoção da rainha, caso a coleta fosse realizada em todos os ninhos aos 7 dias, totalizando assim 15 amostras de ninhos por coleta.

2.3 CULTIVO E ISOLAMENTO DAS COLÔNIAS FÚNGICAS

Em laboratório, foram repicadas 5 porções de cerca de 6 mm de diâmetro de jardim de fungo (livre de insetos) em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (batata, dextrose, ágar) preparado previamente conforme especificações do fabricante Kasvi®, sendo realizadas 5 repetições (placas), totalizando 25 porções repicadas de cada ninho.

Amostras de formigas mortas foram separadas do fungo simbionte e desinfestadas em álcool 70% por 30 s, imersas em água ultrapurificada e secas em papel filtro autoclavado. A seguir, as formigas foram inseridas em placas contendo meio BDA para cultivo de possíveis fungos entomopatogênicos, totalizando 25 indivíduos amostrados por ninho. As formigas que ainda se encontravam vivas, pertencentes ao tratamento controle, foram mortas pela imersão em álcool 70% por

três min, imersas em água ultrapurificada e secas em papel filtro autoclavado e posteriormente inseridas nas placas contendo meio BDA.

As placas contendo porções de jardim de fungo e formigas foram mantidas em temperatura de 25 ºC, em câmara BOD com umidade relativa do ar acima de 80% e fotofase de 12 h. Após 7 dias, as colônias fúngicas oriundas das porções de jardim de fungo foram purificadas por meio da repicagem de um fragmento do micélio puro para novas placas contendo meio BDA, mantendo-as nas mesmas condições de temperatura e umidade anteriores. Colônias fúngicas coletadas dos cadáveres de formigas foram purificadas da mesma forma, após 14 dias de desenvolvimento.

2.4 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

Para a identificação preliminar dos isolados fúngicos, foram observadas características macro e micromorfológicas das colônias por meio da confecção de lâminas semipermanentes para cada isolado. Para a confecção, estruturas fúngicas foram montadas em lâminas, coradas com solução de lactoglicerol com azul de metileno e recobertas por lamínulas. A observação das estruturas em microscópio ótico possibilitou formar agrupamentos de isolados (morfotipos) por similaridade com o uso de chaves taxonômicas (SILVEIRA, 1981). Ao menos um representante de cada morfotipo foi submetido à identificação molecular.

2.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E CONSERVAÇÃO DOS ISOLADOS

Para a identificação a nível de espécie, os isolados considerados distintos foram repicados em meio BDA. Após seu desenvolvimento, 98 amostras foram submetidas à extração e sequenciamento de DNA. Tais procedimentos foram executados pela empresa de biotecnologia especializada em sequenciamento GoGenetic, localizada no Tecnoparque da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, utilizando os seguintes protocolos:

2.5.1 PURIFICAÇÃO DE DNA

Aproximadamente 150 mg de micélio foram utilizadas para extração de DNA com o kit Wizard Magnetic DNA Purification System (Promega), conforme recomendações do fabricante. O DNA foi quantificado e avaliado quanto à pureza em Nanodrop2000 (Thermo).

2.5.2 PCR CONVENCIONAL

A amplificação foi realizada em termociclador Veriti (Thermo), em reação contendo 20 ng de DNA genômico purificado. Para a região ITS (primers ITS1/ITS4) ou 18S (primers 566F/1200R), foram utilizados 32 ciclos de desnaturação (96 °C por 30 s), anelamento do primers (58 °C por 45 s) e extensão do produto (72 °C por 45 s). Os produtos foram analisados por eletroforese em agarose 1% (tampão TAE). As reações foram purificadas enzimaticamente com ExoI/SAP (Thermo), conforme recomendação do fabricante.

2.5.3 SEQUENCIAMENTO SANGER

Os produtos de PCR foram marcados com BigDye v3.1 (Thermo) conforme orientações do fabricante, em reação contendo 50 ng de DNA. Foram utilizados 35 ciclos de desnaturação (96 °C por 15 s), anelamento do respectivo primer (15 s à 58 °C) e extensão do produto (60 °C por 4 min) para marcação com terminadores fluorescentes. Os produtos marcados foram precipitados com 20% de acetato de amônio 7,5M e três volumes de etanol absoluto, e re-suspensos em 10 µL de HiDi-formamida. Essas amostras foram sequenciadas em Genetic Analyser 3500xL (Thermo), utilizando capilares de 50 cm com polímero Pop7 (Thermo), conforme orientações do fabricante. Os eletroforetogramas gerados foram convertidos em sequência de bases com o programa Sequencing Analysis v5.4 (Thermo).

As sequências resultantes de cada amostra foram comparadas ao banco de dados do NCBI através da ferramenta BLAST, possibilitando a identificação das espécies por similaridade. Por fim, procedeu-se o depósito dos isolados na Coleção de Fungos e Oomicetos Florestais, Laboratório de Patologia Florestal, Embrapa

Florestas, onde são preservados pelo método de Castellani. Os dados de sequências foram submetidos ao Genbank, com acessos MW533027-MW533068 e MW532971-MW533026.

2.5.4 ANÁLISE DOS DADOS

Para avaliar a ocorrência de espécies coletadas dos jardins de fungo e de insetos, foram calculadas as frequências e abundâncias individuais e totais, para cada tratamento. Para o estudo da composição de espécies, foi calculado o índice de diversidade de Shannon-Wiener (H) para cada tratamento, bem como a análise de escalonamento multidimensional não-métrica (NMDS), esta última utilizando-se dados de presença e ausência, empregando-se o índice de dissimilaridade de Bray-Curtis (BRAY e CURTIS, 1957). Para verificar diferenças na composição de espécies de fungos entre os tratamentos, os dados foram submetidos também ao teste de Análise de Similaridade (ANOSIM), utilizando o índice de dissimilaridade de Bray-Curtis com 9999 permutações, a fim de verificar diferenças estatísticas na composição de espécies entre os tratamentos. Ambas as análises foram executadas no software Paleontological Statistics PAST versão 4.03 (HAMMER et al., 2001). Também foram construídas curvas de interpolação/extrapolação da riqueza de espécies de fungos para cada tratamento utilizando-se a ferramenta iNEXT (HSIEH et al., 2016).

Para verificar o potencial de uso no controle biológico de *A. crassispinus*, os fungos foram classificados em quatro grupos funcionais: antagônicos, fitopatogênicos, entomopatogênicos e outros (saprofíticos ou grupos funcionais desconhecidos). A classificação foi baseada na ferramenta FUNGuild (NGUYEN et al., 2016), em conjunto com a consulta de literatura relacionada às formigas-cortadeiras.

3. RESULTADOS

2.4 DESCRIÇÃO DAS COMUNIDADES FÚNGICAS ASSOCIADAS A *Acromyrmex crassispinus* E ASPECTOS ECOLÓGICOS

O diâmetro dos ninhos de *A. crassispinus* avaliados foi de 52,2 ± 17,8 cm. Para os tratamentos T1, T2 e T3, o diâmetro dos ninhos foi de 49,9 ± 17,4 cm, 50,2 ±

19,4 cm, e 58,4 ± 17,0 cm, respectivamente, caracterizando a homogeneidade entre os tratamentos aplicados.

Após a aplicação das subdoses de isca formicida foi constatado o carregamento integral pelas formigas para o interior dos ninhos. Aos 7 e 15 dias após a aplicação das iscas, a avaliação de sobrevivência das colônias confirmou o efeito tóxico das subdoses utilizadas nos tratamentos T2 e T3, aos 7 dias todos os tratamentos apresentaram percentual de sobrevivência igual a 100% (embora tenha sido constatada o início da mortalidade de operárias), enquanto aos 15 dias após as aplicações os tratamentos T1, T2 e T3, apresentaram os percentuais de sobrevivência de 100, 20 e 10%, respectivamente. Como esperado, no tratamento controle (T1), não foi constatada mortalidade de ninhos.

Aos 7 dias foi observada a ocorrência de crescimento de fungos sobre o jardim de dois ninhos moribundos de *A. crassispinus* submetidos aos tratamentos T2 e T3. Aos 15 dias, três ninhos apresentavam crescimento micelial, sendo que dois destes haviam recebido a subdose de 5 g (FIGURA 1).

FIGURA 1 – CRESCIMENTO MICELIAL DE UM FUNGO ANTAGONISTA SOBRE O JARDIM DE FUNGO DE *Acromyrmex crassispinus* APÓS A APLICAÇÃO DE SUBDOSE DE ISCA FORMICIDA.

FOTO: Reis Filho (2019).

Na primeira coleta foram obtidos 111 isolados fúngicos e na segunda 84, resultando em um total de 195 isolados. Desse total, 145 foram oriundos das amostras de jardim de fungos e 50 dos cadáveres de *A. crassispinus*. Quanto aos tratamentos, as duas coletas totalizaram 62 isolados fúngicos coletados em T1, 88 em T2 e 45 em T3, as médias de isolados por tratamento foram de 6,2 ± 3,4 em T1, 8,8 ± 6,1 em T2 e 4,5 ± 2,5 em T3.

Ao todo foram identificadas 53 espécies de fungos associados a *A. crassispinus*, distribuídas em 29 famílias e 36 gêneros. Foram identificadas 38 espécies provindas das amostras de jardim de fungo e 24 dos cadáveres (TABELA 1). Observou-se a ocorrência exclusiva de 29 espécies nas amostras provindas do jardim e 15 em insetos e nove espécies foram observadas em ambas as amostras. Em T1 foram observadas 29 espécies, sendo que 13 ocorreram apenas neste tratamento. Em T2 foram observadas 33 espécies, sendo 16 exclusivas a este tratamento, enquanto em T3 foram observadas 15 espécies e 5 exclusivas.

Esta distribuição pode ser observada no Diagrama de Venn (GRÁFICO 1), onde aferiu-se que 62,3% das espécies identificadas neste estudo puderam ser observadas no T2, enquanto 54,7% foram observadas no T1 e 28,3% no T3. Dentre os táxons de maior ocorrência destacam-se quatro gêneros: *Trichoderma* (96 isolados), *Penicillium* (27), *Chaetomium* (12) e *Fusarium* (7) conforme GRÁFICO 2.

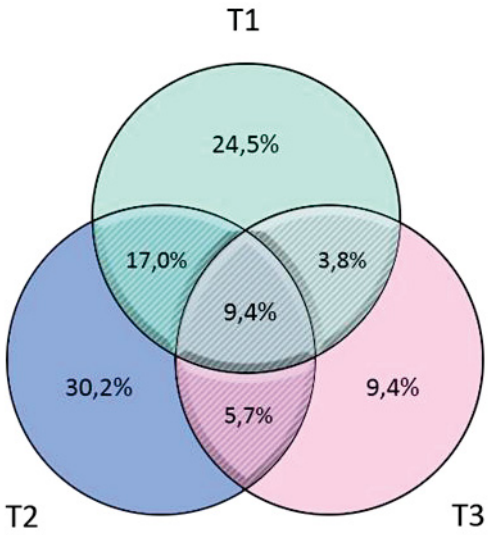
O gênero *Trichoderma* apresentou seis espécies, sendo que duas destas apresentaram maior abundância dentre as espécies identificadas neste estudo, *Trichoderma* sp. (28,7%) e *Trichoderma spirale* (13,8%), presentes nos três tratamentos e com alta frequência em amostras de jardins de fungo. *Trichoderma* sp. chegou a 90% de ocorrência em ninhos submetidos ao tratamento T2. Contudo, essa espécie foi observada em baixa frequência em insetos mortos (3,3%). *Trichoderma spirale,* por sua vez, foi identificada apenas em amostras de jardins de fungo. O número de isolados do gênero *Trichoderma* (96) contribuíram para que Hypocreaceae tenha demonstrado maior abundância entre famílias, em conjunto com isolados do gênero *Escovopsis*, representado pelas espécies *Escovopsis* sp. e *Escovopsis weberi*.

Quatro espécies compuseram o segundo grupo mais abundante, pertencente ao gênero *Penicillium*, destacando-se *Penicillium* sp. (8,7%) e *Penicillium fellutaneum* (4,1%). *Penicillium* sp. foi a espécie oriunda de insetos que apresentou maior frequência nos ninhos (30%). Sua ocorrência também foi constatada em amostras de jardim de fungos, embora em menor percentual. A espécie *P. fellutaneum* também se mostrou bastante frequente em insetos (20%), entretanto não foi identificada em amostras de jardins.

O terceiro e quarto grupos mais abundantes foram *Chaetomium* e *Fusarium*, destacando-se as espécies *Chaetomium* sp. (3,1%) e *Fusarium oxysporum* (2,6%). As demais espécies identificadas, em sua maioria, foram representadas por um único

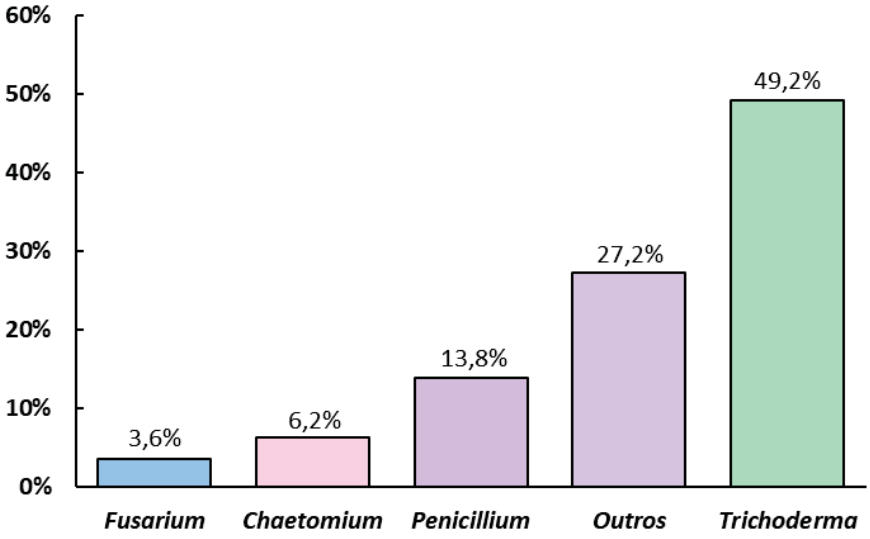
isolado, resultando em valores abaixo de 1% de representatividade em relação ao total de espécies identificadas (TABELA 1).

GRÁFICO 1 – DIAGRAMA DE VENN REPRESENTANDO O PERCENTUAL DE OCORRÊNCIA DE ESPÉCIES FÚNGICAS ASSOCIADAS A NINHOS DE *Acromyrmex crassispinus* SUBMETIDOS A TRÊS TRATAMENTOS (T1=CONTROLE, T2=2,5 g DE ISCA-FORMICIDA E T3=5 g DE ISCA-FORMICIDA).



FONTE: A autora (2021).

GRÁFICO 2 – REPRESENTATIVIDADE PERCENTUAL DOS GÊNEROS DE FUNGOS MAIS ABUNDANTES ASSOCIADOS A *Acromyrmex crassispinus*.



FONTE: A autora (2021).

TABELA 1 – LISTA DE ESPÉCIES DE FUNGOS ASSOCIADOS A *Acromyrmex crassispinus* E OCORRÊNCIA EM CADA TRATAMENTO E ORIGEM.

Família e espécie	T1		T2		T3		PTJ (%)	PTI (%)	PTN (%)	PRE (%)	GF
	Jardim	Inseto	Jardim	Inseto	Jardim	Inseto					
Aspergillaceae											
Aspergillus sp. Micheli ex Haller	-	10,0	-	-	-	-	-	3,3	3,3	0,5	A, P, E
Penicillium fellutanum Biourge	-	-	-	20,0	-	40,0	-	20,0	20,0	4,1	A, P, E
Penicillium janthinellum Biourge	-	-	-	-	-	10,0	-	3,3	3,3	0,5	O
Penicillium simplicissimum (Oudem.) Thom	-	-	10,0	-	-	-	3,3	-	3,3	0,5	O
Penicillium sp. Link	-	30,0	20,0	40,0	10,0	20,0	10,0	30,0	36,7	8,7	A
Aspiosporaceae											
Arthrinium phaeospermum (Corda) MB Ellis	10,0	-	-	-	-	-	3,3	-	3,3	0,5	O
Arthrinium sp. Kunze	10,0	-	20,0	10,0	-	-	10,0	3,3	10,0	2,1	O
Botryosphaeriaceae											
Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid.	-	-	10,0	-	-	-	3,3	-	3,3	0,5	P
Neofusicoccum parvum (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips	-	-	10,0	-	-	-	3,3	-	3,3	0,5	P
Ceratostomataceae											
Microthecium sp. Corda	-	-	-	-	10,0	-	3,3	-	3,3	0,5	P

(continua)

T1 – presença em percentual da espécie nos ninhos do tratamento controle T1, coletada em amostras de jardim-de-fungo ou de insetos. T2 – presença em percentual da espécie nos ninhos do tratamento T2 (2,5 g de isca-formicida), coletada em amostras de jardim-de-fungo ou de insetos. T3 – presença percentual da espécie nos ninhos do tratamento T3 (5 g de isca-formicida), coletada em amostras de jardim-de-fungo ou de insetos. PTJ – presença percentual da espécie nos três tratamentos, coletada em amostras de jardins-de-fungo. PTI – presença percentual da espécie em todos os tratamentos, coletada em insetos. PTT – presença percentual da espécie nos três tratamentos, coletadas em amostras de jardins-de-fungos e insetos. PRE – percentual de representatividade da espécie em relação ao total de espécies amostradas. GF – grupo funcional atribuído a espécie, onde A = antagônica, P = fitopatogênica, E = entomopatogênica e O = outra classificação (fungos saprofíticos ou com grupo trófico desconhecido).

Família e espécie	T1		T2		T3		PTJ (%)	PTI (%)	PTN (%)	PRE (%)	GF
	Jardim	Inseto	Jardim	Inseto	Jardim	Inseto					
Chaetomiaceae											
Chaetomium aureum Chivers	-	10,0	10,0	-	-	-	3,3	3,3	6,7	1,5	A
Chaetomium elatum Kunze	-	-	-	20,0	-	-	-	6,7	6,7	1,5	A
Chaetomium sp. Kunze	10,0	10,0	20,0	-	-	10,0	10,0	6,7	16,7	3,1	A
Humicola fuscoatra Traaen	-	-	10,0	-	-	-	3,3	-	3,3	0,5	O
Cucurbitariaceae											
Pyrenochaeta sp. De Not.	-	-	-	-	-	10,0	-	3,3	3,3	0,5	P
Cunninghamellaceae											
Absidia sp. Tiegh.	10,0	-	-	-	-	-	3,3	-	3,3	0,5	O
Cunninghamella elegans Lendn.	10,0	-	10,0	-	-	-	6,7	-	6,7	1,0	A
Davidellaceae											
Cladosporium sphaerospermum Penz.	-	10,0	-	-	-	10,0	-	6,7	6,7	1,0	A, E
Incertae sedis											
Fungal endophyte isolate 4769	-	-	20,0	-	-	-	6,7	-	6,7	1,0	O
Fungal sp. voucher Robert L.	10,0	-	-	-	-	-	3,3	-	3,3	0,5	O
Diaporthaceae											

(continua)

T1 – presença em percentual da espécie nos ninhos do tratamento controle T1, coletada em amostras de jardim-de-fungo ou de insetos. T2 – presença em percentual da espécie nos ninhos do tratamento T2 (2,5 g de isca-formicida), coletada em amostras de jardim-de-fungo ou de insetos. T3 – presença percentual da espécie nos ninhos do tratamento T3 (5 g de isca-formicida), coletada em amostras de jardim-de-fungo ou de insetos. PTJ – presença percentual da espécie nos três tratamentos, coletada em amostras de jardins-de-fungo. PTI – presença percentual da espécie em todos os tratamentos, coletada em insetos. PTT – presença percentual da espécie nos três tratamentos, coletadas em amostras de jardins-de-fungos e insetos. PRE – percentual de representatividade da espécie em relação ao total de espécies amostradas. GF – grupo funcional atribuído a espécie, onde A = antagônica, P = fitopatogênica, E = entomopatogênica e O = outra classificação (fungos saprofíticos ou com grupo trófico desconhecido).

Família e espécie	T1		T2		T3		PTJ (%)	PTI (%)	PTN (%)	PRE (%)	GF
	Jardim	Inseto	Jardim	Inseto	Jardim	Inseto					
Phomopsis sp. Sacc. & Roum.	20,0	-	10,0	-	-	-	10,0	-	10,0	2,1	P
Diatrypaceae											
Eutypella scoparia (Schwein.) Ellis & Everh.	-	-	-	10,0	-	-	-	3,3	3,3	0,5	P
Didymellaceae											
Epicoccum sp. Link	10,0	-	-	-	-	-	3,3	-	3,3	0,5	A, P
Stagonosporopsis cucurbitacearum (Fr.) Aveskamp, Gruyter & Verkley	-	10,0	-	-	-	-	-	3,3	3,3	0,5	P
Glomerellaceae											
Colletotrichum boninense Moriwaki, Toy. Sato & Tsukib.	-	-	10,0	-	-	-	3,3	-	3,3	0,5	P
Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Penz. E Sacc.	-	10,0	10,0	-	-	-	3,3	3,3	6,7	1,0	P
Hypocreaceae											
Escovopsis sp. JJ Muchovej & Della Lucia	10,0	-	10,0	-	-	-	6,7	-	6,7	1,0	A
Escovopsis weberi JJ Muchovej & Della Lucia	-	-	10,0	-	10,0	-	6,7	-	6,7	1,0	A

(continua)

T1 – presença em percentual da espécie nos ninhos do tratamento controle T1, coletada em amostras de jardim-de-fungo ou de insetos. T2 – presença em percentual da espécie nos ninhos do tratamento T2 (2,5 g de isca-formicida), coletada em amostras de jardim-de-fungo ou de insetos. T3 – presença percentual da espécie nos ninhos do tratamento T3 (5 g de isca-formicida), coletada em amostras de jardim-de-fungo ou de insetos. PTJ – presença percentual da espécie nos três tratamentos, coletada em amostras de jardins-de-fungo. PTI – presença percentual da espécie em todos os tratamentos, coletada em insetos. PTT – presença percentual da espécie nos três tratamentos, coletadas em amostras de jardins-de-fungos e insetos. PRE – percentual de representatividade da espécie em relação ao total de espécies amostradas. GF – grupo funcional atribuído a espécie, onde A = antagônica, P = fitopatogênica, E = entomopatogênica e O = outra classificação (fungos saprofíticos ou com grupo trófico desconhecido).

Família e espécie	T1		T2		T3		PTJ (%)	PTI (%)	PTN (%)	PRE (%)	GF
	Jardim	Inseto	Jardim	Inseto	Jardim	Inseto					
Trichoderma asperellum Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg	-	-	10,0	-	-	-	3,3	-	3,3	0,5	A
Trichoderma atroviride P. Karst.	-	-	-	10,0	-	-	-	3,3	3,3	0,5	A, E
Trichoderma harzianum Rifai	10,0	-	10,0	-	10,0	-	10,0	-	10,0	1,5	A, E
Trichoderma koningiopsis Samuels, C. Suarez & HC Evans	-	-	30,0	-	40,0	-	23,3	-	23,3	4,1	A
Trichoderma sp. Pers.	80,0	-	90,0	10,0	80,0	-	83,3	3,3	83,3	28,7	A
Trichoderma spirale Bissett	60,0	-	70,0	-	50,0	-	60,0	-	60,0	13,8	A
Hypoxylaceae											
Hypoxylon perforatum (Schwein.) Fr.	-	-	-	-	-	10,0	-	3,3	3,3	0,5	O
Lasiosphaeriaceae											
Cercophora sp. Fuckel	-	10,0	-	-	-	-	-	3,3	3,3	0,5	O
Lichtheimiaceae											
Rhizomucor variabilis Stchigel, Cano, Guarro & Alvarez	10,0	10,0	-	-	-	-	3,3	3,3	6,7	1,0	A, E
Melanconidaceae											

(continua)

T1 – presença em percentual da espécie nos ninhos do tratamento controle T1, coletada em amostras de jardim-de-fungo ou de insetos. T2 – presença em percentual da espécie nos ninhos do tratamento T2 (2,5 g de isca-formicida), coletada em amostras de jardim-de-fungo ou de insetos. T3 – presença percentual da espécie nos ninhos do tratamento T3 (5 g de isca-formicida), coletada em amostras de jardim-de-fungo ou de insetos. PTJ – presença percentual da espécie nos três tratamentos, coletada em amostras de jardins-de-fungo. PTI – presença percentual da espécie em todos os tratamentos, coletada em insetos. PTT – presença percentual da espécie nos três tratamentos, coletadas em amostras de jardins-de-fungos e insetos. PRE – percentual de representatividade da espécie em relação ao total de espécies amostradas. GF – grupo funcional atribuído a espécie, onde A = antagônica, P = fitopatogênica, E = entomopatogênica e O = outra classificação (fungos saprofíticos ou com grupo trófico desconhecido).

Família e espécie	T1		T2		T3		PTJ (%)	PTI (%)	PTN (%)	PRE (%)	GF
	Jardim	Inseto	Jardim	Inseto	Jardim	Inseto					
Melanconis alni Tul. & C. Tul.	-	-	10,0	-	-	-	3,3	-	3,3	0,5	P
Meruliaceae											
Bjerkandera sp. P. Karst.	-	-	-	10,0	-		-	3,3	3,3	0,5	O
Mucoraceae											
Mucor fragilis Bainier	-	10,0	-	10,0	-	-	-	6,7	6,7	1,0	A, P
Mucor sp. Fresen	-	-	10,0	-	-	-	3,3	-	3,3	0,5	O
Nectriaceae											
Fusarium oxysporum Schltdl.	-	30,0	-	-	-	20,0	-	16,7	16,7	2,6	A, P, E
Fusarium sp. Link	10,0	-	10,0	-	-	-	6,7	-	6,7	1,0	A, P, E
Peniphoraceae											
Peniophora pithya (Pers.) J. Erkss.	-	-	-	10,0	-	-	-	3,3	3,3	0,5	P
Pleosporaceae											
Alternaria sp. Nees	10,0	-	-	-	-	-	3,3	-	3,3	0,5	P
Polyporaceae											
Tinctoporellus epimiltinus (Berk. & Broome) Ryvarden	-	10,0	-	-	-	-	-	3,3	3,3	0,5	P

(continua)

T1 – presença em percentual da espécie nos ninhos do tratamento controle T1, coletada em amostras de jardim-de-fungo ou de insetos. T2 – presença em percentual da espécie nos ninhos do tratamento T2 (2,5 g de isca-formicida), coletada em amostras de jardim-de-fungo ou de insetos. T3 – presença percentual da espécie nos ninhos do tratamento T3 (5 g de isca-formicida), coletada em amostras de jardim-de-fungo ou de insetos. PTJ – presença percentual da espécie nos três tratamentos, coletada em amostras de jardins-de-fungo. PTI – presença percentual da espécie em todos os tratamentos, coletada em insetos. PTT – presença percentual da espécie nos três tratamentos, coletadas em amostras de jardins-de-fungos e insetos. PRE – percentual de representatividade da espécie em relação ao total de espécies amostradas. GF – grupo funcional atribuído a espécie, onde A = antagônica, P = fitopatogênica, E = entomopatogênica e O = outra classificação (fungos saprofíticos ou com grupo trófico desconhecido).

Família e espécie	T1		T2		T3		PTJ (%)	PTI (%)	PTN (%)	PRE (%)	GF
	Jardim	Inseto	Jardim	Inseto	Jardim	Inseto					
Schizoparmaceae											
Coniella wangiensis (Crous & Summerell) LV Alvarez & Crous	-	-	10,0	-	-	-	3,3	-	3,3	0,5	P
Sporocadaceae											
Pestalotiopsis sp. Steyaert	-	10,0	10,0	-	-	-	3,3	3,3	6,7	1,0	P
Seiridium sp. Nees	10,0	-	-	-	-	-	3,3	-	3,3	0,5	P
Strophariaceae											
Pholiota sp. (Fr.) P. Kumm.	10,0	-	-	-	-	-	3,3	-	3,3	0,5	O
Trichocomaceae											
Talaromyces sp. CR Benj.	-	-	-	-	10,0	-	3,3	-	3,3	0,5	A, P
Trichosphaeriaceae											
Nigrospora sphaerica (Sacc.) E.W. Mason	10,0	-	-	-	-	-	3,3	-	3,3	0,5	P
Umbelopsidaceae											
Umbelopsis sp. Amos e HL Barnett	-	-	10,0	-	-	-	3,3	-	3,3	0,5	O

(conclusão)

T1 – presença em percentual da espécie nos ninhos do tratamento controle T1, coletada em amostras de jardim-de-fungo ou de insetos. T2 – presença em percentual da espécie nos ninhos do tratamento T2 (2,5 g de isca-formicida), coletada em amostras de jardim-de-fungo ou de insetos. T3 – presença percentual da espécie nos ninhos do tratamento T3 (5 g de isca-formicida), coletada em amostras de jardim-de-fungo ou de insetos. PTJ – presença percentual da espécie nos três tratamentos, coletada em amostras de jardins-de-fungo. PTI – presença percentual da espécie em todos os tratamentos, coletada em insetos. PTT – presença percentual da espécie nos três tratamentos, coletadas em amostras de jardins-de-fungos e insetos. PRE – percentual de representatividade da espécie em relação ao total de espécies amostradas. GF – grupo funcional atribuído a espécie, onde A = antagônica, P = fitopatogênica, E = entomopatogênica e O = outra classificação (fungos saprofíticos ou com grupo trófico desconhecido).
FONTE: A autora (2021).

2.5 DIVERSIDADE E COMPOSIÇÃO DE ESPÉCIES DE FUNGOS ASSOCIADOS A *Acromyrmex crassispinus*

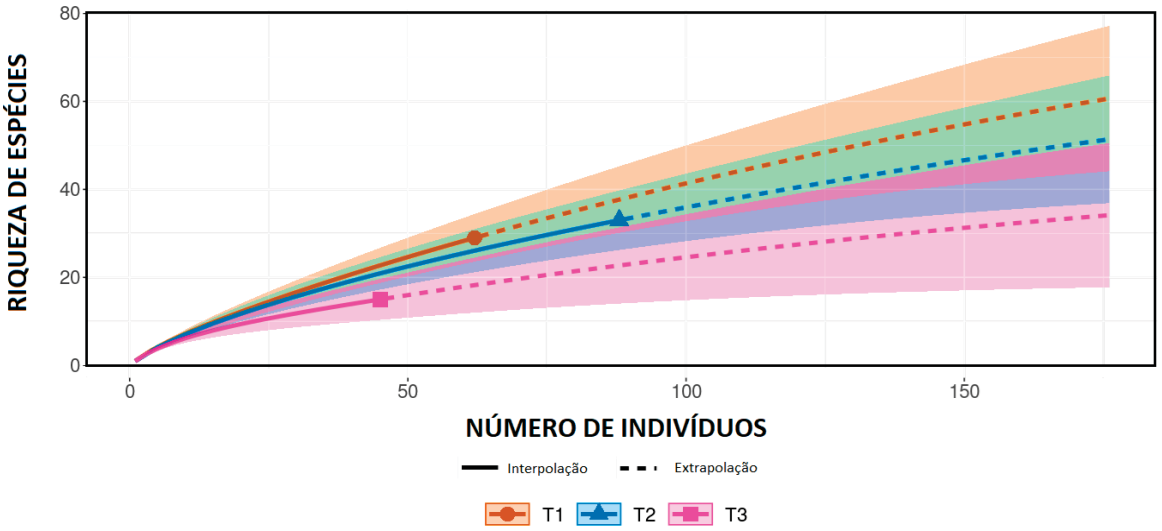
O índice de diversidade de Shannon-Wiener (H) calculado foi de 2,78, 2,80 e 2,19, para os tratamentos T1, T2 e T3, respectivamente, demonstrando a maior riqueza e diversidade de espécies nos tratamentos T1 e T2, sendo T2 o mais diverso. No entanto, a curva de interpolação/extrapolação da riqueza de espécies em relação ao número de indivíduos coletados sugere que, para o dobro do esforço amostral, a maior riqueza estaria associada ao T1, seguida por T2. Ainda, observa-se a ocorrência de sobreposição entre todos os tratamentos ao nível de intervalo de confiança de 0,95 (GRÁFICO 3), sugerindo que não há diferença na riqueza de espécies entre os tratamentos avaliados. A curva também sugere que um maior número de amostras seria necessário para abranger toda a riqueza fúngica associada às colônias de *A. crassispinus*. Confirmando estes resultados, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis constatou que não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p = 0,1312$).

Em relação à composição de espécies, também não houve diferença entre os tratamentos, pois a ordenação NMDS demonstrou que não foi possível estabelecer divisões entre os grupos devido a sobreposição da composição de espécies entre os tratamentos (GRÁFICO 4). Os resultados da Análise de Similaridade por sua vez, confirmam que não houve diferença significativa entre os tratamentos (ANOSIM: $r=0,01104$, $p=0,3517$). A comparação par a par também demonstrou não haver diferença na composição de espécies entre os tratamentos (T1 e T2: $p=0,653$; T1 e T3: $p=0,2141$; e T2 e T3: $p=0,3878$).

Em relação aos grupos funcionais verificou-se maior ocorrência de isolados entomopatogênicos nas amostras provindas de insetos mortos e maior ocorrência de isolados antagonistas nas amostras provindas do jardim de fungo. A coleta realizada aos 7 dias após a aplicação dos tratamentos proporcionou um maior número de isolados antagonistas e entomopatogênicos, quando comparada à coleta feita aos 15 dias (GRÁFICO 5). Em geral, o agrupamento funcional composto por antagonistas, antagonistas-fitopatogênicos e antagonistas-entomopatogênicos destacou-se por sua elevada abundância (79,5%). Apenas 12,3% dos isolados eram entomopatogênicos, enquanto 21,5% enquadraram-se nos grupos classificados como fitopatogênicos. Especificamente, o Tratamento 2 apresentou a maior abundância de isolados

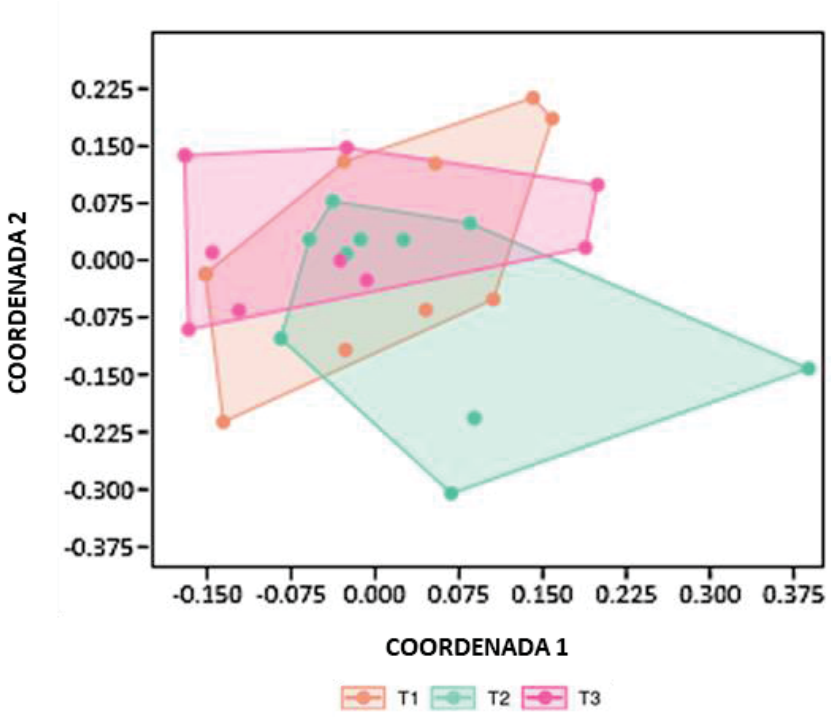
antagonistas, enquanto o Tratamento 3 apresentou um número de isolados entomopatogênicos moderadamente superior aos demais.

GRÁFICO 3 – CURVA DE INTERPOLAÇÃO/EXTRAPOLAÇÃO DE RIQUEZA DE ESPÉCIES EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE INDIVÍDUOS COLETADOS.



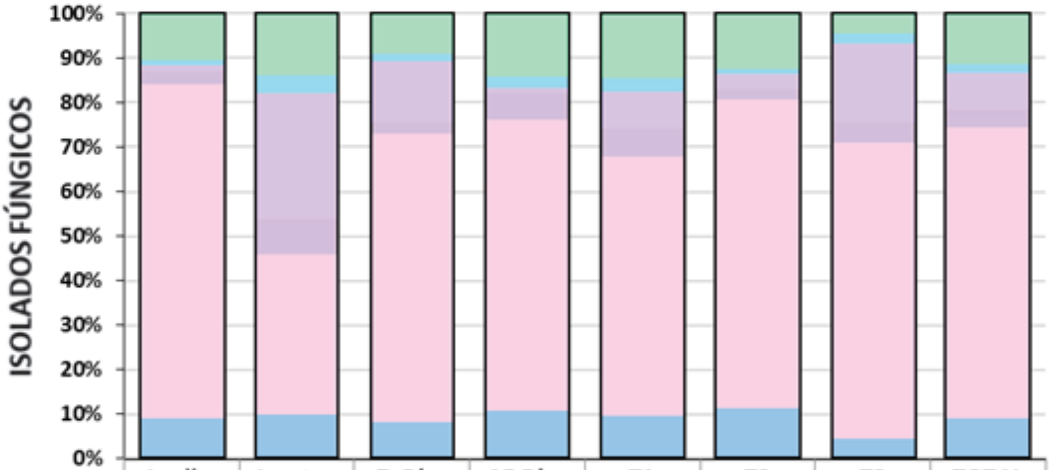
FONTE: A autora (2021).

GRÁFICO 4 – ESCALA MULTIDIMENSIONAL NÃO MÉTRICA (NMDS) COM BASE EM UMA MATRIZ DE DISSIMILARIDADE DE BRAY-CURTIS PARA COMUNIDADES FÚNGICAS ASSOCIADAS AOS NINHOS DE *Acromyrmex crassispinus* SUBMETIDOS A TRÊS TRATAMENTOS.



FONTE: A autora (2021).

GRÁFICO 5 – DISTRIBUIÇÃO DE ISOLADOS FÚNGICOS POR GRUPOS FUNCIONAIS DE ACORDO COM ORIGEM, COLETA E TRATAMENTOS APLICADOS, ONDE A=ANTAGONISTAS, P=FITOPATOGÊNICOS, E=ENTOMOPATOGÊNICOS, PODENDO SER COMBINADOS, E O=OUTRA CLASSIFICAÇÃO (SAPROFÍTICOS/CLASSIFICAÇÃO DESCONHECIDA).



	Jardim	Insetos	7 Dias	15 Dias	T1	T2	T3	TOTAL
P	15	7	10	12	9	11	2	22
A+P	2	2	2	2	2	1	1	4
A+P+E	2	14	15	1	5	3	8	16
A+E	4	4	3	5	4	2	2	8
A	109	18	72	55	36	61	30	127
O	13	5	9	9	6	10	2	18

FONTE: A autora (2021).

4 DISCUSSÃO

Este é o primeiro trabalho conduzido no Brasil que avaliou a composição e diversidade de fungos associados à ninhos da espécie *A. crassispinus* e o seu potencial de uso como agentes de controle biológico dessa importante praga dos plantios florestais da região Sul do Brasil. A simbiose entre *L. gongylophorus* e as formigas-cortadeiras depende, além da oferta de material vegetal fresco, de outras atividades por parte das formigas, como a limpeza de fungos antagonistas que possam prejudicar o desenvolvimento do jardim de fungo. A limpeza do ninho ocorre também em relação aos fungos entomopatogênicos, por meio do descarte de indivíduos infectados/mortos em câmaras de lixo ou em área externa ao formigueiro. Em razão disso, muitos estudos demonstraram que a ausência ou decréscimo da manutenção de jardins de fungo por estes insetos favorece o desenvolvimento de fungos filamentosos oportunistas (MÖLLER, 1893; WEBER, 1966; WEBER, 1972;

BASS e CHERRETT 1994; ORTIZ et al.,1999; RODRIGUES et al., 2005), como constatado no presente estudo.

A aplicação de subdoses de isca formicida não causou a morte dos ninhos nos primeiros 7 dias, no entanto foi suficiente para impactar negativamente a dinâmica de cultivo do fungo simbionte, devido à redução no número de trabalhadores e deterioração do jardim de fungo, acarretando a morte de 80% a 90% das colônias, aos 15 dias após aplicação da isca.

Vários fungos foram isolados das amostras de jardins de fungos e de insetos, sendo que o número maior de isolados foram obtidos de amostras do jardim. A maior ocorrência encontrada em jardins de fungo pode ser devida, principalmente, à elevada quantidade de nutrientes existente, resultante da atividade metabólica de *L. gongylophorus* sobre polissacarídeos das células vegetais (SILVA et al., 2003), que em sua maioria é composta por açúcares simples e que podem ser assimilados por outros microrganismos, quando não controlados pelas formigas (RODRIGUES et al., 2005). Isso também explica o decréscimo no número de isolados obtidos na segunda coleta, tendo sido observado um maior grau de deterioração das colônias em decorrência do maior tempo de exposição, após a aplicação das iscas. Alguns destes ninhos chegaram a apresentar a esponja fúngica totalmente exaurida. Da mesma forma, verificou-se que os ninhos que receberam a maior dose de isca, apresentaram o menor número de isolados, enquanto os ninhos que receberam a menor dose de isca, inversamente apresentaram o maior número de isolados, e os ninhos controle, um número intermediário de isolados.

Estes resultados indicam que a aplicação da subdose de 2,5 g em ninhos de *A. crassispinus* favorece a coleta de isolados fúngicos, sugerindo que a ação de danos às colônias ocorra de forma mais lenta em comparação a dose de 5 g, havendo a desestabilização das estratégias de defesa do formigueiro e o desenvolvimento desses microrganismos. Entretanto, somente a abundância de isolados fúngicos não é evidência suficiente para explicar se ocorrem alterações na composição das espécies que compõem o microbioma interno dos ninhos em decorrência da aplicação de iscas. Em razão disso, foram efetuadas análises estatísticas entre as comunidades fúngicas de cada tratamento. No entanto, não houve diferença significativa na riqueza e composição de espécies presentes em ninhos submetidos às subdoses de isca formicida. Um estudo semelhante, realizado com ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908), obteve resultados correlatos: a aplicação de iscas favoreceu o

desenvolvimento de fungos filamentosos sobre os jardins, porém a média da riqueza de espécies entre tratamentos não diferiu estatisticamente (CARLOS et al., 2011). Em um estudo sobre a diversidade da microbiota de colônias de formigas-cortadeiras do gênero *Acromyrmex* situadas em diferentes regiões da Argentina, a composição fúngica associada às formigas esteve estritamente relacionada à área geográfica onde se encontram estabelecidos os ninhos, não encontrando correlação entre a microbiota de ninhos de uma mesma espécie quando situados em diferentes regiões (MARFETÁN e FOLGARAIT, 2017). Comparando a biota entre ninhos de *Atta sexdens* (Linnaeus, 1758) de laboratório e campo, houve baixa similaridade de espécies entre ambas as amostras, sugerindo que para a mesma espécie de formiga-cortadeira, composições fúngicas diferentes podem ocorrer devido às condições em que os ninhos estão submetidos (RODRIGUES et al., 2005). Por fim, mudanças na composição fúngica de ninhos de *Atta cephalotes* (Linnaeus, 1758) ocorrem de acordo com os diferentes substratos vegetais incorporados (FISHER et al., 1996).

Estes resultados sugerem que a similaridade do material vegetal coletado por formigas-cortadeiras em conjunto com as variáveis relacionadas ao clima e solo de uma região são os fatores que determinam a composição e diversidade de fungos em ninhos de formigas-cortadeiras. Isto explica por que a composição fúngica não diferiu estatisticamente no presente estudo, visto que os ninhos avaliados se situavam próximos uns dos outros.

Os táxons mais abundantes encontrados associados à espécie *A. crassispinus* foram, em ordem decrescente: *Trichoderma*, *Penicillium*, *Chaetomium* e *Fusarium.* Espécies do gênero *Trichoderma* são comumente encontradas em ninhos de formigas-cortadeiras (CURRIE et al., 1999a; CURRIE et al., 1999b; RODRIGUES et al., 2005; RODRIGUES, 2008; CARLOS et al., 2011; MARFETÁN e FOLGARAIT, 2017), sendo o gênero predominante em muitos destes trabalhos. Estes fungos são considerados, em sua maioria, micoparasitas facultativos (KREDICS et al., 2014) e alguns trabalhos constataram seu antagonismo frente a *L. gongylophorus* (SILVA et al., 2006; CASTRILLO et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2017). A espécie *T. spirale* foi uma das mais abundantes no presente estudo. *Trichoderma spirale* também foi prevalente nos jardins de fungos de *Atta sexdens rubropilosa* e *Atta bisphaerica* (Forel, 1908) em São Paulo, Brasil (RODRIGUES et al., 2013), sendo indicada por Nascimento et al. (2017) como a espécie mais promissora para uso no controle de formigas-cortadeiras. Além de *Trichoderma*, a família Hypocreaceae contempla, neste

estudo, o gênero *Escovopsis*, sendo relatada pela primeira vez a ocorrência da espécie *E. weberi* associada aos jardins de fungo de *A. crassispinus*. Fungos do gênero *Escovopsis* são considerados micoparasitas especializados em jardins de fungo de formigas-cortadeiras (REYNOLDS e CURRIE, 2004). Marfetán et al. (2015), ao testarem a patogenicidade de seis isolados *E. weberi* frente a *L. gongylophorus*, concluíram que todos os isolados foram capazes de parasitar *L. gongylophorus.* Os autores ainda o caracterizaram como parasita biotrófico destrutivo, capaz de matar seu hospedeiro, o que demonstra que esta espécie possui potencial para ser utilizada no controle biológico de formigas cultivadoras de fungos.

Além do gênero *Trichoderma*, espécies de *Chaetomium*, *Penicillium* e *Fusarium* têm sido comumente encontradas associadas a ninhos de formigas-cortadeiras (RODRIGUES, 2008; CARLOS et al., 2011; MARFETÁN e FOLGARAIT, 2017). Estes fungos, por terem hábitos generalistas, incluem espécies que apresentam um amplo espectro ecológico, podendo desempenhar diversos papéis na natureza (saprófiticos, fitopatogênicos, endofíticos, micoparasitas antagonistas e entomopatogênicos). Dessa forma, podem ser encontrados no solo e em tecidos vegetais, aos quais formigas estão continuamente expostas, e acabam por carrear, involuntariamente, inóculos para o interior de seus ninhos.

Conforme esperado, potenciais fungos antagonistas foram obtidos em sua maioria de amostras dos jardins, enquanto potenciais entomopatogênicos foram coletados dos cadáveres das formigas. A coleta aos 7 dias após aplicação das iscas proporcionou um maior número de isolados de interesse. No entanto, algumas espécies classificadas como potenciais antagonistas também foram encontradas em cadáveres de formigas, como *Aspergillus* sp., *Mucor* spp., *F. oxysporum* e *Rhizomucor variabilis.* Sun et al. (2008) ao prospectarem fungos entomopatogênicos no solo, utilizando larvas como isca, classificaram estas espécies como patógenos oportunistas, visto que frequentemente são encontradas associadas a insetos. No entanto, a patogenicidade destes ainda não foi consolidada, quando comparada aos entomopatógenos clássicos, como *Beauveria* e *Metarhizium*.

No presente estudo, não foram encontradas espécies de *Beauveria* e *Metarhizium* associadas a *A. crassispinus,* entretanto, não é possível afirmar que estas não ocorram em ninhos dessa espécie. Em alguns trabalhos semelhantes, *Beauveria* e *Metarhizium* também não foram encontrados associados a outras formigas-cortadeiras (RODRIGUES et al., 2005; RODRIGUES et al., 2008),; em

contraste, outras pesquisas relataram a–ocorrência dos mesmos (RIBEIRO et al., 2012; MARFETÁN e FOLGARAIT, 2017; ANGELONE e BIDOCHKA, 2018). Presume-se que aspectos como a área de estudo, metodologia de coleta e cultivo de fungos são os principais fatores que determinam a composição de espécies fúngicas associadas às formigas-cortadeiras. Além disso, ao obterem poucos isolados entomopatogênicos de operárias de formigas-cortadeiras em seu estudo, Goffré e Folgarait (2018) sugerem que fungos entomopatógenos não teriam co-evoluído com os dois gêneros de formigas-cortadeiras, *Atta* e *Acromyrmex*.

Muitas espécies de fungos identificadas são consideradas patogênicas a espécies florestais, como *Alternaria* sp., *Colletotrichum* spp., *Fusarium* spp., *Macrophomina phaseolina*, *Neofusicoccum parvum*, *Pestalotiopsis* sp. e *Seiridium* sp. *Fusarium oxysporum* é um importante patógeno de sementes de *Pinus elliottii* (Engelm.) por causar o tombamento de mudas e podridões de raízes, doenças que acarretam a morte das plantas (HOMECHIN et al., 1986). Auer et al. (2001) citam que os danos causados por geadas, em plantios de pínus na região Sul do Brasil, podem ser agravados pelo desenvolvimento dos gêneros *Alternaria*, *Epicoccum* e *Cladosporium* encontrados no presente estudo. Isto demonstra uma relação entre a comunidade fúngica interna dos ninhos de *A. crassispinus* e o material vegetal utilizado no cultivo de seu simbionte, visto que alguns fitopatógenos e endófitos de pínus foram encontrados associados aos ninhos.

Em razão disso, infere-se que as formigas-cortadeiras poderiam atuar como agentes disseminadores de fungos fitopatogênicos em plantios florestais, salientando a importância de seu controle nestes plantios. Por outro lado, esta pesquisa também mostrou que as formigas também estão fortemente associadas às espécies de *Trichoderma*, cujo gênero é considerado o mais importante agente de controle biológico de doenças*,* incluindo o controle de patógenos que ocorrem na cultura do pínus, como *Armilaria* sp. e *Fusarium* spp. (SANTOS et al., 2019), o que demonstra a importância de estudos acerca da microfauna associada às formigas-cortadeiras para a prospecção de agentes de controle biológico.

5 CONCLUSÕES

A composição fúngica associada aos ninhos da espécie *A. crassispinus* no Brasil é descrita pela primeira vez neste estudo. Esta pesquisa apontou que a

composição fúngica associada aos ninhos de *A. crassispinus* é consideravelmente diversa, sendo que muitas das espécies identificadas possuem potencial para uso no controle de formigas-cortadeiras e seu fungo simbionte. No entanto, enfatiza-se que a real capacidade dos isolados de promoverem o controle de *A. crassispinus* e *L. gongylophorus* necessita ser verificada por meio de bioensaios de patogenicidade.

CAPÍTULO II

CONTROLE BIOLÓGICO DE *Acromyrmex crassispinus* COM FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E ANTAGONISTAS DE SEU FUNGO SIMBIONTE: UM ESTUDO PRELIMINAR

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a patogenicidade de isolados fúngicos de diferentes espécies, obtidos de insetos e jardins de fungo de *Acromyrmex crassispinus* e assim, eleger novos agentes de controle biológico para esta espécie de formiga-cortadeira. Para isso, foram realizados ensaios de patogenicidade com 50 operárias de *A. crassispinus* submetidas ao tratamento com suspensões de esporos de 10 possíveis fungos entomopatogênicos, e a mortalidade de operárias foi avaliada diariamente. Os ensaios de antagonismo foram realizados por meio do pareamento entre culturas do fungo simbionte de *A. crassispinus* (*Leucoagaricus gongylophorus*) e 19 potenciais fungos antagonistas, totalizando 10 repetições cada. Ao final de 14 dias, aferiu-se a inibição do crescimento das colônias. As distribuições de sobrevivência de operárias de *A. crassispinus* diferiram significativamente entre os tratamentos onde foram aplicados fungos ($p < 0,001$). As comparações por pares demonstraram que três isolados fúngicos mostraram-se patogênicos a operárias de *A. crassispinus,* diferindo estatisticamente dos tratamentos controle (*Rhizomucor variabilis* F10T1IA (Água+Tween, $p < 0,001$; Água, $p < 0,001$), *Trichoderma atroviride* F4T2VC (Água+Tween, $p < 0,001$; Água, $p < 0,001$) e *Fusarium oxysporum* F25T3IB (Água+Tween, $p = 0,005$; Água, $p = 0,001$). Onze isolados inibiram significativamente o crescimento micelial de *L. gongylophorus* ($p < 0,001$), destancando-se *Escovopsis weberi* N5T3IIA com a maior inibição (69,7%). Este estudo trouxe informações inéditas acerca do controle biológico de *A. crassispinus*. Comprovou-se o potencial *in vitro* de isolados fúngicos como entomopatogênicos e antagonistas de seu fungo simbionte. No entanto, mais estudos precisam ser conduzidos sobre a eficiência destes agentes em laboratório e a campo.

Palavras-chave: entomologia florestal, *Leucoagaricus gongylophorus*, micoparasita, quenquém-de-cisco.

BIOLOGICAL CONTROL OF *Acromyrmex crassispinus* WITH ENTOMOPATHOGENIC FUNGI AND ANTAGONISTS OF ITS SYMBIONT FUNGUS: A PRELIMINARY STUDY

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the pathogenicity of fungal isolates of different species obtained from insects and fungus gardens of *Acromyrmex crassispinus* and thus, to elect new biological control agents for this leafcutter ant species. For this purpose, pathogenicity tests were carried out with 50 workers of *A. crassispinus* submitted to treatment with spore suspensions of 10 possible entomopathogenic fungi, and mortality of workers was evaluated daily. The antagonism tests were performed by pairing cultures of the symbiotic fungus *of A. crassispinus* (*Leucoagaricus gongylophorus*) and 19 potential antagonistic fungi, totaling 10 repetitions each. After 14 days, inhibition of colony growth was measured. Analyses of the survival of *A. crassispinus* workers differed significantly among treatments ($p < 0.001$). Pairwise comparisons demonstrated that three fungal isolates were shown to be pathogenic to *A. crassispinus* workers, differing statistically from control treatments (*Rhizomucor variabilis* F10T1IA (Water+Tween, $p < 0.001$; Water, $p < 0.001$), *Trichoderma atroviride* F4T2VC (Water+Tween, $p < 0.001$; Water, $p < 0.001$) and *Fusarium oxysporum* F25T3IB (Water+Tween, $p = 0.005$; Water, $p = 0.001$). A total of 11 isolates significantly inhibited the mycelial growth of *L. gongylophorus* ($p < 0.001$). Among these, *Escovopsis weberi* N5T3IIA provided the highest inhibition of the symbiont fungus of *A. crassispinus* (69.7%). This study brought new information about the biological control of *A. crassispinus*. The *in vitro* potential of fungal isolates as entomopathogenics and antagonists of their symbiotic fungus was proven. However, more studies need to be conducted on the efficiency of these agents in the laboratory and in the field.

Keywords: forest entomology, *Leucoagaricus gongylophorus*, mycoparasite.

1 INTRODUÇÃO

As formigas-cortadeiras pertencentes aos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* são consideradas as principais pragas em plantios florestais no Brasil, devido ao corte de folhas e de outras partes vegetativas para cultivo de seu fungo mutualístico *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möeller. Seus danos às plantas podem acarretar em significativas perdas à silvicultura. Na região Sul do Brasil, *Acromyrmex crassispinus* Forel é a espécie de formiga-cortadeira mais comumente encontrada causando danos em plantios florestais (GUSMÃO; LOECK 1999; NICKELE et al. 2009; BURATTO et al. 2012). Atualmente, seu controle é feito por meio da aplicação de iscas tóxicas, formuladas principalmente a base de sulfluramida, que quando degradada transforma-se em uma substância tóxica aos animais e seres humanos, o PFOS (ácido perfluorooctanessulfônico), que pode persistir por centenas de anos na natureza (REIS et al., 2019). Em 2009, essa substância foi classificada como poluente orgânico persistente na Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgnânicos Persistentes. No entanto, ainda é aprovado o uso no combate às formigas-cortadeiras, em razão da inexistência de alternativas de controle (REIS et al., 2019; FURTADO, 2020), embora seu uso esteja sendo contestado pelos órgãos certificadores.

Em razão desses aspectos negativos, muitos esforços têm sido realizados em relação ao desenvolvimento de alternativas mais sustentáveis de controle dessa praga. Apesar de vários estudos terem sido feitos em relação a possíveis agentes de controle biológico de formigas-cortadeiras, tais como predadores e parasitoides, as pesquisas indicam que o uso de fungos entomopatogênicos apresenta-se como umas das alternativas de controle mais promissoras (BOARETTO; FORTI, 1997; VINHA et al. 2020).

Experimentos comprovando a alta patogenicidade por diversos isolados fúngicos foram relatados para cortadeiras do gênero *Atta* em condições de laboratório. Porém, em condições de campo, o método tem sido questionado por apresentar resultados de eficiência de controle muito variáveis. Isto deve-se às muitas estratégias de defesa apresentadas pelas formigas frente aos patógenos, ou ainda, os patógenos utilizados não são específicos para a praga alvo, havendo a necessidade de prospecção de novos agentes, considerando as diferentes espécies

existentes de formigas-cortadeiras e seus hábitos (KERMARRECK et al., 1986; BOARETTO; FORTI, 1997).

Embora *A. crassispinus* seja a espécie mais abundante em plantios florestais da região Sul do Brasil, poucos estudos têm sido realizados voltados ao controle biológico desta praga com o emprego de agentes entomopatógenos e antagônicos específicos para esta espécie e seu fungo simbionte. Em vista disso, o presente estudo tem por objetivo avaliar a patogenicidade de isolados fúngicos obtidos de insetos e jardins de fungo de *A. crassispinus* e eleger novos agentes de controle biológico para a espécie de formiga-cortadeira.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DOS INSETOS

No mês de julho de 2019, foi coletada uma colônia inteira de *A. crassispinus* em um plantio de *Pinus taeda* L., localizado no município de Campo do Tenente (Paraná, Brasil, 25°59'27.7" S 49°38'15.0"W) em um recipiente plástico de 3000 mL, com auxílio de uma pá-de-jardinagem. A colônia foi transportada para o Laboratório de Entomologia Florestal da Embrapa Florestas, Colombo, Paraná, Brasil, onde foi mantida em sala climatizada (24ºC e 80% UR) e suprida com material vegetal fresco (folhas e flores) até a execução dos bioensaios.

2.2 ORIGEM DOS ISOLADOS

Foram selecionados 22 isolados fúngicos de diversas espécies (TABELA 1), provenientes de ninhos de *A. crassispinus* e classificados como possíveis antagonistas de seu fungo simbionte e/ou entomopatogênicos. Dez isolados foram utilizados nos bioensaios de patogenicidade às operárias de *A. crassispinus* e 19 foram testados nos bioensaios de patogenicidade a *L. gongylophorus*. Os isolados estão depositados no acervo da Coleção de Fungos e Oomicetos Florestais da Embrapa Florestas, Colombo, PR, Brasil.

Para os bioensaios, realizou-se a reativação das colônias por meio do cultivo em placas de Petri contendo meio batata-dextrose-ágar-BDA (Kasvi®), preparado conforme especificações do fabricante. Para seu desenvolvimento, estas culturas foram mantidas em câmara BOD a 25 ºC e UR acima de 70%, fotoperíodo de 12 h,

pelo período de 14 dias. Ainda, *L. gongylophorus* foi isolado dos ninhos vindos do campo e repicado para os ensaios de co-cultivo, utilizando-se o mesmo meio de cultivo e mantidos a 25 ºC e UR acima de 70% em câmara BOD, no escuro.

TABELA 1 – ISOLADOS FÚNGICOS TESTADOS QUANTO À SUA PATOGENICIDADE A *Acromyrmex crassispinus* E ANTAGONISMO AO SEU FUNGO SIMBIONTE *Leucoagaricus gongylophorus*.

CÓD. ISOLADO	ESPÉCIE	BIOENSAIO	ORIGEM	LOCAL DE COLETA	ACESSO GENBANK
F7T1IA	*Aspergillus sp.*	Antagonismo e Entomopatogenicidade	Inseto	Campo do Tenente, Brasil	MW533029
N21T2IIA	*Chaetomium aureum*	Antagonismo	Jardim de fungo	Campo do Tenente, Brasil	MW533020
F17T2IIA	*Chaetomium elatum*	Antagonismo	Inseto	Campo do Tenente, Brasil	MW533058
N14T1IIA	*Cunninghamella elegans*	Antagonismo	Jardim de fungo	Campo do Tenente, Brasil	MW533030
F16T1IIIA	*Cladosporium sphaerospermum*	Entomopatogenicidade	Inseto	Campo do Tenente, Brasil	MW533018
N30T2VA	*Escovopsis weberi*	Antagonismo	Jardim de fungo	Campo do Tenente, Brasil	MW533006
N5T3IIA	*Escovopsis weberi*	Antagonismo	Jardim de fungo	Campo do Tenente, Brasil	MW533007
N7T1IIB	*Escovopsis sp.*	Antagonismo	Jardim de fungo	Campo do Tenente, Brasil	MW533011
F16T1IVA	*Fusarium oxysporum*	Antagonismo e Entomopatogenicidade	Inseto	Campo do Tenente, Brasil	MW533013
F25T3IB	*Fusarium oxysporum*	Entomopatogenicidade	Inseto	Campo do Tenente, Brasil	MW532977
F10T1IIA	*Mucor fragilis*	Antagonismo e Entomopatogenicidade	Inseto	Campo do Tenente, Brasil	MW532971
F23T3IIA	*Penicillium fellutanum*	Antagonismo e Entomopatogenicidade	Inseto	Campo do Tenente, Brasil	MW533004
F3T3IA	*Penicillium janthinellum*	Antagonismo	Inseto	Campo do Tenente, Brasil	MW533015
N21T2IVC	*Penicillium simplicissimum*	Antagonismo	Jardim de fungo	Campo do Tenente, Brasil	MW533003
F10T1IA	*Rhizomucor variabilis*	Antagonismo e Entomopatogenicidade	Inseto	Campo do Tenente, Brasil	MW533027
N30T2IVA	*Trichoderma asperellum*	Antagonismo	Jardim de fungo	Campo do Tenente, Brasil	MW532997
F4T2VC	*Trichoderma atroviride*	Antagonismo e Entomopatogenicidade	Inseto	Campo do Tenente, Brasil	MW532980
N15T1VB	*Trichoderma harzianum*	Antagonismo e Entomopatogenicidade	Jardim de fungo	Campo do Tenente, Brasil	MW532985
N14T1IVB	*Trichoderma koningiopsis*	Antagonismo e Entomopatogenicidade	Jardim de fungo	Campo do Tenente, Brasil	MW532982
N5T3IVA	*Trichoderma koningiopsis*	Antagonismo	Jardim de fungo	Campo do Tenente, Brasil	MW533001
N22T2IVB	*Trichoderma spirale*	Antagonismo	Jardim de fungo	Campo do Tenente, Brasil	MW532977

FONTE: A autora (2021).

2.3 BIOENSAIOS DE PATOGENICIDADE COM POSSÍVEIS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS A *Acromyrmex crassispinus* E ANÁLISES EMPREGADAS

A patogenicidade de dez isolados fúngicos foi testada em operárias de *A. crassispinus,* provenientes das colônias mantidas em laboratório pela imersão de operárias em suspensões de esporos. Para o preparo das suspensões foi realizada lavagem das colônias fúngicas com 10 mL de água ultrapurificada + *Tween* 80 a 0,05%, individualmente, com auxílio de uma alça de Drigalski seguida pela filtragem em gaze autoclavada (120 ºC, 1,5 atm por 20 min), agitação e homogeneização da suspensão manualmente. Após, procedeu-se à quantificação dos esporos em câmara de Neubauer, padronizando-se a concentração de $1x10^8$ esporos/mL para todos os isolados.

Os bioensaios foram confeccionados por meio da imersão de 50 operárias de *A. crassispinus* por tratamento, em 1,0 mL da suspensão de esporos por aproximadamente 10 s. O tratamento controle foi composto pela imersão de formigas em solução autoclavada (120 ºC, 1,5 atm por 20 min), de água ultrapurificada + *Tween* 80 a 0,05%. O processo de imersão deu-se em grupos de 10 indivíduos. Após a imersão, as formigas foram postas sobre papel-filtro autoclavado, para que fossem absorvidos os excessos do líquido, e posteriormente, em cinco grupos de dez, foram transferidas para placas de Petri estéreis. Foram administrados 3 mg de dieta sólida artificial para formigas-cortadeiras, conforme proposto por Bueno et al. (1997), e algodão embebido em água ultrapurificada, os quais foram repostos a cada 48 h.

As placas com insetos foram mantidas em incubadora simples (confeccionada artesanalmente em caixa de isopor com 40 mm de espessura e volume de 50 L, com uma lâmpada de 40 W, incandescente, recoberta com papel alumínio, cooler 12 v, fonte 12 v e termostato digital com sensor térmico W3001), no escuro, com temperatura média de 25 ºC ± 1,2 e UR 72.5% ± 7,3, aferidas por meio de um termohigrômetro digital Incoterm 7663, acoplado próximo ao sensor durante as avaliações de mortalidade. As avaliações foram realizadas diariamente, por 25 dias, conforme recomendação de Bueno et al. (1997) para a condução de bioensaios de patogenicidade.

Para confirmação da mortalidade pelos fungos, as formigas mortas foram desinfestadas em álcool 70%, enxaguadas em água ultrapurificada, secas sobre

papel filtro esterilizado e mantidas em câmara úmida plástica com papel filtro esterilizado umedecido, individualmente, por 10 dias na incubadora simples, para verificar a extrusão dos patógenos inoculados. Para as análises foram construídas curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier (KAPLAN e MEIER, 1958) e considerou-se o teste de Mantel-Cox (Log Rank) com correção de Bonferroni para comparar as distribuições de sobrevivência entre pares ($p < 0,05$). Também foram obtidas as medianas de sobrevivência (TL_{50}) para cada isolado. As análises foram realizadas no programa SPSS Statistics 22.0. (SPSS, Inc., Chicago, Illinois).

2.4 BIOENSAIOS COM POSSÍVEIS FUNGOS ANTAGONISTAS DO FUNGO SIMBIONTE DE *Acromyrmex crassispinus* E ANÁLISES EMPREGADAS

Matrizes do fungo *L. gongylophorus*, reativadas em meio BDA- Kasvi®, foram repicadas para o experimento de culturas pareadas. Para a confecção dos arranjos foi repicado um disco de micélio-ágar com 5 mm de diâmetro de *L. gongylophorus* com auxílio de um perfurador de cortiça. Cada disco foi depositado sobre uma placa de Petri contendo meio BDA-Kasvi® cerca de 20 mm de sua borda. As placas foram vedadas com plástico filme e cultivadas por 15 dias em câmara BOD a 25 ºC, 80% de UR, no escuro. Este período de tempo de cultivo foi empregado em função do lento crescimento de *L. gongylophorus* observado.

Dezenove isolados fúngicos foram reativados 15 dias antes da data de instalação do experimento, em meio BDA, mantidos em câmara BOD (25 ºC, UR 80% e fotoperíodo de 12 h). O pareamento de culturas se deu pela repicagem de discos de micélio-ágar com 5 mm de diâmetro dos isolados, dispostos a 20 mm de distância da borda da placa de Petri de forma oposta aos discos de *L. gongylophorus.*

Cada tratamento foi composto por dez repetições que foram mantidas em incubadora simples por 14 dias, no escuro, com temperatura média de 25 ºC ± 0,7 e UR 70,5% ± 5,4. As avaliações foram realizadas ao 1º, 3º, 5º, 7º, 10º e 14º dia, por meio da digitalização das placas em impressora scanner HP Deskjet F4480, com resolução de 300 dpi.

As áreas de crescimento em mm² das colônias de *L. gongylophorus* foram medidas utilizando o software ImageJ, e foi calculada a eficiência de crescimento de *L. gongylophorus* por meio da razão entre a área média inicial e final. Os dados foram submetidos à análise não paramétrica de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de Dunn (p

< 0,05) para a comparação par a par, com correção de Bonferoni. As análises foram realizadas no programa SPSS Statistics 22.0. (SPSS, Inc., Chicago, Illinois).

3 RESULTADOS

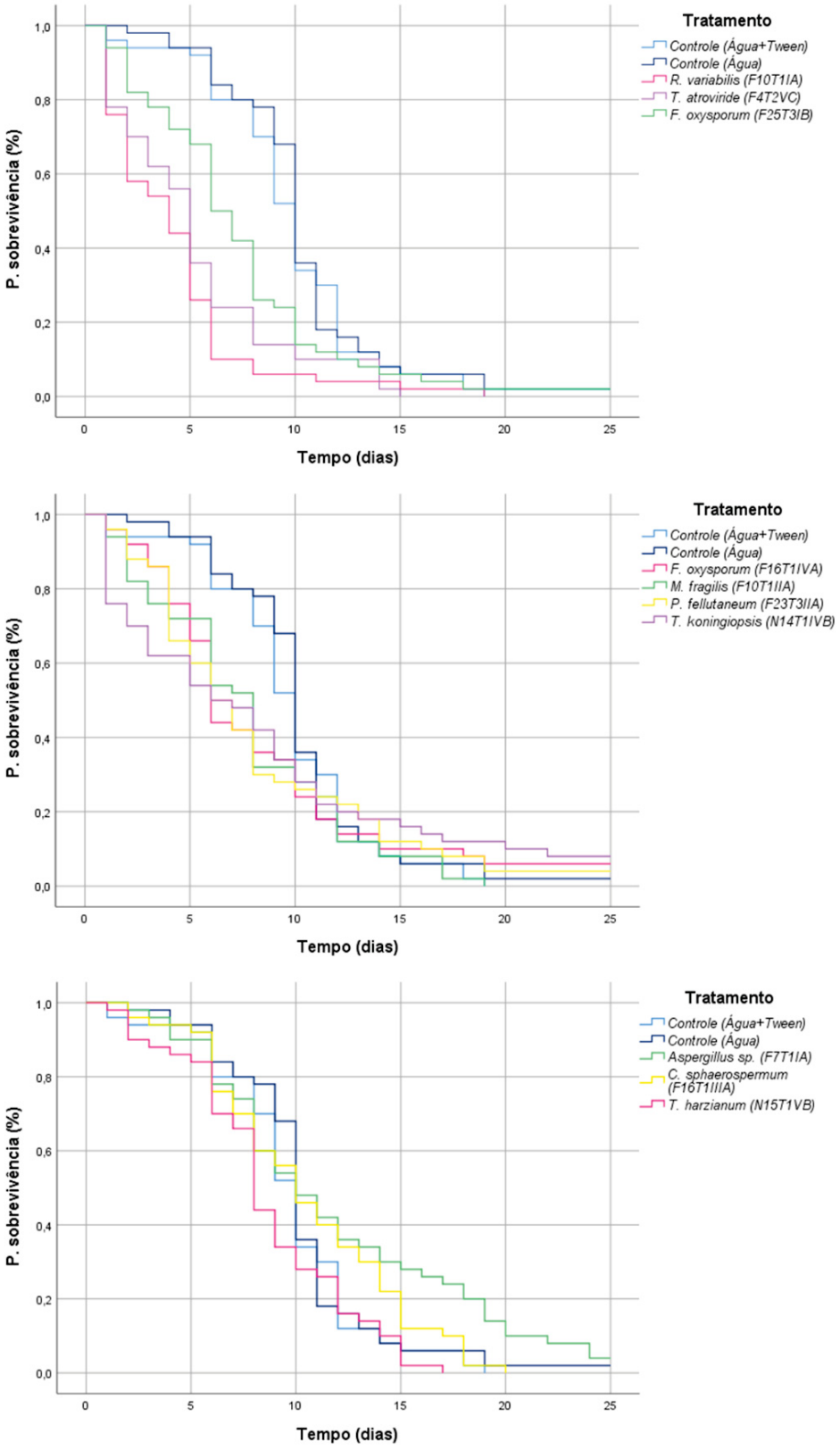
3.1 BIOENSAIOS COM POSSÍVEIS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS A *Acromyrmex crassispinus*

As distribuições de sobrevivência de operárias de *A. crassispinus* diferiram significativamente entre os tratamentos aplicados (X^2 = 108,565, p < 0,001). As comparações por pares demonstraram que dos dez isolados testados, três se mostraram patogênicos a operárias de *A. crassispinus,* diferindo significativamente dos tratamentos controle: *R. variabilis* F10T1IA (Água + Tween, p < 0,001; Água, p < 0,001), *T. atroviride* F4T2VC (Água + Tween, p < 0,001; Água, p < 0,001) e *F. oxysporum* F25T3IB (Água + Tween, p = 0,005; Água, p = 0,001). A distribuição de sobrevivência com aplicação do isolado *M. fragilis* F10T1IIA apresentou diferença estatística apenas quando comparada ao tratamento controle com água.

As curvas de Kaplan-Meier demonstram que os insetos que sofreram aplicação de *R. variabilis* apresentaram menor probabilidade de sobrevivência em relação aos demais tratamentos (GRÁFICO 1). Medianas de sobrevivência (GRÁFICO 2) demonstraram que *R. variabilis* F10T1IA foi o isolado responsável pelo menor tempo médio letal (TL_{50}), sendo este de quatro dias, enquanto os tratamentos controles Água+Tween e Água apresentaram ambos TL_{50} de 10 dias.

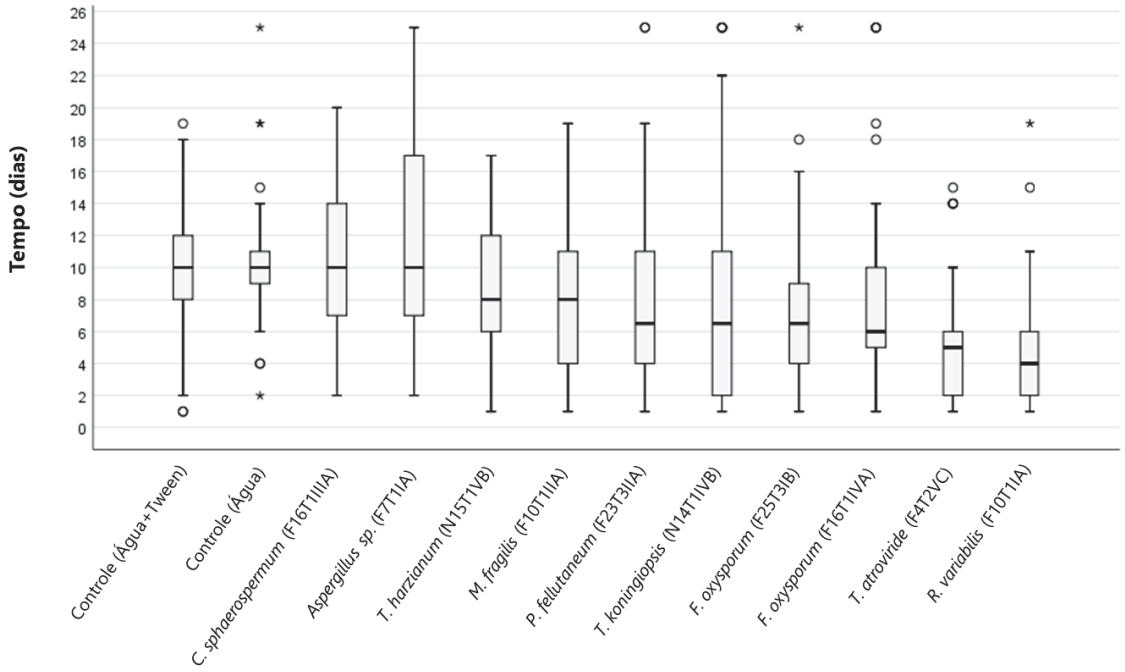
Ainda, a aplicação deste isolado provocou a mortalidade média acumulada de 90% das operárias de *A. crassispinus,* aos seis dias após sua inoculação.

GRÁFICO 1 – CURVAS DE PROBABILIDADE DA SOBREVIVÊNCIA DE OPERÁRIAS DE *Acromyrmex crassispinus* SUBMETIDAS A DIFERENTES ISOLADOS FÚNGICOS COM POTENCIAL ENTOMOPATOGÊNICO.



FONTE: A autora (2021).

GRÁFICO 2 – SOBREVIVÊNCIA MEDIANA (TL50) DE OPERÁRIAS DE *Acromyrmex crassispinus* SUBMETIDAS A DIFERENTES ISOLADOS FÚNGICOS COM POTENCIAL ENTOMOPATOGÊNICO.



FONTE: A autora (2021).

Os isolados *T. atroviride* F4T2VC e *F. oxysporum* F25T3IB apresentaram TL_{50} de cinco e seis dias, respectivamente. As maiores mortalidades médias acumuladas para estes dois isolados foram observadas ao oitavo dia após a inoculação, sendo de 86% e 74%, respectivamente.

Os demais isolados não apresentaram diferença significativa quando comparados aos tratamentos controle. Este comportamento pode ser verificado, também, pela sobreposição entre as curvas de Kaplan-Meier entre isolados e tratamentos controle (FIGURA 1).

Foram verificadas as seguintes extrusões de fungos sobre os cadáveres de *A. crassispinus*: *F. oxysporum* F16T1VA, *F. oxysporum* F25T3IB, *M. fragilis* F10T1IIA, *P. fellutaneum* F23T3IIA, *R. variabilis* F10T1IA, *T. atroviride* F4T2VC*, T. harzianum* N15T1VB e *T. koningiopsis* N14T1IVB.

TABELA 2 – PERCENTUAL MÉDIO DE MORTALIDADE *in vitro* DE OPERÁRIAS DE *Acromyrmex crassispinus* SUBMETIDAS A DIFERENTES ISOLADOS FÚNGICOS COM POTENCIAL ENTOMOPATOGÊNICO, NOS PRIMEIROS DEZ DIAS APÓS AS APLICAÇÕES.

TRATAMENTO	1º DIA	2º DIA	3º DIA	4º DIA	5º DIA	6º DIA	7º DIA	8º DIA	9º DIA	10º DIA
Controle (Água + Tween)	4,0 ± 5,5	6,0 ± 8,9	6,0 ± 8,9	6,0 ± 8,9	8,0 ± 8,4	20,0 ± 14,1	20,0 ± 14,1	30,0 ± 23,5	48,0 ± 21,7	66,0 ± 26,1
Controle (Água)	0,0 ± 0,0	2,0 ± 4,5	2,0 ± 4,5	6,0 ± 8,9	6,0 ± 8,9	16,0 ± 18,2	20,0 ± 18,7	22,0 ± 21,7	32,0 ± 13,0	64,0 ± 13,4
C. sphaerospermum (F16T1IIIA)	0,0 ± 0,0	4,0 ± 5,5	6,0 ± 5,5	6,0 ± 5,5	8,0 ± 4,5	24,0 ± 8,9	30,0 ± 10,0	40,0 ± 14,1	44,0 ± 11,4	54,0 ± 20,7
Aspergillus sp. (F7T1IA)	0,0 ± 0,0	2,0 ± 4,5	4,0 ± 5,5	10,0 ± 7,1	10,0 ± 7,1	22,0 ± 17,9	26,0 ± 18,2	40,0 ± 22,4	46,0 ± 21,9	52,0 ± 16,4
T. harzianum (N15T1VBTH)	2,0 ± 4,5	10,0 ± 10,0	12,0 ± 8,4	14,0 ± 8,9	16,0 ± 8,9	30,0 ± 18,7	34,0 ± 15,2	56,0 ± 18,2	66,0 ± 15,2	72,0 ± 16,4
T. koningiopsis (N14T1IVBTK)	24,0 ± 23,0	30,0 ± 28,3	38,0 ± 22,8	38,0 ± 22,8	46,0 ± 27,0	50,0 ± 23,5	52,0 ± 25,9	58,0 ± 31,1	66,0 ± 28,8	72,0 ± 25,9
M. fragilis (F10T1IIA)	6,0 ± 13,4	18,0 ± 26,8	24,0 ± 21,9	28,0 ± 26,8	28,0 ± 26,8	46,0 ± 28,8	48,0 ± 31,1	68,0 ± 22,8	68,0 ± 22,8	72,0 ± 17,9
P. fellutaneum (F23T3IIA)	4,0 ± 5,5	12,0 ± 17,9	14,0 ± 19,5	34,0 ± 25,1	40,0 ± 24,5	50,0 ± 21,2	58,0 ± 13,0	70,0 ± 17,3	72,0 ± 13,0	74,0 ± 8,9
F. oxysporum (F16T1IVA)	4,0 ± 5,5	8,0 ± 8,4	14,0 ± 5,5	24,0 ± 5,5	34,0 ± 8,9	56,0 ± 15,2	58,0 ± 16,4	64,0 ± 18,2	66,0 ± 15,2	76,0 ± 11,4
F. oxysporum (F22T3IB)	6,0 ± 8,9	18,0 ± 11,0	22,0 ± 8,4	28,0 ± 8,4	32,0 ± 13,0	50,0 ± 25,5	58,0 ± 19,2	74,0 ± 13,4	76,0 ± 15,2	86,0 ± 13,4
T. atroviride (F4T2VC)	22,0 ± 19,2	30,0 ± 18,7	38,0 ± 17,9	44,0 ± 18,2	64,0 ± 28,8	76,0 ± 27,9	76,0 ± 27,9	86,0 ± 16,7	86,0 ± 16,7	90,0 ± 12,2
R. variabilis (F10T1IA)	24,0 ± 32,1	42,0 ± 39,0	46,0 ± 35,8	56,0 ± 27,0	74,0 ± 16,7	90,0 ± 10,0	90,0 ± 10,0	94,0 ± 8,9	94,0 ± 8,9	94,0 ± 8,9

FONTE: A autora (2021).

3.2 BIOENSAIOS COM POSSÍVEIS FUNGOS ANTAGONISTAS DO FUNGO SIMBIONTE DE *Acromyrmex crassispinus* E ANÁLISES EMPREGADAS

Comparados ao tratamento controle, 11 isolados inibiram significativamente o crescimento micelial de *L. gongylophorus* ($p < 0,001$). Dentre estes, *E. weberi* N5T3IIA proporcionou a maior inibição do fungo simbionte de *A. crassispinus* (69,7%), enquanto o isolado *Aspergillus* sp. F7T1IA proporcionou a menor inibição observada (47,0%) (TABELA 3).

Os três isolados do gênero *Escovopsis* causaram a inibição no crescimento de *L. gongylophorus (*TABELA 3, FIGURA 1*).* No entanto, os isolados *Escovopsis* sp. N7T1IIB e *E. weberi* N30T2VA apresentaram percentuais de inibição menores em relação a *E. weberi* N5T3IIA, sendo de 62,2% e 61,7 respectivamente. No primeiro dia de avaliação foi observado que os isolados *E. weberi* N5T3IIA e N30T2VA haviam alcançado a colônia de *L. gongylophorus*. Além disso, observou-se o escurecimento do micélio de *L. gongylophorus* e do meio de cultura*,* quando pareado com estes isolados. Também foi verificada a degeneração gradual do micélio do fungo simbionte de *A. crassispinus* (FIGURA 1).

O segundo isolado que mais inibiu o crescimento de *L. gongylophorus* foi *T. atroviride* F4T2VC (65,1%). Dos seis isolados pertencentes ao gênero *Trichoderma,* apenas *T. spirale* N22T2IVB não causou inibição significativa no crescimento do fungo simbionte (29,4%). Os demais isolados causaram inibições que variaram de 65,1% a 50,5. O contato entre as hifas de todos os isolados de *Trichoderma* e *L. gongylophorus* ocorreram a partir do terceiro dia de avaliação, recobrindo as colônias do fungo simbionte (FIGURA 1).

O isolado *R. variabilis* F10T1IA apresentou o terceiro maior percentual de inibição do fungo simbionte (63,6%). *Mucor fragilis* F10T1IIA e *Aspergillus* sp. F7T1IA causaram inibições de 56,2% e 47,0% respectivamente.

Embora a eficiência de crescimento de *L. gongylophorus* pareado com os demais isolados não tenha sido significativa em relação ao tratamento controle, os isolados *C. elegans* (36,1%), *P. jathinellum* (30,3%) e *T. spirale* (29,4%) causaram grau moderado de inibição do fungo simbionte de *A. crassispinus*.

Chaetomium aureum N21T2IIA*, P. simplicissimum* N21T2IVC e *Fusarium oxysporum* F16T1IVA causaram percentuais de inibição abaixo de 17%, enquanto

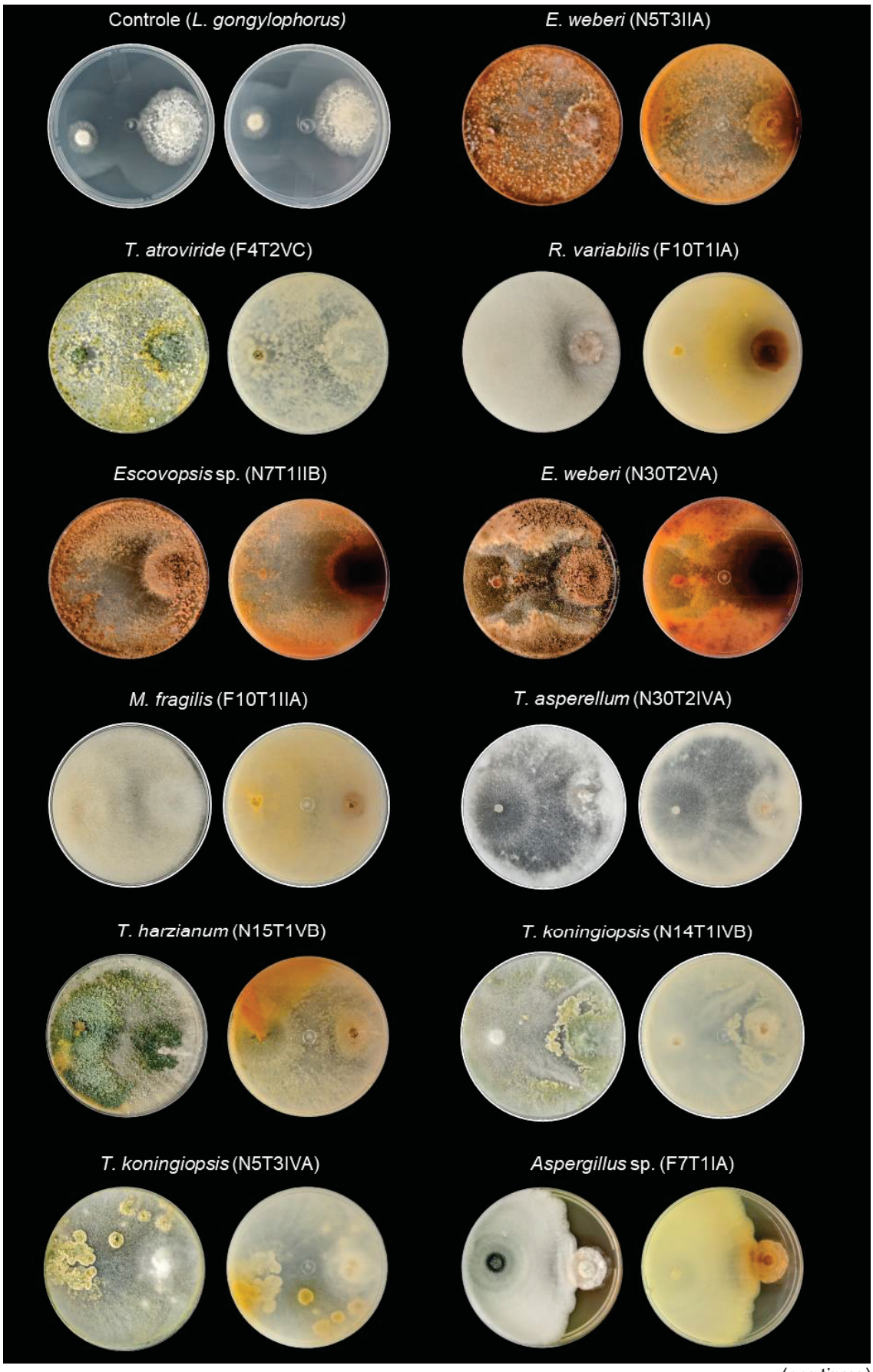
Penicillium fellutaneum N23T3IIA e *C. elatum* F17T2IIA apresentaram percentuais de inibição menores que 3%.

TABELA 3 – CRESCIMENTO MICELIAL DE *Leucoagaricus gongylophorus*, CULTIVADO PELAS FORMIGAS-CORTADEIRAS *Acromyrmex crassispinus*, NA PRESENÇA DE DIFERENTES FUNGOS FILAMENTOSOS.

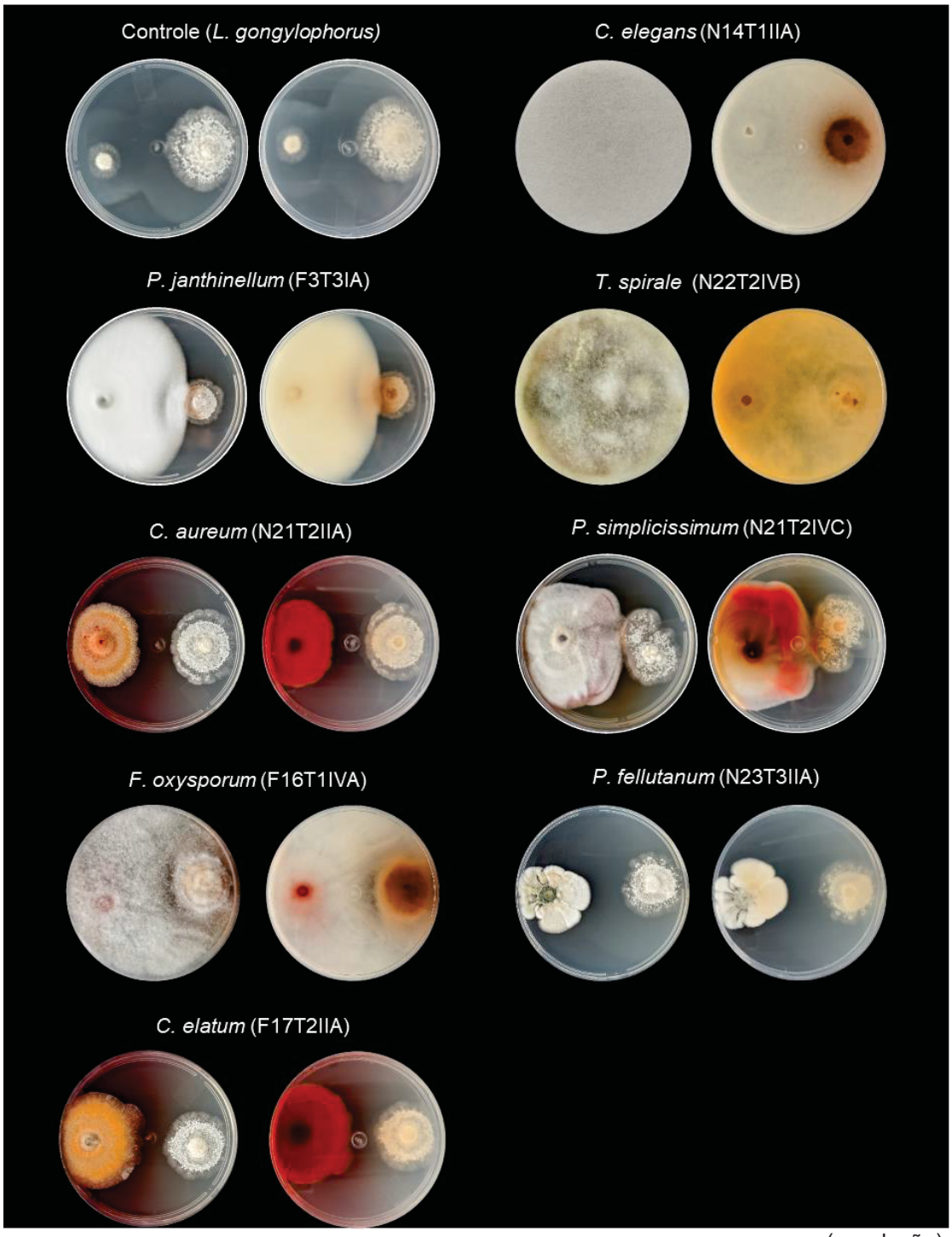
ISOLADO	ESPÉCIE	AI (mm²)[1]	AF (mm²)[2]	E[3]	ER[4]	IR (%)[5]
Controle	*L. gongylophorus*	405,28 ± 33,59	1087,49 ± 88,48	2,68	1	0
N5T3IIA	*E. weberi*	382,03 ± 27,79	310,74 ± 27,50	0,81*	0,3	69,7
F4T2VC	*T. atroviride*	404,27 ± 30,80	379,11 ± 27,51	0,94*	0,35	65,1
F10T1IA	*R. variabilis*	436,33 ± 12,15	426,58 ± 24,15	0,98*	0,36	63,6
N7T1IIB	*Escovopsis* sp.	428,41 ± 12,02	434,80 ± 29,87	1,01*	0,38	62,2
N30T2VA	*E. weberi*	447,19 ± 16,57	459,87 ± 31,55	1,03*	0,38	61,7
F10T1IIA	*M. fragilis*	440,25 ± 26,63	517,31 ± 37,26	1,18*	0,44	56,2
N30T2IVA	*T. asperellum*	410,86 ± 24,95	495,44 ± 63,77	1,21*	0,45	55,1
N15T1VB	*T. harzianum*	396,03 ± 16,65	482,86 ± 23,24	1,22*	0,45	54,6
N14T1IVB	*T. koningiopsis*	464,76 ± 74,67	603,85 ± 69,64	1,3*	0,48	51,6
N5T3IVA	*T. koningiopsis*	419,34 ± 14,58	556,64 ± 43,21	1,33*	0,49	50,5
F7T1IA	*Aspergillus sp.*	398,66 ± 15,58	567,16 ± 66,23	1,42*	0,53	47,0
N14T1IIA	*C. elegans*	443,98 ± 8,14	761,17 ± 71,72	1,71	0,64	36,1
F3T3IA	*P. janthinellum*	396,06 ± 33,46	740,53 ± 63,15	1,87	0,7	30,3
N22T2IVB	*T. spirale*	430,74 ± 22,56	816,29 ± 106,67	1,9	0,71	29,4
N21T2IIA	*C. aureum*	488,93 ± 9,33	1098,06 ± 15,85	2,25	0,84	16,3
N21T2IVC	*P. simplicissimum*	399,32 ± 23,25	922,32 ± 43,26	2,31	0,86	13,9
F16T1IVA	*F. oxysporum*	370,22 ± 20,33	888,58 ± 69,28	2,4	0,89	10,6
N23T3IIA	*P. fellutanum*	386,27 ± 15,05	1011,28 ± 136,25	2,62	0,98	2,4
F17T2IIA	*C. elatum*	365,70 ± 11,58	966,83 ± 30,27	2,64	0,99	1,5

[1]AI – Área inicial média (média ± desvio padrão)
[2]AF – Área final média (média ± desvio padrão)
[3]E – Eficiência de crescimento: E=AF/AI
[4]ER – Eficiência relativa: ER= E/EC
[5]IR – Inibição percentual relativa ao controle.
*Diferiu significativamente do tratamento controle (Teste de Kruskal-Wallis; p > 0,05).
FONTE: A autora (2021).

FIGURA 1 – Culturas pareadas do fungo simbionte de *Acromyrmex crassispinus*, (*Leucoagaricus gongylophorus,* à direita) aos 14 dias, e potenciais isolados antagonistas.



(continua)



(conclusão)

FOTOS: Autora (2021).

4 DISCUSSÃO

A entomopatogenicidade por isolados fúngicos a *A. crassispinus* foi comprovada pelos bioensaios com operárias *in vitro,* destacando-se os isolados *R. variabilis* F10T1IA, *T. atroviride* F4T2VC e *F. oxysporum* (F22T3IB). Além disso, o antagonismo ao fungo simbionte de *A. crassispinus* por alguns isolados foi confirmado, destacando-se isolados do gênero *Escovopsis* (N5T3IIA, N7T1IIB e N30T2VA), *T. atroviride* F4T2VC e *R. variabilis* F10T1IA.

Estes resultados são bastante interessantes, uma vez que dois destes isolados apresentaram duplo potencial no controle de *A. crassispinus* (*T. atroviride* F4T2VC e *R. variabilis* F10T1IA), podendo agir como entomopatógenos e antagonistas de seu fungo simbionte. Canali (2017), considerou que seria de grande interesse para o controle de formigas-cortadeiras a seleção de patógenos que sejam capazes de interferir em ambos os organismos (formigas e fungo simbionte) ao mesmo tempo.

Isolados de *Trichoderma* são frequentemente encontrados associados aos ninhos de formigas-cortadeiras (CURRIE et al., 1999a; CURRIE et al., 1999b; RODRIGUES et al., 2005; RODRIGUES, 2008; CARLOS et al., 2011; MARFETÁN e FOLGARAIT, 2017). Estudos concluiram que isolados de *Trichoderm*a apresentam comportamento antagônico a diversas espécies de fungos, incluindo *L. gongylophorus,* simbionte das formigas-cortadeiras (SILVA et al., 2006; CASTRILLO et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2017). Silva et al. (2006) verificaram em experimentos *in vitro*, a inibição de 75% do crescimento de *L. gongylophorus*, obtido do jardim de fungos de uma colônia de *Atta sexdens rubropilosa*, por um isolado de *T. harzianum*. Outros estudos também observaram a inibição do crescimento de *L. gongylophorus* por isolados de *T. koningiopsis* (69%) e *Trichoderma sp*. (57,9%) (CASTRILLO et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2017). Em razão disso, *Trichoderma* é considerado um potencial agente de controle biológico de formigas-cortadeiras por estes autores.

No presente estudo, os isolados de *Trichoderma* foram capazes de inibir significativamente o fungo simbionte de *A. crassispinus,* exceto *T. spirale* N22T2IVB, que não apresentou resultados significativos de inibição (29,4%), contrastando com os resultados obtidos por Nascimento et al. (2017), que constataram alta taxa de inibição de *L. gongylophorus* por um isolado de *T. spirale*.

As taxas de inibição de fungos alvo podem variar de acordo com o isolado utilizado. O isolado *T. spirale* N22T2IVB, por sua vez, apresentou baixa inibição a *L. gongylophorus,* mesmo originado de jardins de fungo de *A. crassispinus*, o que enfatiza a importância da realização de prospecção de agentes altamente promissores e específicos para controle de formigas-cortadeiras.

O antagonismo de fungos do gênero *Trichoderma* a fitopatógenos tornou este o principal agente de controle biológico de doenças de plantas conhecido (SANTOS et al. 2019). Entretanto, pouco se sabe sobre a capacidade patogênica destes fungos a insetos. Rodríguez-Gonzalez et al. (2016) verificaram que *T. atroviride* é capaz de infectar ovos de *Acanthoscelides obtectus* (Say), importante praga na cultura do feijoeiro, causando a inviabilização de 74,1% dos ovos deste inseto. Stefanelli et al. (2021) constataram que isolados de *T. harzianum* apresentaram alta patogenicidade às larvas de *Atta sexdens rubropilosa* em laboratório. No presente estudo, constatou-se a patogenicidade *in vitro* de *T. atroviride* F4T2VC às operárias de *A. crassispinus* e seu fungo simbionte, apresentando-se como um promissor candidato ao controle biológico de *A. crassispinus,* juntamente com os demais isolados de *Trichoderma* testados, que demostraram ser capazes de inibirem o crescimento de *L. gongylophorus*.

Além de *Trichoderma*, outros fungos antagônicos podem ser observados em jardins de fungo de formigas-cortadeiras, sendo *Escovopsis* um deles. Fungos do gênero *Escovopsis* são micoparasitas especializados em jardins de fungo de formigas-cortadeiras. Currie et al. (1999a) constataram que *Escovopsis* podem causar a morte de jardins de fungo de *Atta colombica* (Guérin-Méneville, 1844) 72 h após a infecção. A partir deste estudo, várias outras pesquisas foram realizadas acerca do potencial destes fungos como agentes de controle biológico de formigas-cortadeiras (REYNOLDS e CURRIE 2004; SILVA et al. 2006; FOLGARAIT et al. 2011; MARFETÁN et al. 2015; VARANDA-HAIFIG et al. 2017). Um destes estudos demonstrou que *Escovopsis* spp. podem causar inibições que chegam a 78% do crescimento de colônias de *L. gongylophorus* (VARANDA-HAIFIG et al. 2017).

Todos os isolados de *Escovopsis* testados no presente estudo foram capazes de inibir significativamente o crescimento do fungo simbionte de *A. crassispinus*, alcançando percentual de inibição por *E. weberi* entre 69,7 e 61,2%. O mesmo resultado foi observado por Silva et al. (2006), que ao testar cepas de *E. weberi* contra *L. gongylophorus* encontrou valores de inibição entre 68 e 43%. Folgarait et

al. (2011) e Varada-Haifig et al. (2017) também relataram variações de virulência entre isolados. Além disso, os mesmos autores notaram diferenças na coloração do meio de cultura e degeneração de o micélio do fungo simbionte, também observados no presente estudo. Em razão disso, considera-se que os isolados *E. weberi* N5T3IIA, N7T1IIB e *Escovopsis* sp. N30T2VA possuem potencial como antagonistas de *L. gongylophorus* cultivado por *A. crassispinus*.

Outro isolado bastante promissor encontrado foi *R. variabilis* F10T1IA, o qual apresentou atividade antagonista e entomopatogênica significativa às formigas-cortadeiras. Polezel (2017) demonstrou que a espécie *R. variabilis* possui caráter micoparasita a *L. gongylophorus* e também considerou este fungo promissor para o desenvovimento de um novo método de controle de formigas-cortadeiras. O presente estudo relata pela primeira vez o potencial entomopatogênico desta espécie. As análises apontaram que *R. variabilis* F10T1IA apresentou a atividade patogênica frente as formigas. Entretanto, a eficiência no controle de operárias de *A. crassispinus* foi quantificada apenas através da mortalidade efetiva ao 6º dia (70%), a qual subtrai o percentual observado no tratamento controle. A mortalidade confirmada, por sua vez, (contabilizada por meio da extrusão em cadáveres) não pôde ser avaliada, visto que além do isolados inoculados, outros fungos desenvolveram-se sobre os insetos mortos, impossibilitando a quantificação segura de extrusões causadas por este e os demais fungos testados. Assim, são necessários estudos mais aprofundados com esse isolado em operárias de *A. crassispinus*.

Fusarium oxysporum F25T3IB também apresentou atividade patogênica às operárias de *A. crassispinus.* O gênero *Fusarium* é frequentemente encontrado associado aos ninhos de formigas-cortadeiras e seus isolados considerados entomopatogênicos facultativos (RODRIGUES et al. 2008; MARFETÁN e FOLGARAIT, 2017; GOFFRÉ e FOLGARAIT, 2018). Também é patogênico a inúmeras culturas, agrícolas e florestais (SANTOS et al., 2019), o que tornaria desinteressante sua utilização no controle biológico de insetos, se comprovada a patogenicidade às plantas. Isolados de *F. oxysporum* testados não apresentaram inibição significativa do crescimento das colônias de *L. gongylophorus*.

Estudos com isolados de entomopatógenos consolidados, demostraram que *B. bassiana* apresentou tempo médio letal de quatro dias quando aplicado a operárias de *Atta bisphaerica* (RIBEIRO et al. 2012). *Purpureocillium lilacinum*

(Thom) causou a morte de metade das operárias de *Acromyrmex lundii* (Guérin-Méneville, 1838) após 6,5 dias de sua inoculação (GOFFRÉ e FOLGARAIT, 2015). Os dados do presente estudo demonstraram que os isolados *R. variabilis* F10T1IA, *T. atroviride* F4T2VC e *Fusarium oxysporum* F25T3IB são potencialmente patogênicos às formigas-cortadeiras tanto quanto as consideradas clássicas para o controle microbiano de insetos, com tempos letais iguais ou menores aos apresentados por estes estudos.

Outros fungos frequentemente associados às colônias de *A. crassispinus*, como *M. fragilis* e *Aspergillus* sp. mostraram ser significativamente antagônicos a *L. gongylophorus*. Com relação ao gênero *Mucor*, este já foi descrito infectando o jardim de fungos das formigas cortadeiras (RODRIGUES et al., 2008). *Aspergillus* por sua vez, apesar de também ser considerado um entomopatógeno oportunista, não apresentou decréscimo significativo na sobrevivência de operárias de *A. crassispinus* em relação aos tratamentos controle. Isso foi observado para a espécie *A. flavus,* quando testada em operárias de *Atta sexdens rubropilosa* (CANALI, 2017).

Demais isolados pertencentes às espécies *C. sphaerospermum*, *M. fragilis*, *P. fellutaneum*, *T. harzianum*, *T. koningiopsis*, *C. aureum*, *C. elatum*, *C. elegans*, *P. fellutanum*, *P. janthinellum* e *P. simplicissimum*, previamente considerados possíveis entomopatógenos ou antagonistas de *A. crassispinus,* não apresentaram atividade entomopatogênica no presente estudo.

Espécies dos gêneros *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Cunninghamella* e *Penicillium,* foram relatadas pelo estudo de Goffré e Folgarait (2018), que estudaram a comunidade fúngica associada às formigas-cortadeiras do gênero *Acromyrmex* na Argentina. Rodrigues et al. (2009) consideraram a espécie *C. ellegans* antagonista não-especializada a *L. gongylophorus.* No entanto, o isolado *C. elegans* N14T1IIA obtido de jardins de fungos de *A. crassispinus,* não mostrou resultado satisfatório para a inibição do fungo simbionte (36,1%). Ainda assim, foi observado que este isolado causou o escurecimento das colônias de *L gongylophorus,* o mesmo sendo observado para o isolado *F. oxysporum* F16T1IVA, que também não apresentou inibição signifitiva do crescimento de *L. gongylophorus.* Portanto, outros estudos precisam ser realizados para elucidar as interações ecológicas exercidas por estes fungos em ninhos de formigas-cortadeiras.

5 CONCLUSÃO

Este estudo preliminar trouxe informações inéditas acerca do controle biológico de *Acromyrmex crassispinus*. Comprovou-se o potencial *in vitro* de isolados fúngicos como entomopatogênicos e antagonistas de seu fungo simbionte *Leucoagaricus gongylophorus*. Os isolados *Trichoderma atroviride* F4T2VC, *Rhizomucor variabilis* F10T1IA e *Fusarium oxysporum* F25T3IB impactaram negativamente na sobrevivência de operárias de *A. crassispinus*, confirmando sua capacidade entomopatogênica. A capacidade antagônica a *L. gongylophorus* foi constatada para onze isolados fúngicos, destacando-se o isolado *E. weberi* N5T3IIA. *T. atroviride* F4T2VC e *R. variabilis* F10T1IA também foram capazes de inibir significativamente o crescimento de colônias de *L. gongylophorus*, indicando o duplo potencial desses agentes no controle biológico de *A. crassispinus.*

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O controle de formigas-cortadeiras assegura a produtividade de plantios florestais na América do Sul. Diante disso, o desenvolvimento de alternativas biológicas para o controle deste inseto faz-se imprescindível, uma vez que o mercado tem exigido cada vez mais a sustentabilidade da cadeia produtiva florestal. A prospecção é o primeiro passo a ser dado no desenvolvimento de um produto de controle biológico. O presente estudo obteve êxito na busca por isolados fúngicos entomopatogênicos e antagonistas ao fungo simbionte *de A. crassispinus*. Entretanto, enfatiza-se que novos estudos precisarão ser elaborados considerando-se o comportamento social do inseto e estratégias de defesa das colônias, para que haja avanço no desenvolvimento de uma alternativa biológica para o controle de formigas-cortadeiras.

REFERÊNCIAS

ANGELONE, S.; BIDOCHKA, M. J. Diversity and abundance of entomopathogenic fungi at ant colonies. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 156, p. 73-76, 2018.

ANJOS, N. S.; DELLA LUCIA, T. M. C.; MAYHÉ-NUNES, A. J. **Guia prático sobre formigas-cortadeiras em reflorestamento**. Ponte Nova-MG, Editora Graff Cor Ltda, 1998. 100p.

ANJOS, N.; MOREIRA, D. D. O.; DELLA LUCIA, T. M. C. Manejo integrado de formigas-cortadeiras em reflorestamentos. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed**.). As formigas-cortadeiras**. Viçosa: UFV, 1993. p. 212-241.

ARAÚJO, M. da S.; DELLA-LUCIA, T. M. C.; SOUZA, D. J. Estratégias alternativas de controle de formigas-cortadeiras. **Bahia Agrícola**, v.6, p.71-74, 2003.

AUER, C. G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; dos SANTOS, A. F. Doenças em pinus: identificação e controle. **Embrapa Florestas-Circular Técnica** (INFOTECA-E), 2001.

AUGUSTIN, J. O. Novas espécies de *Escovopsis*, sua dispersão e virulência na simbiose na simbiose Formigas Attini – *Leucoagaricus gongylophorus.* **Tese de doutorado**. 145p. 2011.

BACCI M. JR.; RIBEIRO S. B.; CASAROTTO, M. E. F.; PAGNOCCA F. C. Biopolymer-degrading bacteria from nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 28, n. 1, p. 79–82, 1995.

BASS, M.; CHERRETT, J. M. The role of leaf-cutting ant workers (Hymenoptera: Formicidae) in fungus garden maintenance. **Ecological Entomology**, v. 19, n. 3, p. 215-220, 1994.

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

BRAY, J. R.; CURTIS, J. T. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. **Ecological Monographs**, v. 27, n. 4, p. 325-349, 1957.

BRITTO, J. S. de; FORTI, L. C.; OLIVEIRA, M. A. de; ZANETTI, R.; WILCKEN, C. F.; ZANUNCIO, J. C.; LOECK, A. E.; CALDATO, N.; NAGAMOTO, N. S.; LEMES, P. G.; CAMARGO, R. da 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, O. C.; MORINI, M. S. C.; PAGNOCCA, F. C., HEBLING, M. J. A., SILVA, O. A. Sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) isoladas do formigueiro e alimentadas com dietas artificiais**. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 26, n. 1, p. 107-113, 1997.

BURATTO, D. A., CARDOSO, J. T., ROLIM, F. A.; REIS FILHO, W. Avaliação dos danos causados por formigas-cortadeiras do gênero *Acromyrmex* (Hymenoptera) aos plantios de *Pinus taeda* no planalto sul-catarinense. **Floresta**, v. 42, n. 4, p. 683-690, 2012.

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

CANALI, M. C. Prospecção de fungos entomopatogênicos para o controle biológico de formigas-cortadeiras**. Dissertação de Mestrado**. UNESP – Campus Rio Claro. 2017. 119p.

CARDOSO, S. R. S. Morfogênese de ninhos iniciais *de Atta* spp. (Hymenoptera: Formicidae), mortalidade em condições naturais e avaliação da ação de fungos entomopatogênicos. **Tese de Doutorado**. UNESP – Campus Botucatu, 2010. 160p.

CARLOS, A. A.; RODRIGUES, A.; FORTI, L. C.; PASSADOR, M. M.; SIERRA, J. F. Filamentous fungi found in *Atta sexdens rubropilosa* colonies after treatment with different toxic bait formulations. **Journal of Applied Entomology**, v. 135, n. 4, p. 326-331, 2011.

CARREIRO S. C.; PAGNOCCA F. C.; BACCI M. Jr.; BUENO O. C.; HEBLING, M. J. A.; MIDDELHOVEN, W. J. Occurrence of killer yeasts in leaf-cutting ant nests. **Folia Microbiologica**, v. 47, n. 3, p. 259-262, 2002.

CARREIRO, S. C. Pesquisa do fator killer e análise da degradação de polissacarídeos vegetais por leveduras associadas aos ninhos de *Atta sexdens*. **Tese de doutorado**. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2000. 153p.

CASTILHO, A. M. C. et al. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* patogênicos a soldados de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa* em condições de laboratório**. Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 6, p 1243-1249, 2010.

CASTRILLO, M. L.; BICH, G. A.; ZAPATA, P. D.; VILLALBA, L. Biocontrol of *Leucoagaricus gongylophorus* of leaf-cutting ants with the mycoparasitic agent *Trichoderma koningiopsis*. **Mycosphere**, v. 7, p. 810–819, 2016.

CHAVES-DA-COSTA, R. C. S. Aspectos da biologia de *Acromyrmex* (*Acromyrmex*) coronatus (Hymenoptera, Formicidade, Attini). **Dissertação de mestrado**. Universidade Estadual de São Paulo, Campus Rio Claro. 2017. 52p.

CURRIE, C. R. Ants, agriculture, and antibiotics. In: **Symbiosis**. Springer, Dordrecht. p. 685-699, 2001.

CURRIE C. R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 14, p. 7998-8002, 1999a.

CURRIE, C. R.; SCOTT, J. A.; SUMMERBELL, R. C.; MALLOCH, D. Fungus growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, London, v. 398, p. 701–704, 1999b.

DE GASPERI, A. J. **Formigas-cortadeiras, espécies e medidas de controle**. Porto Alegre: Secretaria de Agricultura, 1975. 31p.

DE GASPERI, A. J. **Formigas-cortadeiras**. Porto Alegre: Secretaria de Agricultura, 1963. 25p.

DELLA LUCIA, T. M. C. **As formigas-cortadeiras**. Viçosa: Sociedade de Investigação Florestal, 1993. 262p.

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

DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M. E.; SPECHT, A. *Beauveria bassiana* para controe biologio das formigas cortadeiras Acromyrmex spp. In: **SIMPOSIO DE CONTROLE BIOLOGICO**, 3., 1992.

DINIZ, E. A.; BUENO, O. C. Evolution of substrate preparation behaviors for cultivation of symbiotic fungus in Attine Ants (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Insect Behavior**, v. 23, p. 205–214, 2010.

FISHER, P. J.; STRADLING, D. J.; PEGLER, D. N. *Leucoagaricus* basidiomata from a live nest of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. **Mycological Research**, v. 98, n. 8, p. 884-888, 1994.

FISHER, P. J.; STRADLING, D. J.; SUTTON, B. C.; PETRINI, L. E. Microfungi in the fungus gardens of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*: a primary study. **Mycological Research**, v. 100, n. 5, p. 541–546, 1996.

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

FOLGARAIT, P.; GOROSITO, N.; POULSEN, M.; CURRIE, C. R. Preliminary in vitro insights into the use of natural fungal pathogens of leaf-cutting ants as biocontrol agents**. Current microbiology**, v. 63, n. 3, p. 250-258, 2011.

FORTI, L. C.; DE ANDRADE, M. L.; ANDRADE, A. P. P.; LOPES, J. F.; RAMOS, V. M. Bionomics and identification of *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae) through an illustrated key. **Sociobiology**, v. 48, n. 1, pág. 135-153, 2006.

FURTADO, R. X. de S. Estudo de degradabilidade do ácido perfluoro-octanossulfônico por fotocatálise e tratamento biológico anaeróbio: otimização, cinética, produtos de degradação e ecotoxicologia. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, São Carlos. 2020, 135 p.

GOFFRÉ, D.; FOLGARAIT, P. J. Insights into the biodiversity and causes of distribution of potential entomopathogens associated with leaf-cutting ants. **Insectes Sociaux**, v. 65, n. 1, p. 103-115, 2018.

GONÇALVES, C. R. O gênero *Acromyrmex* no Brasil (Hymenoptera: Formicidae). **Studia Entomologica**, v.4, p.113-180, 1961.

GOOSEY, E. R. Towards understanding the fate of perfluoroalkyl compounds (PFCs) within urban environments: implications for human exposure. **Tese de Doutorado**. University of Birmingham. 2010.

GUSMÃO, L. G.; LOECK, A. Distribuição geográfica de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae) na Zona Sul do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 5, n. 1, 1999.

HAIFIG, S. S. V. Natureza do parasitismo de *Escovopsis* e *Escovopsioides* sobre *Leucoagaricus gongylophorus*, fungos associados aos jardins de formigas-cortadeiras. **Dissertação de mestrado**. UNESP – Campus Rio Claro. 2014. 62p.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 9, 2001.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The leafcutter ants: civilization by instinct.** New York: W.W. Norton & Co., 2011. 160 p.

HOMECHIN, M; PIZZINATTO, M.A; MENTEN, J.O.M. Sanidade de sementes de *Pinus elliottii* var*. elliottii* e *Pinus taeda* e patogenicidade de *Fusarium oxysporum* em plântulas de *Pinus elliottii var. elliottii*. **Summa Phytopathologica**, v.12, p.102-112.1986.

HSIEH, T. C.; MA, K. H.; CHAO, A. iNEXT: an R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). **Methods in Ecology and Evolution**, v. 7, n. 12, p. 1451-1456, 2016.

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

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

KAPLAN, E. L.; MEIER, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. **Journal of the American statistical association**, v. 53, n. 282, p. 457-481, 1958.

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

KOST, C.; LAKATOS, T.; BÖTTCHER, I.; ARENDHOLZ, W. R.; REDENBACH, M.; WIRTH, R. Non-specific association between filamentous bacteria and fungus-growing ants. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 94, p. 821–828, 2007.

KREDICS, L; HATVANI, L; NAEIMI, S; KÖRMÖCZI, P; Biodiversity of the genus Hypocrea/*Trichoderma* in different habitats. In: Gupta, Schmoll, Herrera-Estrella A, Upadhyay RS, editors. **Biotechnology and biology of *Trichoderma***. Amsterdam: Elsevier; 2014. P. 3–24.

LINK, F. M.; LINK., D.; LINK, H. M. Atividade forrageadora da formiga preta pastadeira em Santa Maria - RS. 1 – Período maio a agosto de 1996. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA**, 16., 1997, Salvador – BA. Resumos... Salvador: Sociedade de Entomologia do Brasil, 1997. p. 216.

LINK, H. M.; LINK, F. M.; LINK, D. Controle da formiga-preta-pastadeira, *Acromyrmex crassispinus* com formicida em pó. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.10, n.1, 2000. p 45-56.

LOECK, A. E.; GRUTZMACHER, D. D. Caracterização morfológica das formigas do gênero *Acromyrmex* de maior ocorrência no estado do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 11, n. 4, 2005. p. 437-444.

LOECK, A. E.; GRUTZMACHER, D. D. **Ocorrência de formigas-cortadeiras nas principais regiões agropecuárias do Estado do Rio Grande do Sul**. Pelotas: Ed. Universitária/UFPel, 2001. 147 p.

LÓPEZ, E., ROMERO, M., ORTIZ, A., & ORDUZ, S. S. Primer registro de *Metarhizium anisopliae* infectando reinos de *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae) en Colombia. **Revista Colombiana de Entomologia**, Bogotá, v. 25, n. 1-2, p. 49-56, 1999.

LOPEZ, E.; ORDUZ, S. *Metarhizium anisopliae* and *Trichoderma viride* for control of nests of the fungus-growing ant, *Atta cephalotes*. **Biological Control**, v. 27, n. 2, p. 194-200, 2003.

LOURENÇÃO, A. L.; KUMATSU, S. S.; ALVES, S. B. Controle de *Sitophilus zeamais* em milho com *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e Pirimifos Metil. **Ecossistema**, Pinhal, v.18, p.69-74, 1993.

MARFETÁN, J. A. e FOLGARAIT, P. J. Diversity of mycobiota in colonies of different species of leaf-cutting ants and sampling sites across Argentina. **Ecología Austral**, v. 27; 3; p. 449-461, 2017.

MARFETÁN, J. A.; ROMERO, A. I.; FOLGARAIT, P. J Pathogenic interaction between *Escovopsis weberi* and *Leucoagaricus* sp.: mechanisms involved and virulence levels. **Fungal Ecology**, v. 17, p. 52-61, 2015.

MARICONI, F. A. M. **As saúvas**. São Paulo, Ceres, 1970.

MCTPR. MUNICÍPIO DE CAMPO DO TENENTE ESTADO DO PARANÁ. **Dados gerais, 2021**. Disponível em: <http://campodotenente.pr.gov.br/portal/dadosgerais/#:~:text=Campo%20do%20Tenente%20situa%2Dse,%C3%A1rea%20rural%20de%2025.200%20ha>. Acesso em: 01 de fevereiro de 2021.

MÖLLER, A. **Die Pilzgarten einiger siidamerikanischer Ameisen** (ed. A F. W. Schimper), pp. 65-81. Custaf Fischer: lena, 1893.

MOREIRA, A.; FORTY, L. C.; ANDRADE, A. P. P.; BOARETTO, A. C. Ninhos de formigas-cortadeiras. In**: ENCONTRO DE MIRMECOLOGIA**, 15., 2001, Londrina. Anais. Londrina: Iapar, 2001. p. 163-165.

MOREIRA, D. D. O.; ERTHAL, M.; SAMUEL, R. I. Alimentação e digestão em formigas-cortadeiras. IN: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa-MG. Editora UFV, 2011. pp. 204-225.

MUELLER, U. G. Symbiont recruitment versus ant-symbiont co-evolution in the attine ant–microbe symbiosis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 269-277, 2012.

NASCIMENTO, M. O.; SARMENTO, R. A.; SANTOS, G. R.; OLIVEIRA, C. A.; SOUZA, D. J. Antagonism of *Trichoderma isolates* against *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. **Journal of basic microbiology**, v. 57, n. 8, p. 699-704, 2017.

NGUYEN, N. H.; SONG, Z.; BATES, S. T.; BRANCO, S.; TEDERSOO, L.; MENKE, J.; SCHILLING, J. S.; KENNEDY, P. G. FUNGuild: an open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. **Fungal Ecology**, v. 20, p. 241-248, 2016.

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

NICKELE, M. A.; REIS FILHO, W.; OLIVEIRA, E. B. de; IEDE, E. T. Densidade e tamanho de formigueiros de Acromyrmex crassispinus em plantios de *Pinus taeda*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 4, p. 347-353, 2009.

NICKELE, M. A.; REIS FILHO, W.; OLIVEIRA, E. B.; IEDE, E. T.; CALDATO, N.; STRAPASSON, P. Leaf-cutting ant attack in initial pine plantations and growth of defoliated plants. **Pesquisa Agropecuária Brasileira***,* 47, 892-899, 2012.

NICKELE, M. A.; REIS FILHO, W.; PENTEADO, S. R. C.; QUEIROZ, E. C.; SCHAITZA, E. G.; PIE, M. R. Potential damage by *Acromyrmex* ant species in pine plantations in southern Brazil. **Agricultural and Forest Entomology**, 23, 32-40, 2020.

ORTIZ, A.; MADRIGAL, A.; ORDUZ, S. Evaluacion del comportamiento de las hormigas *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae) frente a la contaminacion del jardin del hongo con Trichoderma lignorum. **Revista Colombiana Entomologica**, v. 150, p. 53-60, 1999.

ORTIZ, A.; ORDUZ, S. *In vitro* evaluation of *Trichoderma* and *Gliocladium* antagonism against the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. **Mycopathologia**, v. 150, n. 2, p. 53–60, 2000.

PAGNOCCA, F. C.; RODRIGUES, A.; BACCI, J. R. M. Micro-organismos associados às formigas cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (org) **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo.** Viçosa: Editora UFV, 2011, p. 262-283.

PINTO, L. M. N.; AZAMBUJA, A. O.; DIEHL, E.; FIUZA, L. M. Pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from two species of *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 63, p. 301-306, 2003.

POLEZEL, D. R. Fungos isolados de ninhos iniciais da formiga *Atta sexdens rubropilosa*: análise do potencial para biocontrole de formigas-cortadeiras. **Dissertação de Mestrado**. UNESP – Campus Rio Claro. 2017. 68p.

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

REIS FILHO, W.; 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 Florestas, Colombo: **Comunicado técnico 354**, 2015.

REIS FILHO, W.; OLIVEIRA, S. Atividade externa carregamento de isca granulada e controle de *Acromyrmex crassispinus* em floresta de *Pinus taeda.* Embrapa Florestas Colombo: **Comunicado Técnico 78**, 2002.

REIS, V.; SANTOS, M.; LERNER, S. **Aprovado o uso agrícola de sulfluramida, apesar dos danos à saúde**. Associação Brasileira de Saúde Coletiva, 2019. Disponível em: https://www.abrasco.org.br/site/noticias/saude-da-populacao/aprovado-o-uso-agricola-de-sulfluramida-apesar-dos-danos-a-saude/40689/. Acesso em: 1 de fev. de 2021.

REYNOLDS, H. T.; CURRIE, C. R. Pathogenicity of *Escovopsis weberi*: the parasite of the attine ant-microbe symbiosis directly consumes the ant-cultivated fungus. **Mycologia**, v. 96, n. 5, p. 955-959, 2004.

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

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

RODRIGUES, A.; BACCI Jr, M.; MUELLER, U. G.; ORTIZ, A.; PAGNOCCA, F. C. Microfungal “weeds” in the leafcutter ant symbiosis. **Microbial Ecology**, v. 56, n. 4, p. 604-614, 2008.

RODRIGUES, A.; CABLE, R. N.; MUELLER, U. G; BACCI, M.; PAGNOCCA, F. C. Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungal garden pathogens of leaf-cutting. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 96, p. 331–342, 2009.

RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F. C; BACCI, M.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PFENNING, L. H. Variability of non-mutualistic filamentous fungi associated with *Atta sexdens rubropilosa* nests. **Folia Microbiologica**, v. 50, n. 5, p. 421, 2005.

RODRIGUES, A.; PASSARINI, M. R. Z.; FERRO, M.; NAGAMOTO, N. S.; FORTI, L. C.; BACCI, M.; SETTE, L. D.; PAGNOCCA, F. C. Fungal communities in the garden chamber soils of leaf-cutting ants. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, n. 11, p. 1186-1196, 2013.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, Á., M. S.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, Ó.; REINOSO, B.; GUTIERREZ, S.; CASQUERO, P. A. Inhibitory activity of *Beauveria bassiana* and *Trichoderma* spp. on the insect pests *Xylotrechus arvicola* (Coleoptera: Cerambycidae) and *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Chrisomelidae: Bruchinae). **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 189, n. 1, p. 1-8, 2017.

SANTOS, A. F. dos; KLEINA, H. T.; FUZITANI, E. J.; DUARTE, H. S. S. Uso do *Trichoderma* em culturas florestais. In: ***Trichoderma* uso na agricultura** (MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C.), Brasília, DF: Embrapa, p. 521-536, 2019.

SANTOS, A. V.; DILLON, R. J.; DILLON, V. M.; REYNOLDS, S. E.; SAMUELS, R. I. Ocurrence of the antibiotic producing bacterium Burkholderia sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 239, n. 2, p. 319-323, 2004.

SCHULTZ, T. R. Ants, plants and antibiotics. **Nature**, London. v. 398, n. 6730, 1999. p. 747-748.

SILVA, A.; BACCI Jr, M.; SIQUEIRA, C. G.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. **Journal of Insect Physiology**, v. 49, n. 4, p. 307-313, 2003.

SILVA, A.; RODRIGUES, A.; BACCI, M.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. D. C. Susceptibility of the ant-cultivated fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales: Basidiomycota) towards microfungi. **Mycopathologia**, v. 162, n. 2, p. 115-119, 2006.

SILVA, V. M. O Brasil contra a saúva: considerações sobre a Campanha Nacional de 1935. **Cadernos de Pesquisa do Cdhis**: Uberlândia. v.23. n.2. 2010. 18p.

SILVEIRA, V. D. **Micologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1981.

SOUZA, D. J.; SANTOS, J. F. L.; DELLA LUCIA, T. M. C. Organização social das formigas-cortadeiras. IN: DELLA LUCIA, T. M. C. **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa-MG. Editora UFV, 2011. pp. 126-140.

STEFANELLI, L. E. P.; MOTA FILHO, T. M. M.; CAMARGO, R. D. S.; MATOS, C. A. O. D.; FORTI, L. C. Effects of Entomopathogenic Fungi on Individuals as Well as Groups of Workers and Immatures of *Atta sexdens rubropilosa* Leaf-Cutting Ants. **Insects**, v. 12, n. 1, p. 10, 2021.

SUN, B. D.; YU, H. Y.; CHEN, A. J.; LIU, X. Z. Insect-associated fungi in soils of field crops and orchards. **Crop Protection**, v. 27, n. 11, p. 1421-1426, 2008.

VARANDA-HAIFIG, S. S.; ALBARICI, T. R.; NUNES, P. H.; HAIFIG, I.; VIEIRA, P. C.; RODRIGUES, A. Nature of the interactions between hypocrealean fungi and the mutualistic fungus of leaf-cutter ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 110, n. 4, p. 593-605, 2017.

VINHA, G. L.; ALCÁNTARA-DE LA CRUZ, R.; DELLA LUCIA, T. M. C.; WILCKEN, C. F.; DA SILVA, E. D.; LEMES, P. G.; ZANUNCIO, J. C. Leaf-cutting ants in commercial forest plantations of Brazil: biological aspects and control methods. **Southern Forests:** a Journal of Forest Science, v. 82, n. 2, p. 95-103, 2020.

WARD, P. S.; BRADY, S. G.; FISHER, B. L.; SCHULTZ, T. R. The evolution of myrmicine ants: phylogeny and biogeography of a hyperdiverse ant clade (Hymenoptera: Formicidae). **The Royal Entomological Society**, Systematic Entomology, 40, 2015. p 61–81.

WEBER N. A. Fungus-growing ants. **Science**, v. 153, n. 3736, pág. 587-604, 1966.

WEBER N. A**. Gardening Ants: the Attines**. American Philosophical Society, Philadelphia, 1972.

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

WILSON, E. O. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: Atta). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, 7, n. 2, P. 157-165, 1980.

WILSON, E. O. **The insects societies**. Cambridge, Massachusetts: Belknap Press, 1971. 548p.

YING, G. G.; KOOKANA, R. S. Persistence and movement of fipronil termiticide with under slab and trenching treatments. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 25, p. 2045-2050, 2006.

ZANUNCIO, J.C.; LEMES, P.G.; ANTUNES, L.R., MAIA, J.L.S.; MENDES, J.E.P.; TANGANELLI, K.M.; SALVADOR, J.F.; SERRÃO, J.E. The impact of the Forest Stewardship Council (FSC) pesticide policy on the management of leaf-cutting ants and termites in certified forests in Brazil. **Annals of Forest Science**, 73, 205-214, 2016.

APÊNDICE 1 – INFORMAÇÕES ACERCA DOS ISOLADOS COLETADOS DE NINHOS DE *Acromyrmex crassispinus*: CÓDIGO DO ISOLADO, ESPÉCIE, ORIGEM, LOCAL DE COLETA E CÓDIGO DE ACESSO GENBANK.

CÓD. ISOLADO	ESPÉCIE	ORIGEM	LOCAL DE COLETA	ACESSO GENBANK
F1T1IIA	*Absidia* sp.	*Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533024
N15T1IIID	*Alternaria* sp.	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533021
N28T1IVB	*Arthrinium phaeospermum*	*Jardim de fungo de Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533049
F4T2IA	*Arthrinium* sp.	*Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533028
N21T2VC	*Arthrinium* sp.	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533032
N28T1VB	*Arthrinium* sp.	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW532992
N4T2IIIA	*Arthrinium* sp.	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533026
F7T1IA	*Aspergillus* sp.	*Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533029
F19T2IA	*Bjerkandera* sp.	*Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533065
F16T1IIIB	*Cercophora* sp.	*Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW532973
N21T2IIA	*Chaetomium aureum*	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533020
F15T1IIIA	*Chaetomium aureum*	*Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533023
F17T2IIA	*Chaetomium elatum*	*Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533058
N28T1IVC	*Chaetomium* sp.	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533063
F25T3IIIB	*Chaetomium* sp.	*Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533068
F23T3IIIA	*Cladosporium sphaerospermum*	*Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533017
F16T1IIIA	*Cladosporium sphaerospermum*	*Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533018
N21T2IIB	*Colletotrichum boninense*	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533005
F16T1IA	*Colletotrichum gloeosporioides*	*Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW532972
N21T2ID	*Colletotrichum gloeosporioides*	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW532986

CÓD. ISOLADO	ESPÉCIE	ORIGEM	LOCAL DE COLETA	ACESSO GENBANK
N4T2IA	*Coniella wangiensis*	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533025
N14T1IIA	*Cunninghamella elegans*	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533030
N15T1IIIE	*Epicoccum* sp.	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW532984
N7T1IIB	*Escovopsis* sp.	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533011
N30T2VA	*Escovopsis weberi*	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533006
N5T3IIA	*Escovopsis weberi*	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533007
F14T2IA	*Eutypella scoparia*	*Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533014
N4T2ID	*Fungal endophyte isolate 4769*	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533042
N21T2IB	*Fungal endophyte isolate 4769*	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533061
N28T1IVA	*Fungal* sp. *voucher Robert L. Gilbertson Mycological Herbarium 1450*	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533053
F25T3IB	*Fusarium oxysporum*	*Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW532977
F8T3VA	*Fusarium oxysporum*	*Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW532981
F16T1IVA	*Fusarium oxysporum*	*Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533013
N21T2IIF	*Fusarium* sp.	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533043
N26T1VA	*Fusarium* sp.	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533012
N21T2VB	*Humicola fuscoatra*	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533059
F25T3IIIA	*Hypoxylon perforatum*	*Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533022
N21T2IVA	*Macrophomina phaseolina*	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW532987
N4T2IB	*Melanconis alni*	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533039
N29T3IIIA	*Microthecium* sp.	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533035
F10T1IIA	*Mucor fragilis*	*Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW532971

CÓD. ISOLADO	ESPÉCIE	ORIGEM	LOCAL DE COLETA	ACESSO GENBANK
N4T2IVDT	*Mucor* sp.	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW532999
N4T2IVD	*Mucor* sp.	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533002
N21T2IVCCD	*Neofusicoccum parvum*	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW532988
N28T1IIB	*Nigrosphora sphaerica*	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533008
F23T3IIA	*Penicillium fellutanum*	*Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533004
F3T3IA	*Penicillium janthinellum*	*Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533015
N21T2IVC	*Penicillium simplicissimum*	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533003
N4T2IIIB	*Penicillium* sp.	*Jardim de fungo de Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533040
N21T2VAAB	*Penicillium* sp.	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533044
N29T3IC	*Penicillium* sp.	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533045
N21T2IA	*Penicillium* sp.	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533046
N4T2IVB	*Penicillium* sp.	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533048
N21T2VA	*Penicillium* sp.	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533052
F16T1IIC	*Penicillium* sp.	*Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533054
F26T1IA	*Penicillium* sp.	*Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533055
F21T2FT	*Penicillium* sp.	*Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533056
F11T3IIA	*Penicillium* sp.	*Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533057
F15T1IIA	*Penicillium* sp.	*Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533016
F30T2IIA	*Penicillium* sp.	*Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533066
F22T2VA	*Penicillium* sp.	*Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533067
F4T2FT	*Peniophora pithya*	*Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW532979

CÓD. ISOLADO	ESPÉCIE	ORIGEM	LOCAL DE COLETA	ACESSO GENBANK
F16T1IIID	*Pestalotiopsis* sp.	*Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW532974
N4T2VA	*Pestalotiopsis* sp.	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533000
N28T1IIIC	*Pholiota* sp.	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533009
N21T2VD	*Phomopsis* sp.	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW532989
N26T1IB	*Phomopsis* sp.	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW532991
N21T2VDT	*Phomopsis* sp.	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533051
F11T3IIIA	*Pyrenochaeta* sp.	*Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533064
F10T1IA	*Rhizomucor variabilis*	*Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533027
N26T1IC	*Rhizomucor variabilis*	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533050
N15T1ID	*Seiridium* sp.	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533047
F20T1IIA	*Stagonosporopsis cucurbitacearum*	*Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW532976
N29T3ID	*Talaromyces* sp.	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW532993
F27T1IA	*Tinctoporellus epimiltinus*	*Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW532978
N30T2IVA	*Trichoderma asperellum*	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW532997
F4T2VC	*Trichoderma atroviride*	*Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW532980
N15T1VB	*Trichoderma harzianum*	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW532985
N14T1IVB	*Trichoderma koningiopsis*	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW532982
N14T1VB	*Trichoderma koningiopsis*	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW532983
N5T3IVA	*Trichoderma koningiopsis*	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533001
F17T2IIIA	*Trichoderma* sp.	*Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW532975
N20T1VA	*Trichoderma* sp.	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533031

CÓD. ISOLADO	ESPÉCIE	ORIGEM	LOCAL DE COLETA	ACESSO GENBANK
N22T2IIA	*Trichoderma* sp.	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533033
N25T3IIC	*Trichoderma* sp.	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533034
N2T2IIB	*Trichoderma* sp.	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW532994
N30T2IIIB	*Trichoderma* sp.	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW532996
N30T2IVB	*Trichoderma* sp.	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW532998
N30T2IVC	*Trichoderma* sp.	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533036
N32T2VB	*Trichoderma* sp.	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533037
N3T3IB	*Trichoderma* sp.	*Jardim de fungo* de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533038
N9T2IB	*Trichoderma* sp.	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533041
N23T3IA	*Trichoderma* sp.	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533060
N16T1IIIB	*Trichoderma* sp.	*Jardim de fungo de Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533062
N22T2IVB	*Trichoderma spirale*	*Jardim de fungo de Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW532990
N2T2IIIA	*Trichoderma spirale*	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW532995
N21T2IVB	*Umbelopsis* sp.	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533010
N21T2IVBT	*Umbelopsis* sp.	Jardim de fungo de *Acromyrmex crassispinus*	Campo do Tenente-PR	MW533019

FONTE: A autora (2021).