

UTILIZAÇÃO DE *BEAUVERIA BASSIANA* E *ESCOVOPSIS* SPP. NO  
CONTROLE DE FORMIGAS CORTADEIRAS *ACROMYRMEX*  
*SUBTERRANEUS*

**RAYMYSON RHURYO DE SOUSA QUEIROZ**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO - 2022

UTILIZAÇÃO DE *BEAUVERIA BASSIANA* E *ESCOVOPSIS* SPP. NO  
CONTROLE DE FORMIGAS CORTADEIRAS *ACROMYRMEX*  
*SUBTERRANEUS*

**RAYMYSON RHURYO DE SOUSA QUEIROZ**

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

Orientador: Prof. Dr. Richard Ian Samuels

Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Aline Teixeira Carolino

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO – 2022

### FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

Q3 Queiroz, Raymyson Rhuryo de Sousa.

Utilização de *Beauveria bassiana* e *Escovopsis* spp. no controle de formigas cortadeiras *Acromyrmex subterraneus* / Raymyson Rhuryo de Sousa Queiroz. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2022.

92 f.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2022.  
Orientador: Richard Ian Samuels.

1. *Eucalyptus grandis*. 2. Controle biológico. 3. Produção massal. 4. c. 5. c. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

UTILIZAÇÃO DE *BEAUVERIA BASSIANA* E *ESCOVOPSIS* SPP. NO  
CONTROLE DE FORMIGAS CORTADEIRAS *ACROMYRMEX*  
*SUBTERRANEUS*

**RAYMYSON RHURYO DE SOUSA QUEIROZ**

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

**Aprovada em 22 de fevereiro de 2022**

Comissão Examinadora:

---

Dr<sup>a</sup> Denise Dolores Oliveira Moreira (D.Sc. Produção Vegetal) - UENF

---

Dr. Milton Erthal Junior (D.Sc. Produção Vegetal) – IFFluminense campus  
Campos-Guarus

---

Dr<sup>a</sup> Aline Teixeira Carolino (D.Sc. Produção Vegetal) - UENF  
Coorientadora

---

Dr. Richard Ian Samuels (Ph.D. Patologia de Insetos) - UENF  
(Orientador)

“A pandemia vai mudar a maneria como lidamos com nosso corpo [...] A segunda consequência é transformação da maneira como pensamos no futuro, nossa consciência do tempo. De repente, não saberemos como será o amanhã.”

Achille Mbemb

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal pela oportunidade de realizar o mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/ CAPES (Código de Financiamento 001), e UENF pela concessão da bolsa pesquisa;

Ao professor Richard pela orientação, ensinamentos e apoio durante toda execução da pesquisa e, principalmente, durante um mestrado atípico por conta da pandemia;

À Aline e Thais pelas orientações, ensinamentos, apoio e sorrisos. A paixão de vocês pela pesquisa é inspiradora e desejo que outras pessoas tenham a mesma oportunidade que eu tive em ver isso de perto!

Agradeço profundamente à minha família que esteve ao meu lado durante toda a minha formação e sempre serão parte de mim independentemente do lugar que eu esteja;

Ao grupo de Mirmecologia, Denise, Patrícia e Willians, pelo companheirismo e ensinamentos. Assim como ao grupo do Laboratório de Patologia de Insetos;

À Laís, Chiara, Joameson, Amanda, Raudile, Assistone, Sydney e Gabriel que tornaram a minha vivência em Campos mais fácil e também ajudaram de formas diferentes a execução desse trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Formigas cortadeiras.....	4
2.2 Controle biológico com fungo.....	6
2.3 Controle biológico de formigas usando fungos.....	7
2.4 Fungos endofíticos.....	8
2.5 <i>Beauveria bassiana</i> e <i>Escovopsis</i> ssp. para o controle de formigas cortadeiras.....	9
2.6 Produção massal de <i>Escovopsis</i> ssp.....	11
3. TRABALHOS.....	13
3.1 COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA DO FUNGO ENTOMOPATO- GÊNICO <i>Beauveria bassiana</i> EM PLANTAS DE EUCALIPTO VISANDO O CONTROLE DE <i>Acromyrmex</i> <i>subterraneus subterraneus</i> .....	13
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	14
INTRODUÇÃO.....	15
MATERIAL E MÉTODOS.....	17
Origem dos fungos utilizados e preparo de suspensão fúngica....	17
Coleta e manutenção de formigas cortadeiras.....	17

Método de esterilização de sementes de eucalipto.....	17
Inoculação de <i>Eucalyptus grandis</i> com <i>Beauveria bassiana</i> .....	18
Avaliação de parâmetros biométricos das plantas.....	20
Bioensaios de forrageamento de <i>Eucalyptus grandis</i> tratados com <i>Beauveria bassiana</i> .....	21
Análise dos dados.....	23
RESULTADOS .....	23
Parâmetros biométricos.....	23
Forrageamento e comportamento de <i>Acromyrmex subterraneus subterraneus</i> .....	25
DISCUSSÃO.....	28
Parâmetros biométricos.....	28
Forrageamento e comportamento de <i>Acromyrmex subterraneus subterraneus</i> .....	30
CONCLUSÕES.....	33
REFERÊNCIAS	34
BIBLIOGRÁFICAS.....	
3.2 PRODUTIVIDADE MASSAL DE <i>Escovopsis</i> SSP. PARA PROGRAMAS DE CONTROLE BIOLÓGICO DE FORMIGAS CORTADEIRAS.....	43
RESUMO.....	43
ABSTRACT.....	44
INTRODUÇÃO.....	45
MATERIAL E MÉTODOS.....	47
Coleta e manutenção das formigas cortadeiras e fungo simbiote.....	47
Origem dos isolados de <i>Escovopsis</i> ssp. e preparo dos inóculos	47
Produção de conídios em meio semissólido.....	48
Virulência <i>Escovopsis</i> ssp. usando diferentes substratos contra jardim de <i>Acromyrmex subterraneus subterraneus</i> .....	49
Análise estatística.....	50
RESULTADOS.....	51
Produção de conídios de <i>Escovopsis</i> ssp. ....	51
Virulência de <i>Escovopsis</i> ssp. ao jardim de fungos de	54



<i>Acromyrmex subterraneus subterraneus</i> .....	
DISCUSSÃO.....	56
CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	68
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

## RESUMO

QUEIROZ, Raymyson Rhuryo de Sousa Queiroz; M.Sc; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro de 2022; Utilização de *Beauveria bassiana* e *Escovopsis* spp. no Controle de Formigas Cortadeiras *Acromyrmex subterraneus*; Orientador: Prof. Dr. Richard Ian Samuels; Coorientadora: Dra. Aline Teixeira Carolino.

As formigas cortadeiras são insetos capazes de realizar monocultivo do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* para obtenção de uma fonte alimentar. O cultivo desse fungo necessita de material vegetal que é coletado pelas formigas. Assim, algumas espécies de formigas cortadeiras ocasionam danos muito sérios aos cultivos agrícolas e florestais, através do desfolhamento das plantas. Novas formas de controle precisam ser desenvolvidas e nesse trabalho foi investigado o uso de plantas colonizadas por fungos entomopatogênicos na forma endofítica e também a otimização da produção de conídios de um fungo parasita especializado de jardins de formigas cortadeiras. O primeiro trabalho comparou os efeitos do oferecimento de plantas de *Eucalyptus grandis* tratadas com *Beauveria bassiana* na forma endofítica para colônias das formigas cortadeiras da espécie *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. Os resultados demonstraram que plantas de eucalipto tratadas com *B. bassiana* foram menos cortadas pelas operárias, e também promoveram o aumento no diâmetro do caule, massa fresca e seca da parte aérea. O segundo trabalho descreve novas metodologias para a produção massal de quatro isolados de *Escovopsis* sp. Apesar do potencial de *Escovopsis* ssp. para o controle de colônias de formigas cortadeiras, ainda é

escasso literatura sobre a produção de propágulos desse gênero. Os resultados mostraram que a aveia laminada foi o melhor substrato para a produção de conídios e a combinação aveia/cepa pode proporcionar alta produção de conídios virulentos. Testes sobre jardins de *Leucoagaricus gongylophorus* confirmaram que conídios de *Escovopsis* ssp. mostraram os mais altos níveis de virulência quando produzidos usando aveia em comparação com arroz branco, arroz parboilizado ou canjiquinha. Portanto, o uso de aveia laminada é uma opção promissora para a produção massal de *Escovopsis* ssp. em fermentação semissólida.

## ABSTRACT

QUEIROZ, Raymyson Rhuryo de Sousa Queiroz; M.Sc; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; February, 2022; Use of *Beauveria bassiana* and *Escovopsis* spp. in the control of leaf-cutting ants *Acromyrmex subterraneus*; Advisor: Richard Ian Samuels. Co-advisor: Aline Teixeira Carolino.

Leaf-cutting ants are insects capable of monoculture the fungus *Leucoagaricus* to obtain a food source. The cultivation of this fungus requires plant material that is collected by the ants. Thus, some species of leaf-cutting ants cause very serious damage to agricultural and forestry crops, through plant defoliation. New forms of control need to be developed and this work investigated the use of plants colonized by entomopathogenic fungi in the endophytic form and also the optimization of conidia production of a specialized parasitic fungus from leaf-cutting ant gardens. The first work compared the effects of offering *Eucalyptus grandis* plants treated with *Beauveria bassiana* in the endophytic form for colonies of leaf-cutting ants of the species *Acromyrmex subterraneus*. The results showed that eucalyptus plants treated with *B. bassiana* were less cut by workers, thus reducing damage. Ants can also be infected by the endophytic fungus. The application of *B. bassiana* in eucalyptus promoted an increase in stem diameter, fresh and dry mass of the shoot. The second work describes new methodologies for the mass production of four isolates of *Escovopsis* sp. Despite the potential of *Escovopsis* to control leaf-cutting ant colonies, there is still a lack of literature on

the production of propagules of this genus. The results showed that laminated oat was the best substrate for conidia production and the oat/strain combination can provide high production of virulent conidia. Virulence tests on *Leucoagaricus* gardens confirmed that *Escovopsis* conidia showed the highest levels of virulence when produced using oat compared to white rice, parboiled rice or hominy. Therefore, the use of rolled oats is a promising option for the mass production of *Escovopsis* in semi-solid fermentation.

## 1. INTRODUÇÃO

Formigas cortadeiras do gênero *Atta* e *Acromyrmex* são insetos desfolhadores eussociais que utilizam material vegetal para o cultivo do fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, do qual utilizam para alimentação (Schultz e Meier, 1995; Borba et al., 2006). Devido a essa característica, podem utilizar diversas espécies de plantas que possuem interesse econômico para agricultura, silvicultura e pecuária. No cultivo de *Pinus* e *Eucalyptus* os danos ocorrem especialmente na fase de pré-plantio, condução de brotação e imediatamente após o plantio. Uma das principais dificuldades do controle ocorre pela organização e estrutura social, que são altamente complexas (Boaretto e Forti, 1997; Montoya-Lerma et al., 2012; Della Lucia et al., 2014).

O uso de químicos é a principal forma de controle utilizado contra formigas cortadeiras (Britto et al., 2016). Entretanto, efeitos negativos no ambiente e na economia incentivam métodos alternativos de controle das formigas (Araújo et al., 2015). Dentre os métodos alternativos, destaca-se o uso do controle biológico através da aplicação de fungos como *Beauveria bassiana* e *Trichoderma harzianum* com sucesso no controle de formigas cortadeiras após aplicação via pulverização (Mota Filho et al., 2021). Um dos desafios na utilização de propágulos fúngicos é a exposição aos estresses abióticos como radiação UV, umidade reduzida, altas temperaturas e excesso de chuva (Goffré e Folgarait, 2018; Jaber e Ownley, 2018).

A colonização de fungos em plantas é uma das alternativas para reduzir o estresse abiótico, uma vez que a planta proporcionará melhores condições para a sobrevivência do fungo e a relação simbiótica proporciona para a planta: proteção a patógenos, pragas e promoção de crescimento (Bittleston et al., 2011; Jaber e Ownley, 2018; Bamisile et al., 2019; Tian et al., 2020). O fungo entomopatogênico *B. bassiana* foi identificado de forma natural e inoculado de diferentes formas em varias espécies de plantas (Gathage et al. 2016; Lefort et al., 2016).

*Beauveria bassiana* é um dos fungos mais comercializados no Brasil, no qual pode ser utilizado no controle de uma gama de insetos e com comprovação de controle de formigas dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* com uso de diferentes metodologias (Daza et al., 2019; Mascarin et al., 2019; Folgarait et al., 2020). O principal meio de colonização desse fungo ocorre através dos conídios, no qual iniciam o processo a partir da adesão ao tegumento, mas também ocorrem resultados positivos através do uso de *B. bassiana* na forma de blastosporos, outro propágulo do fungo, já foi evidenciado com grande poder infectivo. Na busca por alternativas de proteção, a aplicação do fungo na forma endofítica é promissora (Feng et al.1994; Bernardo et al., 2018; Gonzalez-Mas et al., 2021).

Micoparasitas como do gênero *Escovopsis* ssp. também possuem potencial de controle de colônias de formigas cortadeiras, pois são parasitas especializados e naturalmente são encontrados infestando os jardins de fungo de formigas cortadeiras (Rodrigues et al., 2008). *Escovopsis* sp. utiliza ganchos formados nas terminações das hifas para penetrar e sugar o conteúdo das hifas do fungo simbiote de formigas cortadeiras (Marfetan et I., 2015). Em vista disso, o uso de *Escovopsis* ssp. é promissor em desenvolvimento de metodologias para o controle de formigas cortadeiras, porém há poucos relatos sobre os meios de produção massal de fungos desse gênero.

A produção massal é uma das etapas principais para aplicação de microrganismos em estudos e técnicas no controle de insetos-praga. Uma das alternativas para a produção é o uso de substratos sólidos ou semissólidos, do qual é necessária a disponibilidade de matéria-prima, composição simples e baixo custo, além das avaliações dos meios de cultivo com pH, temperatura e luminosidade controlados para o desenvolvimento dos fungos (Machado et al., 2009). O arroz é o principal substrato utilizado em estudos para a produção de fungos em meio semissólido, entretanto podem ser utilizados canjiquinha, bagaço

de cana e casca de soja (Ottati-de-Lima et al., 2010; Kruger et al., 2014; Oliveira et al., 2020).

A partir do exposto acima, o objetivo deste trabalho foi desenvolver técnicas para redução de danos ocasionados por formigas cortadeiras utilizando duas novas metodologias. O primeiro, colonizar plantas de eucalipto com *B. bassiana*. Já o segundo, desenvolver metodologias para a multiplicação de *Escovopsis* ssp. por fermentação em diferentes substratos.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Formigas cortadeiras

As formigas pertencem à ordem Hymenoptera e têm como algumas características morfológicas pecíolo nodoso; antena geniculada e glândula metapleurar. Assim como algumas vespas, abelhas e cupins, são eusociais e são os artrópodes mais abundantes e diversificados (Fittkau e Klinge, 1973; Brady et al., 2006; Baccaro et al., 2015). As formigas podem ter como base alimentar fontes carnívoras e frutíferas, por exemplo: sementes, frutos, excreção e secreção de animais e vegetais (Baccaro et al., 2015; Del-Claro et al., 2002; Davidson et al., 2003). Além disso, as formigas podem participar no fluxo energético e de nutrientes com enriquecimento do solo em Mo, C, N, P, Ca, K e Mg em áreas próximas aos descartes do ninho (Farji-Brener e Ghermandi, 2008) e como bioindicador da presença de agrotóxicos através de inibições em esterases (Cantagalli et al., 2014). As formigas também atuam em diferentes nichos dentro da colônia.

As formigas cortadeiras são divididas em castas, que podem ser definidas como um grupo pertencente à mesma colônia em que realizam tarefas específicas. Ocorre distinção em castas férteis (rainhas e machos) e estéreis (operárias). Uma subdivisão ocorre em operárias, no qual são diferenciadas pelo tamanho em máximas, médias e mínimas. Essa diferenciação pode ser quantificada pela largura da cabeça. Também levando em consideração o

tamanho delas, podem ser jardineiras, generalistas, forrageadoras e soldados (Wheeler, 1910; Wilson, 1980).

As formigas forrageiras formam trilhas que são utilizadas na busca de recursos, no qual a coleta de espécies vegetais é facilitada pela polifagia das formigas, mas há preferência a determinadas espécies vegetais (Vasconcelos e Fowler, 1999; Jofelice et al., 2011; Moreira et al., 2014). As relações internas nas sociedades de insetos são promotoras de comportamentos coletivos organizados com capacidade de solucionar dificuldades de forma muito flexível (Souza et al., 2011). O comportamento coletivo e individual de formigas pode ser modificado para resolver alterações nas trilhas, no qual pode ocorrer mudança no tamanho das operárias, no tamanho e na forma de corte das folhas (Dussutour et al. 2008).

Estas formigas são exclusivas do Novo Mundo, presentes da latitude 40°N a 41°S, compreendido pelo sul dos Estados Unidos ao centro da Argentina. Nesse território, algumas espécies podem conter grandes colônias com múltiplas câmaras e milhões de formigas, que cortam grandes quantidades de material vegetal para o cultivo dos jardins de fungos. Tornando algumas espécies os principais herbívoros da região Neotropical e inseto-praga pelos danos a diversas culturas (Della Lucia, 1993; Samuels et al., 2013; Stefanelli et al., 2020; Murakami, 2020).

As formigas cortadeiras da subfamília Myrmicinae, *Atta* e *Acromyrmex*, são consideradas as mais derivadas do clado Neoattini, no qual coevoluíram em uma relação interespecífica com os fungos basidiomicetos dos gêneros *Leucoagaricus* e *Leucocoprinus*. Essa relação mutualista propicia a capacidade de cultivo desses fungos com a finalidade de alimentação através dos gongilídios, um inchaço hifal rico em nutrientes produzido pelo fungo (Fisher et al., 1994; Mueller, 2002; Della Lucia, 2011; Montoya et al., 2019). As formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* podem ser identificadas pela presença de quatro a cinco pares de espinhos na parte dorsal do tronco e, em algumas espécies, podem ser reduzidos no pronoto. Os ninhos de *Acromyrmex* sp. são superficiais e cobertos por materiais vegetais, terra e alguns não possuem a presença de material na superfície (Mayhé-Nunes, 1991; Lima et al., 2001).

A principal forma de controle utilizada é a aplicação de produtos químicos, em destaque sulfluramida, que mata as forrageadoras e podem contaminar o fungo simbiote. A sulfluramida interrompe a formação de ATP nas mitocôndrias

que ocasionam redução dos movimentos, morte e, conseqüentemente, a redução do dano ao cultivo (Forti et al., 2007; Montoya-Lerma et al., 2012; Britto et al., 2016). Todavia, o uso de compostos tóxicos ocasiona contaminação em seres humanos, ambiente e demais seres vivos e tais conseqüências intensificaram pesquisas importantes por técnicas alternativas de controle (Mejia et al., 2018).

Dentre as alternativas para o controle das formigas, o uso de fungos como biocontroladores é cada vez mais estudado, a exemplo de pesquisas com uso de *Aspergillus flavus* e *Penicillium commune* isolados do lixo de formigueiros e usados no controle de *Atta cephalotes* (Valencia-Giraldo et al., 2020); a combinação do uso de *Metarhizium* ssp. e *Trichoderma* ssp. contra o fungo simbiote e formigas operárias (Lopez e Orduz, 2003), e o uso do parasita *Escovopsis* sp. contra o jardim de fungo (Folgarait et al., 2011).

## 2.2 Controle biológico com fungo

Controle biológico pode ser definido como a regulação de populações de vegetais e animais por inimigos naturais, que podem agir de forma direta pelo antagonismo ou indireta por modificações na anatomia e fisiologia (Parra et al., 2002; Ghorbanpour et al., 2018). Pode ser classificado em controle biológico clássico, conservativo e aplicado (Lacey et al., 2001). O uso de fungos no controle biológico é indicado pelo baixo impacto prejudicial à saúde humana e ambiental e ao custo (Cavero et al., 2015).

O uso de fungos é uma importante alternativa no controle de insetos, pois infecta o hospedeiro em todos os estágios de desenvolvimento, diferindo de bactérias, nematoides e vírus (Alves, 1998). Somado a isso, a capacidade de penetrar o inseto via tegumento e não apenas via oral, proporciona vantagem aos outros microrganismos que utilizam apenas o controle via oral. Além de estar presente em diferentes ambientes e substratos, por exemplo com identificação em área antiga de mineração, lodo, depósito de minério, sedimento fluvial, poeira de carvão e em pH menor que 3,5 e superior a 9 (Alves e Lopes, 2008; Meyling et al. 2012; Šimonovičová et al., 2021).

Os fungos entomopatogênicos dos gêneros *Beauveria*, *Metarhizium*, *Hirsutiella*, *Isaria* e *Lecanicillium* são comercializados em diversos países (Sanchez-Rodríguez et al. 2015; Lacey et al. 2015; Sharma et al., 2020), já no

Brasil destacam-se *M. anisopliae* (Metschn) (Hypocreales, Ascomycota) e *B. bassiana* (Balsamo) (Hypocreales, Ascomycota) (Mascarin et al., 2019). Sendo os conídios, os principais propágulos fúngicos utilizados nos programas de controle biológico, pois se aderem à cutícula dos hospedeiros e exercem atividade enzimática, e ou pressão mecânica, com o tubo germinativo e o apressório, para que ocorra a adesão e penetração no tegumento (Alves, 1998; Lacey et al., 2015). Os fungos entomopatogênicos possuem capacidades além do controle de insetos, tais como antagonismo a doenças de plantas, indução de crescimento de plantas, colonização de raízes e endofitismo (Miranda-Fuentes et al., 2020).

### 2.3 Controle biológico de formigas cortadeiras usando fungos

O comportamento social das formigas propicia um ambiente perfeito para transmissão e infecção por patógenos, pois há o compartilhamento de espaço físico, interações constantes entre indivíduos e desenvolvimento em local com diferentes microrganismos (Małagocka et al., 2019). Entretanto, a organização e evolução em um ambiente hostil com diferentes patógenos proporcionaram às formigas cortadeiras a capacidade de desenvolver mecanismos de imunidade social que as protegem contra ataques microbianos (Keller et al., 2003; Cremer et al., 2007). Por exemplo, a glândula metapleurale que é capaz de suprimir atividades patogênicas (Vieira et al., 2012), a presença de biofilme bacteriano que protege o tegumento contra inimigos naturais (Mattoso et al., 2011) e o comportamento de retirada de cadáveres infectados com fungos patogênicos de dentro do ninho também ajudam a proteger a colônia (Loreto e Hughes, 2016).

A utilização de controle em forma de isca química é comumente utilizada. Todavia, são realizados estudos com uso de iscas sem adição de compostos tóxicos, como exemplo Travaglini et al. (2017) observaram que iscas contendo *M. anisopliae* foram aceitas e incorporadas ao jardim de *A. sexdens rubropilosa* e também observaram que lambe a cápsula foi o principal comportamento apresentado. Silva et al. (2020) utilizaram outra possibilidade de uso das iscas, no qual combinaram diferentes concentrações de sulfato de zinco com encapsulamento de *T. harzianum* e a melhor concentração de sulfato de zinco para o controle de *A. sexdens* foi  $0,25 \text{ gL}^{-1}$ .

Alternativa sem uso de isca foi relatada por Folgarait et al. (2020), no qual imergiram formigas das espécies *Acromyrmex ambiguus*, *Acromyrmex crassipinus* e *Acromyrmex lundii* em suspensões de três linhagens de *B. bassiana* e obtiveram mortalidade superior a 80% em condição de laboratório.

Mighell e Van Bael (2016) realizaram testes com 14 fungos isolados dos jardins e endofíticos de folhas de *Mangifera indica* e observaram que alguns isolados endofíticos desempenhavam funções antagonistas ao jardim, por exemplo, dois isolados de *Xylaria* provocaram maior taxa de remoção de lixo em uma minicolônia em comparação com os demais. Os mesmos autores destacam a importância de estudos sobre o impacto dos fungos endofíticos nos jardins e quais isolados afetam mais as colônias. O uso de fungos endofíticos também foi sugerido por existir a possibilidade de superar as barreiras da aplicação de contato, uma vez que poderá ocorrer a proteção do fungo a radiação UV, umidade reduzida e excesso de chuva (Jaber e Ownley, 2018).

## 2.4 Fungos endofíticos

O termo endofítico foi introduzido por De Bary (1866) para qualquer organismo encontrado dentro de tecidos de autótrofos vivos. Stone et al., (2000) definiram como endofíticos, ou endófitos, microrganismos que colonizam tecidos vivos de vegetais saudáveis sem originar manifestação visível de doença. Azevedo (2014) inclui um segundo grupo na definição, os endofíticos que originam estruturas externas a exemplo as bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrizos.

Os fungos endofíticos representam uma grande possibilidade de recurso biológico, pois produzem compostos bioativos que podem ser utilizados na medicina, indústria e agricultura (Mousa e Raizada, 2013). Assim como beneficiam a planta hospedeiro com a redução da herbivoria e a produção de fenóis, esteroides, flavonoides, quininas, terpenoides, xantonas, peptídeos, citocatalasinas, alcaloides, compostos alifáticos e fenil-propanoides (Jaber e Ownley, 2017; Alurappa e Chowdappa, 2018).

Podem estar presentes de forma sistêmica no apoplasto; vasos condutores e no interior de células (Azevedo et al., 2003). Confirmados em cultivos anuais de milho, feijão, tomate e batata, além de perenes como cacau,

banana, café e lenhosas (Posada e Veja, 2005; Jaber e Ownley, 2017). Também podem ser isolados através de colonização natural ou induzidos (Pimentel et al., 2016; Bamisile et al., 2019). Os fungos endofíticos presentes na rizosfera e filosfera utilizam enzimas para penetrar o tecido vegetal e também utilizam aberturas naturais e ferimentos. Após ocorrer o estabelecimento dentro da planta, podem colonizar tecidos das raízes, caules e folhas (Truyens et al., 2015; Kandel et al., 2017). Já para inoculações induzidas/artificiais, são utilizadas diferentes metodologias.

Em revisão bibliográfica, Vega (2018) menciona diversas metodologias de inoculação como a utilização de *spray* foliar com conídios, injeção em diferentes partes da planta, irrigação do solo e imersão de sementes em suspensão de conídios. A confirmação da presença de endofíticos pode ser realizada por crescimento de micélio em amostras de tecido vegetal em meio de cultura. Assim como análise molecular com DNA por PCR ou microscopia (Mckinnon et al., 2017).

## 2.5 *Beauveria bassiana* e *Escovopsis* ssp. para o controle de formigas cortadeiras

Rocha et al. (2017) identificaram *Trichoderma* ssp. em folhas utilizadas e descartadas por *Atta sexdens rubropilosa* e propuseram a ideia de utilizar endofíticos como “Cavalo de Troia” para controle de formigas cortadeiras, no qual obtiveram resultados positivos em cultura pareada com *L. gongylophorus*. Tal hipótese pôde ser testada, pois a partir do forrageamento de folhas colonizadas com endofíticos ocorreu uma redução no ritmo de crescimento de colônias (Van Bael et al., 2012).

Dentre a diversidade de fungos para testes de endofitismo e controle de formigas cortadeiras, existe a possibilidade de uso do fungo entomopatogênico *B. bassiana*, que junto aos fungos do gênero *Trichoderma* são muito estudados contra formigas (Batista et al., 2022; Folgarati e Goffré, 2021; Folgarati et al., 2020; Daza et al., 2019; Goffré et al., 2018). *Beauveria bassiana* é um fungo entomopatogênico comumente identificado no solo e possui a capacidade de infectar diversas espécies de insetos e aracnídeos em praticamente todo o planeta (Vega, 2008).

Este fungo também ocasiona infecção nos insetos através dos conídios, no qual ocorre a adesão à cutícula por meio de proteínas de adesão. Em seguida, a formação do apressório que rompe a quitina através de atividade mecânica e enzimática e, por fim ocorre colonização interna com o comprometimento do sistema imunológico e a morte do inseto (Feng et al.1994; Barelli et al., 2016). Entretanto, no modo endofítico, autores justificam o controle de insetos através da produção de diferentes metabolitos e modulações no hospedeiro (Gao et al., 2010; Tomilova et al., 2020).

A ocorrência de *B. bassiana* colonizando plantas de modo natural foi relatada em café (Vega et al. 2010), cacau (Amin et al. 2014) e milho (Pimentel et al. 2016). Todavia, o fungo também pode ser inoculado com diferentes metodologias como *spray* foliar (El-Deeb et al., 2012), *spray* direto no solo (Quesada-Moraga et al., 2009), suspensão direto no solo (Posada et al., 2007) e crescido em arroz e incorporado ao solo (Akello et al., 2007). Apesar do grande número de pesquisas com *B. bassiana*, ainda são necessários estudos sobre aplicação desse entomopatogênico de modo endofítico e, principalmente, contra formigas cortadeiras, uma vez que possuem diferentes modos de defesa.

Uma outra forma de controle é a utilização de *Escovopsis* ssp. Os fungos do gênero *Escovopsis* (Ascomycota: Hypocreales) são parasitas das colônias de formigas cortadeiras há mais de 60 milhões de anos, ocorrendo de forma concomitante ao fungo simbiote (Currie et al., 2003). Poucas espécies fazem parte do gênero, podem possuir a coloração rosa, branca, amarela e marrom, assim como a conidiogênese pode ser simpodial ou fialídico e as vesículas podem ser globosas ou cilíndricas clavadas (Geraldo et al., 2006; Meirelles et al., 2015, Augustin et al., 2017).

*Escovopsis* ssp. são parasitas especializados na interação formiga-fungo simbiote que utilizam processos parasíticos com substâncias bactericidas, inseticidas e antifúngicas na redução da biomassa do jardim de fungo e, por consequência reduz o número de formigas. Ao entrar em contato com as hifas do *Leucoagaricus* sp., este micoparásita o degrada ao consumir seus nutrientes através do auxílio de ganchos formados nas terminações hifais, que penetram nas hifas do fungo simbiote, sugando o conteúdo de suas hifas e matando o fungo por consequência (Marfetan et al., 2015).

A interação entre o *Escovopsis* ssp. e o simbionte proporcionou ao *Escovopsis* ssp. a capacidade de ser transportado durante o forrageamento e germinar quando em contato com compostos liberados pelo *L. gongylophorus* (Augustin et al., 2017; Masiulionis; Pagnocca, 2020). Diferente de *B. bassiana*, fungos do gênero *Escovopsis* ssp. ainda não foram identificados naturalmente de forma endofítica e o método de inoculação direta no solo ocasionou 100% de mortalidade de plantas de eucalipto (Batista et al., 2022). Dessa forma, demonstrando a importância de estudos com a utilização desse parasita.

## 2.6 Produção massal de *Escovopsis* ssp.

O início de qualquer trabalho com uso de agentes de controle biológico parte da multiplicação do microrganismo. Assim, o processo de produção massal de fungos deve ocorrer com baixo custo e, associado a isso, a produção de altas concentrações, formas viáveis e virulentas do patógeno (Alves, 1992). Outro aspecto importante para que ocorra a consolidação do controle microbiano é o desenvolvimento de novas metodologias para a produção de propágulos em produção massal.

Uma das formas de produção é através da fermentação em meio sólido, que pode ser definida como o crescimento de microrganismo na superfície de uma partícula de substrato sólido, poroso e com umidade suficiente para o crescimento (Ruiz-Leza, 2004; Rahardjo et al., 2006). O processo de produção massal em meio sólido busca formas de redução de custo, no qual deve ser avaliada a seleção de substratos que possuam grande disponibilidade, simples composição e baixo custo. E, quando relacionado aos fatores de cultivo do fungo, são examinados a temperatura, pH e luminosidade (Machado et al., 2009).

O principal substrato utilizado na fermentação sólida de fungos é o arroz, em virtude de possuir valores de nutrientes necessários para o desenvolvimento dos fungos, apresentar grande área superficial e não sofrer alterações na estrutura física no decorrer do tempo (Prakash et al., 2008; Kruger et al., 2014; Méndez-González et al., 2018). Entretanto, também são utilizados canjiquinha, farinha de milho, fubá de milho e trigo moído (Ottati-De-Lima et al., 2010). Assim como são pesquisadas alternativas menos usuais como misturas de capins com



sorgo (Shabana et al., 2010), bagaço de cana, palha de arroz e casca de soja (Oliveira et al., 2020).

Muitos estudos de produção massal são focados em fungos dos gêneros *Beauveria* e *Metarhizium*. Contudo, para fungos, como, por exemplo, do gênero *Escovopsis*, não existem protocolos para a produção de conídios em escala ou estudos dos melhores substratos para o crescimento. Todavia, as demonstrações da eficácia no uso de *Escovopsis* ssp. contra formigas cortadeiras possibilitam novas oportunidades de mercado no controle biológico de pragas. Currie (2001) realizou um dos primeiros estudos com a utilização de *Escovopsis* sp., já Taerum et al. (2010) confirmaram a possibilidade de coexistência de diferentes cepas de *Escovopsis* ssp. em colônias de *Atta* sp. , *Acromyrmex* sp. e *Trachymyrmex* sp. e Mendonça et al. (2021) demonstraram diferentes respostas das formigas em aplicação de *Escovopsis* ssp. em colônias com e sem rainha.

O uso de *Escovopsis* ssp. em programas de controle biológico de pragas é uma alternativa promissora, uma vez que esse fungo é um antagonista especializado dos jardins de fungos de formigas cortadeiras. Assim como a utilização de *B. bassiana* de forma endofítica em plantas de eucalipto, que poderão reduzir os danos ocasionados por formigas cortadeiras, que são uma das pragas-chave do cultivo.

### 3. TRABALHOS

#### 3.1 COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *beauveria bassiana* EM PLANTAS DE EUCALIPTO VISANDO O CONTROLE DE *Acromyrmex subterraneus subterraneus*

##### RESUMO

As formigas cortadeiras são os principais herbívoros da região Neotropical, e ocasionam dano em todo território brasileiro com prejuízos em diversos tipos de cultivo e em destaque em plantas de eucalipto. A principal forma de dano ocorre através do desfolhamento, no qual o material vegetal é utilizado como substrato para o jardim de fungo *Leucoagaricus gongylophorus* que é fonte alimentar dos indivíduos da colônia. Para minimizar danos causados por outros organismos, as formigas possuem mecanismos de proteção contra ataques de entomopatógenos e micopatógenos ao jardim de fungo e esses comportamentos de proteção aumentam a dificuldade de controle de inseto. O presente estudo teve como objetivo colonizar plantas de *Eucalyptus grandis* com *Beauveria bassiana* através dos métodos de inoculação da suspensão direta no solo (SD), inoculação da suspensão direta no solo após 20 dias do plantio (20SD) e pulverização foliar (F),

além de avaliar os efeitos nos parâmetros biométricos de *E. grandis*. Também foi avaliado o comportamento de operárias de três formigueiros (1, 2 e 3) de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* quando exposta, em dois eventos distintos, a testes de escolha com plantas tratadas com *B. bassiana* e controle. Ocorreram diferenças significativas no diâmetro do caule, massa fresca da parte aérea e massa seca da parte aérea em plantas com aplicação de *B. bassiana* pelos métodos SD, 20SD e F, assim como no forrageamento. Ocorreram cortes em todas as plantas na primeira oferta de teste e ocorreu mudança no comportamento de forrageamento das operárias do formigueiro 3 na segunda oferta de teste. Os resultados obtidos neste estudo mostram a eficiência da aplicação de *B. bassiana* pelos métodos SD e 20SD, que promoveu alterações em parâmetros biométricos de *E. grandis*. O uso de plantas de eucalipto tratadas com os métodos citados nesse estudo pode ser uma alternativa para redução de danos de *A. subterraneus subterraneus* por meio de modulações comportamentais.

## ABSTRACT

Leaf-cutting ants are the main herbivores in the Neotropical region, and they cause damage throughout the Brazilian territory, with losses in several types of cultivation, especially in eucalyptus plantations. The main form of damage occurs through defoliation, in which plant material is used as a substrate for the *Leucoagaricus gongylophorus* fungus garden, which is a food source for individuals in the colony. Ants have protective mechanisms against attacks by entomopathogens and mycopathogens from the fungus garden and these protective behaviors increase the difficulty of insect control. The present study aimed to colonize *Eucalyptus grandis* plants with *Beauveria bassiana* through the methods of direct suspension in the soil (SD), direct suspension in the soil after 20 days of planting (20SD) and foliar spray (F). In addition to evaluating the effects of treatments with *B. bassiana* on the biometric parameters of *E. grandis*. The

behavior of workers from three anthills (AC-03, AC-04 and AC-08) of *Acromyrmex subterraneus* when exposed, in two different events, to chance-of-choice tests with plants treated with *B. bassiana* and control was also evaluated. There were significant differences in stem diameter, shoot fresh mass and shoot dry mass in plants with *B. bassiana* application by SD, 20SD and F methods, as well as in foraging of eucalyptus treated with *B. bassiana*. Cuts occurred in all plants in the first test offer and in AC08 an ant killed by *B. bassiana* was identified after the end of the first test offer. There was a change in the foraging behavior of the AC08 workers in the second test offer. The application of *B. bassiana* by the SD and 20SD methods promoted changes in biometric parameters of *E. grandis*. The use of eucalyptus plants treated with the methods mentioned in this study may be an alternative to reduce *A. subterraneus* damage through behavioral modulations.

## INTRODUÇÃO

O cultivo de eucalipto proporciona matéria-prima para diferentes setores no Brasil, tais como a construção civil, fabricação de móveis, fabricação de produtos de madeira, energia elétrica, fabricação de celulose e papel. Entre os estados produtores, Minas Gerais é o maior produtor seguido por São Paulo, mas as características edafoclimáticas brasileiras e as necessidades do cultivo facilitam a produção dessa espécie em diferentes estados (Golfari, 1980; IBÁ, 2021).

Diversas pragas atacam o cultivo de eucalipto e dentre elas, as formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* e *Atta* ocasionam danos em plantas com diferentes idades (Vasconcelos e Cherett, 1997). A principal forma de controle é químico, com iscas químicas granuladas que são transportadas para o interior do ninho e, por conseguinte, disseminam a contaminação para as operárias e resultando no colapso da colônia (Zanetti et al., 2014; Della Lucia et al., 2014; Britto et al., 2016).

O controle químico é agravado pelo uso da substância sulfluramida que é a mais utilizada atualmente e possui o perfluorooctano sulfonil fluoreto (PFOSF) como um composto intermediário na fabricação (GILLJAM et al. 2016). PFOSF faz parte dos poluentes orgânicos persistentes que têm perspectivas de eliminação de uso conforme documento da Convenção de Estocolmo de 2009 (ME, 2015). Pois, a sua capacidade de translocação facilita a contaminação em áreas distantes à aplicação inicial (Gilljam et al., 2015; Nascimento et al., 2018).

Os efeitos negativos de medidas unilaterais em organismos vivos e no ambiente têm estimulado a busca por outras possibilidades de controle (Mejia et al., 2018), sendo biocontrole uma alternativa aos químicos. O controle biológico é um componente do equilíbrio da natureza, no qual os inimigos naturais reduzem a população de insetos-praga (Berti Filho 1990; Araújo et al., 2015).

Dentre as possibilidades de controle biológico, destaca-se o microbiano que é composto por uma grande diversidade de espécies de fungos entomopatogênicos, vírus, bactéria, protozoários e nematoides. A maioria não é patogênica às plantas e pouco tóxica a humanos e animais (Goettel et al., 2005; Skinner et al., 2014). Uma das formas de utilizar o controle microbiano é com endofitismo de plantas. Eze et al. (2019) identificaram *Fusarium equiseti* e *Epicoccum sorghinum* endofíticos com capacidade para o biocontrole através da produção de metabólitos secundários em mamão.

Os fungos *B. bassiana* e *Metarhizium spp.* são os entomopatógenos mais comumente identificados de forma endofítica e colonizam as plantas de modo natural ou induzido através de diferentes técnicas de inoculação (Quesada-Moraga et al., 2009). Os fungos entomopatogênicos endofíticos protegem o hospedeiro de insetos-praga colonizando as raízes, caules e folhas, além de promover benefícios no desenvolvimento da planta (Silva et al., 2020; Jaber; Enkerli, 2017) através de transferência de nutrientes (Behie; Bidochka, 2014). No entanto, ainda são necessários estudos para o melhor entendimento dos endofíticos devido às interferências abióticas, bióticas e inoculação em diferentes espécies de plantas. Em vista disso, o objetivo deste trabalho é colonizar plantas de *Eucalyptus grandis* com *Beauveria bassiana* na forma endofítica a fim de reduzir danos ocasionados por *Acromyrmex subterraneus subterraneus*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Origem dos fungos utilizados e preparo de suspensão fúngica

Foi selecionado um isolado de *B. bassiana* (LPP 139) oriundo da micoteca do Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (LEF). Este isolado foi encontrado no campo, infectando *Hypothenemus hampei* em um cafezal, localizado em Bom Jardim, RJ.

O fungo foi cultivado em meio de cultura SDA (Agar Sabouraud Dextrose) e após crescimento, foram transferidos para arroz parboilizado estéril e mantidos em câmara tipo B.O.D (*Biological Oxygen Demand*) à temperatura de 27°C e fotoperíodo de 12L:12E, como descrito em Silva et al. 2015. Posteriormente, foram transferidos para geladeira, onde foram mantidos até a utilização nos ensaios.

### Coleta e manutenção de formigas cortadeiras

A coleta de ninhos de formigas *A. subterraneus subterraneus* foi realizada em campo no município de Bom Jardim, Rio de Janeiro (22° 09' 07" S e 42° 25' 10" W), com a retirada da colônia composta por rainha(s); jardineiras; operárias e seu fungo simbionte *L. gongylophorus*. As colônias coletadas foram acondicionadas em recipientes plásticos com capacidade de 2L e encaminhadas a Unidade de Mirmecologia da UENF. A identificação da espécie de *Acromyrmex* foi conforme a chave de Fowler et al. (1993).

As colônias foram mantidas em salas com ambiente controlado conforme proposto por Della Lucia et al. (1993), umidade relativa de 70% e temperatura de 27°C e 12 horas de fotoperíodo. *Leucoagaricus gongylophorus* foi cultivado pelas formigas nos recipientes plásticos que permaneciam dentro de bandejas com as bordas revestidas de talco puro, a fim de evitar fuga. Foram ofertadas diariamente folhas de *Acalypha wilkesiana* para o forrageamento das formigas.

## Método de esterilização de sementes de eucalipto

As sementes foram adquiridas comercialmente pelo Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais (IPEF) e foram esterilizadas por imersão em etanol 70% por 1 minuto, seguido de hipoclorito de sódio a 5% acrescido de uma gota de Tween 20® durante 10 minutos. Seguida de três lavagens em água destilada estéril por 2 minutos cada. Foi retirada uma alíquota de 20 µl da última água de lavagem, a qual foi colocada em meio de cultura SDA e deixada em BOD durante 7 dias para verificar a eficiência da esterilização.

As sementes esterilizadas foram colocadas em placa de Petri forrada com papel filtro autoclavado, umedecidas com 1mL de água destilada, e deixadas em câmara úmida por 6 dias, para ocorrência da germinação e confirmação de ausência de efeitos negativos da esterilização na germinação da semente.

## Inoculação de *Eucalyptus grandis* com *Beauveria bassiana*

O experimento foi realizado adotando delineamento inteiramente casualizado. As sementes foram esterilizadas conforme descrito anteriormente. Após o processo de limpeza, foi realizado o plantio em tubetes de 100 cm<sup>3</sup> contendo substrato comercial Basaplant® autoclavado duas vezes a 121°C por 15 minutos. Após o plantio, foram estabelecidas 15 repetições para cada tratamento, controle (C), suspensão direta (SD), suspensão direta após 20 dias de semeadura (20SD) e pulverização foliar após 20 dias de semeadura (F) (Figura 1).

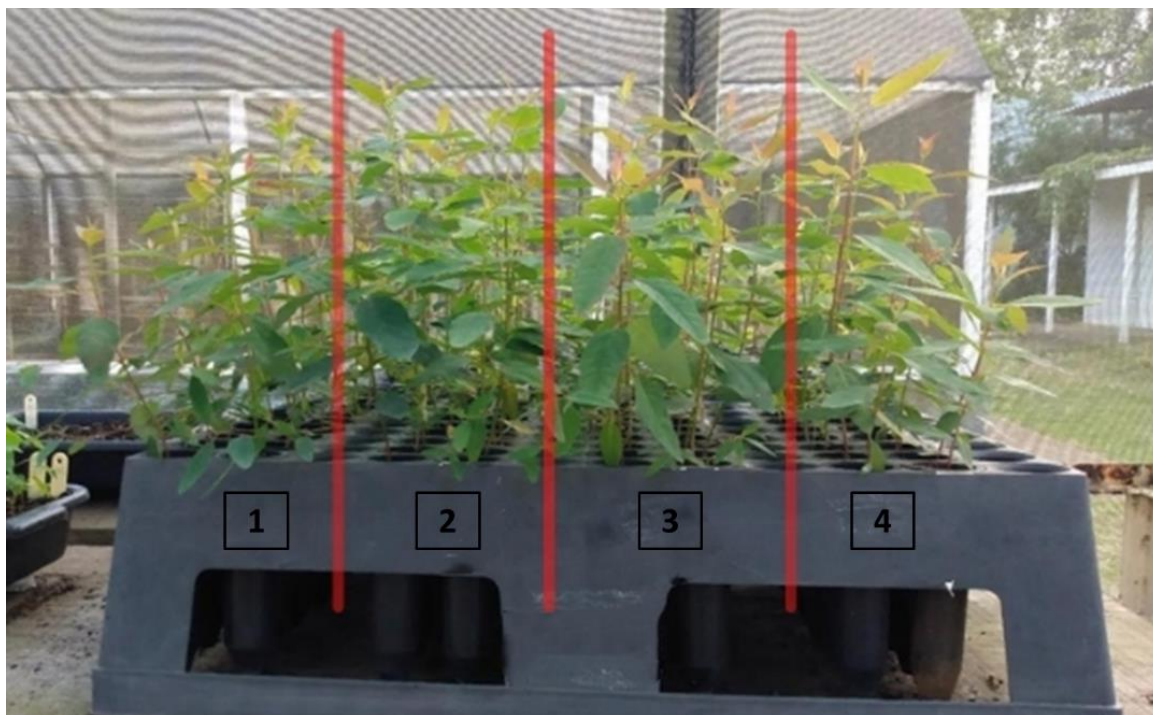


Figura 1. Plantas de *Eucalyptus grandis* para bioensaios de parâmetros biométricos e forrageiros. Números indicam os tratamentos: (1) F – Pulverização foliar, (2) 20SD - Suspensão direta aos 20 dias, (3) SD – Suspensão direta, (4) C - Controle.

As plantas SD foram tratadas com suspensão de  $1 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$  de conídios de *B. bassiana*, no qual foram aplicados 2 mL da suspensão no solo logo após a semeadura. Após 20 dias com crescimento inicial das plantas de eucaliptos e a presença de folhas suficientes, foram realizadas aplicações de 2 mL da suspensão no solo (nas repetições 20SD). Com auxílio de borrifador, foi aplicado 1,5 mL da suspensão com  $1 \times 10^8 \text{ conídios/mL}^{-1}$  nas repetições do tratamento F. Para aplicação foliar também foram utilizados sacos plásticos para criar microambiente com elevada umidade e o colo das plantas foi protegido com papel alumínio para prevenir o contato da suspensão com o solo (Figura 2).





Figura 2. Proteção do substrato para aplicação do tratamento de pulverização foliar em *Eucalyptus grandis*.

As plantas foram mantidas em condição de semicampo em casa de vegetação com sombrite 50% e regadas sempre que necessário. Após 90 dias, foi realizada avaliação da presença ou ausência endofítica em 5 repetições de cada tratamento, no qual as plantas foram lavadas em água destilada estéril por 3 vezes durante 2 minutos em cada. Em seguida, as plantas foram divididas em parte aérea e parte radicular e realizado maceramento com auxílio de um cadinho e pistilo de porcelana e água destilada autoclavada, seguido de diluição seriada até  $10^{-2}$  do extrato em água destilada e autoclavada. A solução de  $10^{-2}$  do extrato foi colocada em meio de cultura SDA e mantida em B.O.D, à temperatura de  $27^{\circ}\text{C}$ , e fotoperíodo 12L:12E para confirmação de colonização por *B. bassiana*.

#### Avaliação de parâmetros biométricos das plantas

Aos 90 dias também foram realizadas avaliações de parâmetros biométricos em 5 repetições de cada tratamento. Foi mensurado o diâmetro do caule (DC), altura das plantas (H), número de folhas (NF), área foliar (AF), massa

fresca da parte aérea (MFA), massa seca da parte aérea (MSA), massa fresca da parte radicular (MFR) e massa seca da parte radicular (MSR). O diâmetro do caule foi mensurado com auxílio de paquímetro digital e as massas frescas foram determinadas com auxílio de balança analítica. Para obtenção da massa seca, as partes áreas e radiculares foram secas em estufa de circulação de ar forçado a 70°C por 24 horas e, posteriormente, pesadas em balança analítica. A área foliar foi mensurada com auxílio do medidor de área foliar LI-3100C (LI-COR Biosciences).

#### Bioensaios de forrageamento de *Eucalyptus grandis* tratados com *Beauveria bassiana*

Foram realizados testes para avaliar os efeitos das plantas tratadas na aceitação das formigas operárias, 90 dias após o plantio em duas ofertas. Para realização do teste de escolha foram montadas três arenas de forrageamento para três colônias de *A. subterraneus subterraneus* com 4 L de jardim de fungo (denominadas: 1, 2 e 3). Os formigueiros foram mantidos em sala criação com 12 horas de fotoperíodo, umidade relativa de 70%, temperatura de 27°C. Para a realização da oferta das mudas de eucalipto, as colônias permaneceram 24 horas sem recurso alimentar, previamente ao teste.

Para 1º oferta, foi realizada a mensuração das áreas foliares iniciais e finais com auxílio de scanner (Tecnal® CI-202) (Figura 3-A) e, posteriormente, as plantas foram dispostas a uma repetição de cada tratamento, de forma equidistante, em cada arena de forrageamento dos três formigueiros (Figura 3-B, C e D). A repetição era composta por uma planta de eucalipto em tubete e com suporte de recipiente plástico adaptado para manter o tubete sempre na posição vertical. Foram realizados pré-testes para confirmar a capacidade com que as formigas percorrem o suporte plástico e realizar o corte de plantas mantidas no tubete. As plantas permaneceram nas arenas de forrageamento por 24 horas, que foi o tempo necessário para que as formigas realizassem o corte de todas as plantas presentes na arena. Durante a oferta dos eucaliptos foram realizadas observações comportamentais das formigas.

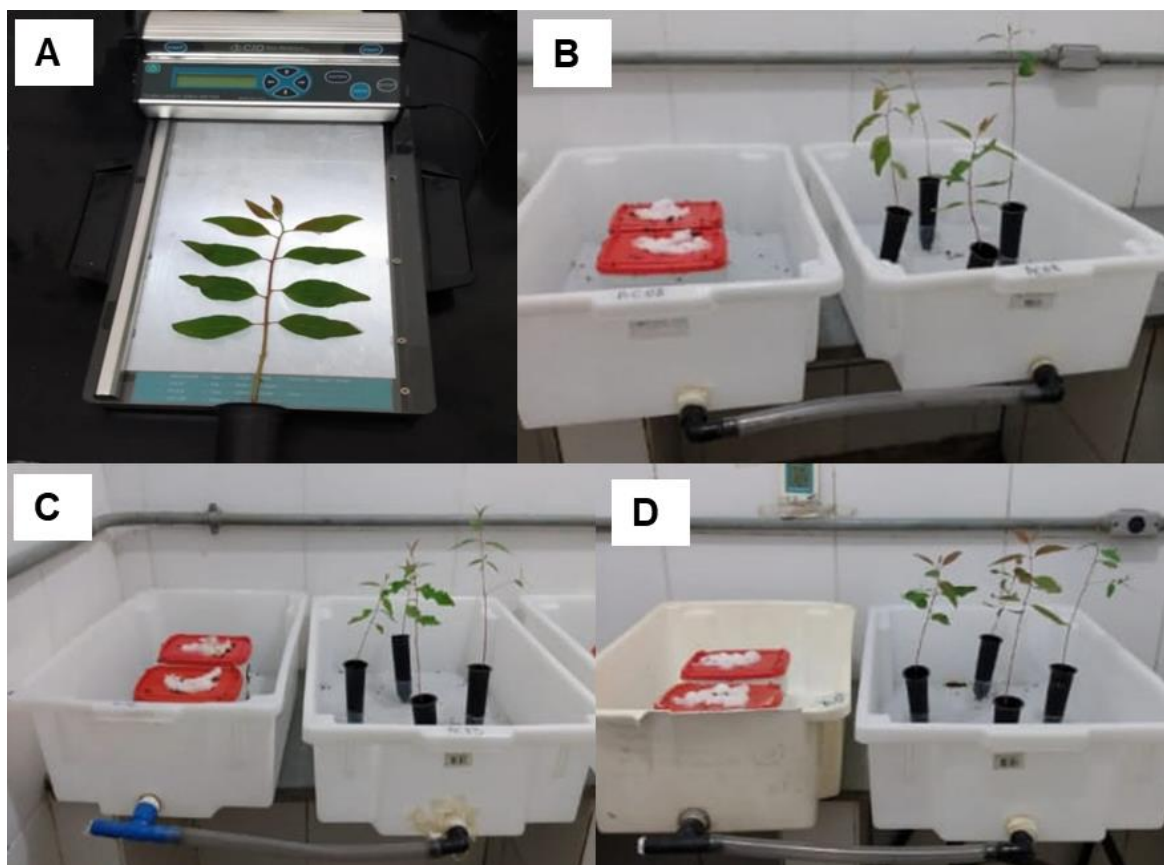


Figura 3. Obtenção da área foliar de *Eucalyptus grandis* usando medidor de área foliar (A), formigueiros de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* em teste com *Eucalyptus grandis* tratados com *Beauveria bassiana*. Letras indicam os formigueiros: (B) 3, (C) 2 e (D) 1.

Após as 24 horas, foram retiradas todas as plantas de todos os formigueiros e foi realizada a mensuração das áreas foliares restantes. A 2ª oferta ocorreu após 7 dias, no qual foi realizada a mesma metodologia utilizada na 1ª oferta. A aceitação ou rejeição dos tratamentos ocorreu pela diferença entre as áreas foliares iniciais e finais. Foram contabilizadas e retiradas todas as formigas mortas durante o primeiro e segundo dia após o encerramento da oferta dos eucaliptos na 1ª e 2ª ofertas. A confirmação das mortes por *B. bassiana* foi realizada através da conidiogênese nos cadáveres transferidos para câmaras úmidas e acondicionados em câmara úmida em placa de Petri forrada com papel filtro umedecido com água autoclavada.

## Análise dos dados

Os valores das médias de DC, H, NF, AF, MFA, MSA, MFR e MSR foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Scott e Knott ( $\alpha = 0,05$ ) e analisados usando com o software SISVAR v. 5.7. Os dados de forrageamento foram submetidos a ANOVA seguido de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ) e analisados com auxílio do software Sigma-Plot v. 12.5, assim como para obtenção do gráfico de forrageamento.

## RESULTADOS

### Parâmetros biométricos

As médias dos parâmetros: diâmetro do caule, massa fresca da parte aérea e massa seca aérea foram estatisticamente diferentes entre os métodos de inoculação e controle pelo teste de Scott e Knott ( $\alpha=5\%$ ,  $P= < 0,05$ ). O diâmetro do caule variou de 0,21 mm a 0,26 mm, sendo os métodos de inoculação SD e 20SD (0,26 mm) com as maiores médias e diferentes estatisticamente de C e F. As médias de C e F foram estatisticamente iguais pelo teste de Scott e Knott ( $\alpha=5\%$ ) com, respectivamente, 0,21 e 0,22 mm (Tabela 1).

Para a massa fresca e seca da parte aérea, as médias dos tratamentos SD, 20SD e F foram estatisticamente iguais entre si e diferentes do controle ( $P= < 0,05$ ). A massa fresca da parte aérea variou de 0,92 a 1,53 g, sendo o tratamento SD com a maior média e seguido pelos tratamentos F (1,50 g), 20SD (1,26 g) e C (0,92 g). Já para a massa seca aérea o tratamento F foi a maior média (0,66 g), seguido por SD (0,62 g), 20SD (0,56 g) e C (0,39 g). As médias dos parâmetros massa fresca de raiz, massa seca de raiz, número de folhas e área foliar não foram estatisticamente diferentes entre si pelo teste de Scott e Knott ( $\alpha=5\%$ ,  $P= > 0,05$ ) (Tabela 1).

Tabela 1. Crescimento de plantas de *Eucalyptus grandis* tratadas após 90 dias com Suspensão direta (SD), Suspensão direta aos 20 dias (20SD), Pulverização foliar (F) e Controle (C). Número de folhas (NF), Altura (H), Diâmetro do caule (DC), Área foliar (AF), Massa fresca da parte aérea (MFA), Massa seca da parte aérea (MSA), Massa fresca da raiz (MFR), Massa seca da raiz (MSR)

<b>Tratamento</b>	<b>NF</b>	<b>H (cm)</b>	<b>DC (mm)</b>	<b>AF (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>MFA (g)</b>	<b>MSA (g)</b>	<b>MFR (g)</b>	<b>MSR (g)</b>
C	11,6 a	19,34 a	0,21 b	16,15 a	0,92 b	0,39 b	1,46 a	0,14 a
SD	22 a	24,82 a	0,26 a	29,02 a	1,53 a	0,62 a	1,68 a	0,16 a
20SD	25 a	23,88 a	0,26 a	34,02 a	1,26 a	0,56 a	1,53 a	0,16 a
F	33 a	23,06 a	0,22 b	34,75 a	1,50 a	0,66 a	1,29 a	0,15 a
CV (%)	53,43	15,40	14,32	54,79	18,35	22,82	21,90	16,85

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott e Knott ( $\alpha=5\%$ ).

### Forrageamento e comportamento de *Acromyrmex subterraneus subterraneus*

O resultado do consumo foliar quando comparado o tratamento na 1° e 2° oferta foi estatisticamente diferente pelo teste de Tukey ( $\alpha=5\%$ ,  $P<0,05$ ) (Figura 4). As diferenças estatísticas ocorreram entre as ofertas dos tratamentos 20SD, F e C ( $p<0,05$ ), diferente do observado no tratamento SD que não obteve diferença estatística entre as ofertas ( $\alpha=5\%$ ,  $P=>0,05$ ). Foram observados os maiores valores de consumo foliar após a 1° oferta, com destaque o tratamento F com aproximadamente 60 cm<sup>2</sup> de corte. Após a segunda oferta houve mudança, no qual o maior consumo foi no tratamento SD com 20 cm<sup>2</sup> de corte.

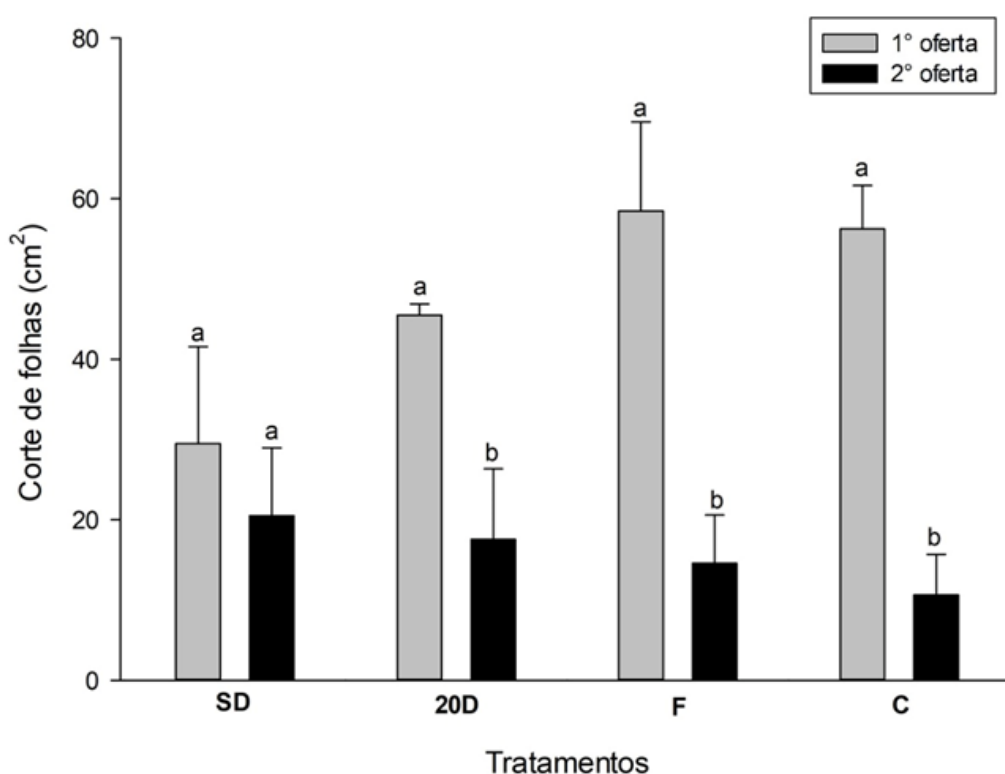


Figura 4. Corte foliar (via forrageamento) de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* em *Eucalyptus grandis* tratada com Suspensão direta (SD), Suspensão direta aos 20 dias (20SD), Spray foliar (F) e Controle (C).

Os três formigueiros de *A. subterraneus subterraneus* selecionados para os ensaios possuíam características comportamentais diferentes entre si. O formigueiro 2 era mais ativo com a presença constante de formigas na arena de forrageamento, tanto durante o período de 24h sem a oferta de material vegetal

quanto na execução do experimento. Já o formigueiro 1 era menos ativo, com maior número de formigas dentro dos recipientes com fungo simbiote e poucas na arena de forrageamento. O formigueiro 3 era intermediário quanto ao nível de atividade fora do recipiente com fungo simbiote.

Na 1ª oferta de eucalipto, as formigas do formigueiro 2 começaram a percorrer e iniciar o corte pela planta controle logo após a acomodação das plantas na arena de forrageamento. Já as formigas do formigueiro 1 não iniciaram o reconhecimento da planta logo após a acomodação, mas com o decorrer do tempo iniciaram o corte pelo tratamento 20SD. Algumas formigas do formigueiro 1 apresentaram o comportamento de permanecer paradas próximas ao orifício basal dos tubetes (Figura 5). As formigas do formigueiro 1 iniciaram o reconhecimento das plantas pelo tratamento 20SD, mas o primeiro corte ocorreu na planta controle. Foram contabilizadas 59 formigas mortas após a 1ª oferta e em apenas uma ocorreu conidiogênese de *B. bassiana* identificada no lixo do formigueiro 3.



Figura 5. Operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* do formigueiro 1 próximas ao orifício basal dos tubetes durante a 1ª oferta do teste de consumo foliar de *Eucalyptus grandis*. Setas vermelhas indicam a presença de operárias.

O comportamento mais distinto na 2ª oferta ocorreu com as formigas do formigueiro 3, pois foram as mais ativas quanto à movimentação e menos em relação ao forrageamento entre os três formigueiros, com destaque ao tratamento 20SD que não teve corte. Ao invés de realizar o corte das folhas, as operárias do formigueiro 3 retiraram todo o substrato e cortaram as raízes (Figura 6). As formigas dos formigueiros 2 e 1 iniciaram o corte, respectivamente, por SD e 20SD. As formigas do formigueiro 1 repetiram o comportamento de formigas em permanecer próximas ao orifício basal do tubetes (Figura 7). Em alguns momentos, os cortes recentes não eram imediatamente carregados para dentro do recipiente que continha o fungo, mas todos os cortes foram carregados e incorporados ao fungo simbiote e não identificados no lixo. Foram identificadas 52 operárias mortas após a 2ª oferta.

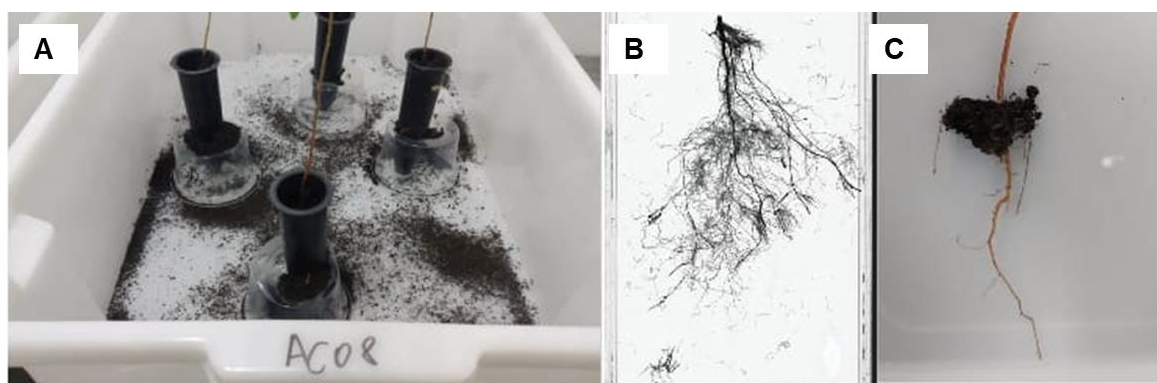


Figura 6. Comportamento de operárias de *Acromyrmex subterraneus* do formigueiro 3 após a 2ª oferta com *Eucalyptus grandis*. (A) Formigueiro após a 2ª oferta do teste, (B) Exemplo de raiz de *Eucalyptus grandis* inoculado pelo método 20SD e (C) Corte de raízes no método 20SD após a 2ª oferta do teste.



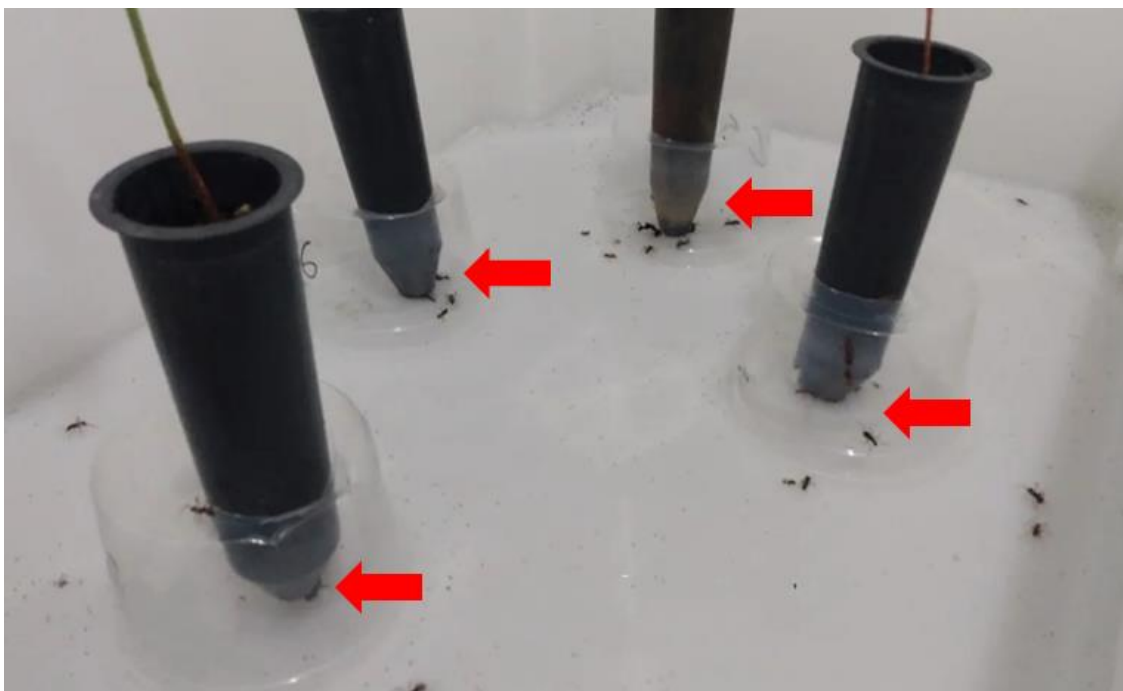


Figura 7. Operárias de *Acromyrmex subterraneus* do formigueiro 1 próximas ao orifício basal dos tubetes durante a 2ª oferta do teste com *Eucalyptus grandis*. Setas vermelhas indicam a presença de operárias.

## DISCUSSÃO

### Parâmetros biométricos

O experimento foi conduzido durante os meses de agosto a outubro de 2021. Durante esse período o município de Campos dos Goytacazes obteve uma amplitude de temperatura de 14 °C a 38 °C com umidade relativa do ar máxima de 99% e mínima de 31% (dados obtidos através de Data logger). De acordo com Martind et al. (2007), Almeida et al. (2004) e Dye et al. (2004), as temperaturas basais para o desenvolvimento de mudas de *E. grandis* estão entre 10°C e 36°C, portanto, a execução do experimento ocorreu dentro de níveis aceitáveis para o desenvolvimento da cultura. Foram necessários turnos de rega em virtude da distribuição da chuva no decorrer dos meses. O déficit hídrico é um dos fatores de redução no desenvolvimento de *E. grandis*, uma vez que a espécie concentra-se,

preferencialmente, em regiões de baixadas ou vales e está associada a florestas pluviais (Barros, 1990; Correia et al. 2019).

Independente de fatores climáticos adversos, foram observadas diferenças significativas entre o tratamento com *B. bassiana* e o controle nos parâmetros biométricos relacionados à parte aérea da planta. As médias de DC, MFA e MSA apresentaram diferenças estatísticas. Outras pesquisas com aplicação de fungos entomopatogênicos de modo endofítico em plantas de eucalipto também observaram diferenças na parte aérea da planta. Chagas Junior et al. (2021) demonstraram a capacidade de diferentes isolados de *Trichoderma* em estimular o crescimento e aumentar as médias de DC, MFA e MSA em plantas de *Eucalyptus urophylla* em avaliações até 100 dias após o plantio. Os mesmos autores verificaram a existência de especificidade entre o eucalipto com determinados isolados de *Trichoderma*. Azevedo et al. (2017) também utilizaram *Trichoderma* em *Eucalypto camaldulensis* e observaram aumentos em NF, MSA e MSR. Já Batista et al. (2022) em estudo com *Eucalypto urophylla* colonizado com *Trichoderma strigosellum*, identificaram diferenças na MSA, MSR e massa total e utilizando métodos SD, F e a combinação de sementes com micélio.

*Beauveria bassiana* é mais adaptado ao endofitismo em comparação com outros entomopatógenos, como o *Metarhizium robertsii* (Tomilova et al., 2021). Os resultados do presente estudo confirmam a hipótese dos efeitos positivos de *B. bassiana* endofítico em parâmetros de desenvolvimento de eucalipto. Essa interação positiva pode ocorrer em virtude de *B. bassiana* ser capaz de induzir proteínas relacionadas à fotossíntese, ao estresse e ao metabolismo energético (GOMEZ-VIDAL et al., 2009). Além de aumentar o acúmulo de fósforo, manganês, cobre, zinco e boro (ALVEZ et al., 2021). Assim como o aumento de alcaloides devido à síntese de metabolitos secundários no hospedeiro (Espinosa et al., 2019). Porém, não confirmados nesse estudo.

Além de alterações fisiológicas, o crescimento das plantas por *B. bassiana* pode ser desencadeado por aumento na biodisponibilidade de macro e micronutrientes, tais como solubilização de fosfato, aumento da disponibilidade de nitrogênio, aumento da concentração de cálcio e na redução da acidez potencial (Zitlalpopoca-Hernandez et al., 2017; Pal e Ghosh, 2018; Barra-Bucarei et al., 2020; Alvez et al., 2021). Em estudos com a utilização de *B. bassiana* endofítico já foram relatados resultados positivos para H em *Citrus limon* (Bamisile et al.,

2019), H, NF e MFA em *Vicia faba* (Jaber; Enkerli, 2017), massa seca e fresca de *Brassica oleracea* em cultivo hidropônico (Thaochan et al., 2021). Todavia, um dos obstáculos no estudo de endofíticos é a influência da forma de inoculação.

No estudo em questão foi observado que a aplicação de *B. bassiana* com os métodos SD e 20SD foi significativa para DC, MFA e MSA e apesar de não ter sido confirmada a colonização de *B. bassiana* em nenhum dos métodos utilizados, foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos e o controle. Estudos de Jaber e Enkerli (2017), Sánchez-Rodríguez et al. (2018) Afandhi et al. (2019), Wei et al. (2020) e Thaochan et al. (2021) confirmaram a presença de *B. bassiana* endofítico através da colonização da planta com os métodos SD e F e também observaram influência positiva do endofítico em parâmetros biométricos das plantas estudadas.

As espécies do gênero *Beauveria* possuem uma relação de proximidade com o ambiente terrestre, pois são frequentemente isolados do solo (Soares et al., 2017). Já foi registrado o reisolamento de *B. bassiana* em substrato 7 semanas após a inoculação com suspensão de conídios (Zitlalpopoca-Hernandez et al., 2017). Os mesmos autores observaram o aumento de nitrogênio na parte aérea após a inoculação de *B. bassiana* e fungos micorrízicos no substrato. A presença de endofíticos pode variar em função dos estádios de crescimento da planta, estação do ano e localidade (Rodrigues, 1994).

As taxas de endofitismo por *B. bassiana* aumentaram após as inoculações sucessivas em plantas de algodão e, também foi observado a estabilização da virulência contra *Galleria mellonella* mesmo após as constantes inoculações artificiais (Gonzalez-Mas et al., 2021). Portanto, poderá ocorrer maior sucesso no endofitismo de *B. bassiana* em *E. grandis* após processos continuados de reisolamento e inoculação. Ainda são necessários estudos sobre a relação de fungos endofíticos e hospedeiros, pois os fungos endofíticos são um dos componentes mais importantes no microecossistema, e possuem influência positiva no hospedeiro tanto para o desenvolvimento quanto para proteção contra insetos (Jia et al., 2016; McKinnon et al., 2018).

Forrageamento e comportamento de *Acromyrmex subterraneus subterraneus*

Foi hipotetizado por Rocha et al. (2017) que *Atta sexdens rubropilosa* não teria conseguido identificar *Trichoderma* na forma endofítica e, portanto, não ocorreram diferenças entre o aceite e rejeição de material vegetal. Os autores também mencionam que a falta de infecção no jardim de fungo pode ter contribuído nos dados de aceite. No presente estudo, foi utilizado *B. bassiana*, que tem como característica a infecção de insetos, portanto, os efeitos negativos podem ocorrer de forma indireta aos jardins, devido à simbiose entre formiga-fungo. A principal alteração no forrageamento ocorreu na 2ª oferta das formigas do formigueiro 3 que, possivelmente, foi resultado de interações na relação planta-formigas.

O maior consumo foliar de *E. grandis* pelas formigas dos formigueiros 1 e 2, pode ter ocorrido pela falta de identificação de *B. bassiana* nas plantas de eucalipto, como mencionado anteriormente em Rocha et al. (2017). Outro aspecto importante é a produção de metabolitos voláteis que não foi avaliada no presente estudo, mas são responsáveis por alterações na relação inseto-planta (Zakir et al., 2013). González-Mas et al. (2021) confirmaram em primeiro estudo a influência de *B. bassiana* endofítico na produção de voláteis em plantas de algodão e melão antes e depois de injúrias por mastigação e sucção. Os mesmos autores identificaram mais de cem voláteis, tais como derivados de plantas, insetos, induzidos por herbívoros, marcadores de endofitismo, antifúngicos, antimicrobianos e outros. Em contrapartida, na complexa relação formiga-fungo simbiote foi confirmado que *A. sexdens rubropilosa* altera o comportamento por efeitos negativos de toxicidade em operárias e no fungo simbiote (Sousa et al., 2020).

As formigas possuem a capacidade de aprendizado e memória para rejeitar alimentos que ocasionem danos à colônia. A identificação de material vegetal nocivo à colônia ocorre através dos sentidos olfativo, gustativo e tátil, porém apenas com estímulos odoríferos da planta é o suficiente para que as formigas recordem sobre os efeitos negativos de contaminação nas operárias e redução do jardim de fungos (Ridley et al., 1996; Saverschek e Roces, 2011). Por exemplo, *Acromyrmex ambiguus* rejeita folhas tratadas com cicloheximida, substância fungicida, após o primeiro dia de incorporação ao fungo simbiote e mantém o mesmo comportamento após 15 dias, confirmando a capacidade de aprendizado e memória de formigas cortadeiras (Falibene et al., 2015). Em outro

estudo, Teodoro (2021) demonstrou em ensaios de ofertas subsequentes de iscas contendo o fungo *Escovopsis* ssp. para colônias de *A. subterraneus* que a taxa de aceitação das iscas na segunda oferta foi significativamente menor do que a aceitação na primeira oferta.

As diferenças entre as duas ofertas podem ser hipotetizadas pelos primeiros cortes ocorridos em cada formigueiro, no qual as formigas dos formigueiros 1 e 3 iniciaram o corte nas plantas C, que foi a segunda maior área cortada na primeira oferta. Possivelmente, ocorreu algum reconhecimento de perigo para a colônia e houve redução no consumo dos outros tratamentos. Já na segunda oferta, os cortes iniciaram nos tratamentos SD e 20SD, que foram as maiores áreas consumidas e a capacidade de memória das formigas auxiliou no reconhecimento do antigo perigo e reduziu o forrageamento nas plantas de eucalipto.

Van Bael et al. (2012) verificaram diferenças no comportamento de corte quanto à presença de endofíticos, no qual ocorreu maior tempo de exploração de *A. colombica* em folhas de *Merremia umbellata* com alta densidade de endofíticos em comparação com folhas com baixa densidade, ou seja, as formigas utilizavam mais tempo para percorrer e reconhecer a folha e depois cortar. Os mesmos autores supõem que as técnicas de limpeza das formigas em material foliar colonizado por endofíticos são generalistas, pois não identificaram diferenças significativas em comparação entre material vegetal com única ou múltiplas cepas. Em estudo com chance de escolha de *A. colombica* a *Cucumis sativus*, observaram que folhas de *C. sativus* com altas concentrações de *Colletotrichum tropicale* ( $10^6$  e  $10^7$  conídios.mL<sup>-1</sup>) foram menos cordatas em comparação a folhas não tratadas, além disso houve um maior número de formigas para cortar folhas não tratadas (Estrada et al., 2013).

A variação comportamental de forrageamento de formigas cortadeiras também ocorre quanto à presença de determinadas espécies endofíticas no material vegetal escolhido para o forrageamento e substrato vegetal já conhecido, como demonstrado em estudos de Machado et al. (2021), em que *A. sexdens* preferiu folhas de plantas mais atrativas (*Acalypha wilkesiana*) com uma maior diversidade de endófitos em comparação a uma menos atrativa (*Colocasia esculenta*) na presença de *Fusarium*. Tal como foi relatado que as formigas possuem a capacidade de aprendizagem e detecção mais rápida de rotas para

coletar alimentos que já exista uma preferência ao forrageamento (Saar et al., 2020).

Os danos de formigas cortadeiras em *E. grandis* podem ocasionar perdas com a redução de 10,88 mm no DC e 0,72 m de H em eucaliptos com seis meses de idade (De Oliveira et al., 2014). Enquanto que plantas com inoculação de *B. bassiana*, como exemplo, o milho tiveram a rizosfera colonizada após estresse por simulação de herbivoria. Dessa forma, demonstrando que o estresse da herbívora pode ocasionar melhorias nos resultados de controle biológico por maior susceptibilidade de colonização da planta pelas raízes (McKinnon et al., 2018). Em relação à presença de formigas próximas aos orifícios dos tubetes, possivelmente, deve-se à presença de água que percolou após a rega, pois formigas forrageadoras tendem a ingerir mais líquidos que operárias menores e reconhecimento de algo novo ou estranho na área de forrageamento (Howard e Tschinkel, 1981; Dussutour et al., 2008).

Devido à importância das formigas cortadeiras no cultivo de eucalipto e às diferentes repostas quando em exposição a plantas colonizadas ou não por fungos entomopatogênicos endofíticos, fundamentam a necessidade de estudos para indicações de alternativas de redução de danos ocasionados por esses insetos. Além disso, o estudo de *B. bassiana* como promotor de crescimento e proteção de eucalipto pode ser explorado em diferentes estádios de desenvolvimento, uma vez que ocorre a presença de determinadas espécies de fungos endofíticos em cada estágio (Miguel et al., 2019).

## CONCLUSÕES

Não foi confirmada por ensaio *in vitro* a colonização endofítica de *B. bassiana* em *E. grandis*. Entretanto, foram observadas diferenças nos parâmetros biométricos de diâmetro do caule, massa fresca da parte aérea e massa seca da parte aérea nos métodos de inoculação de suspensão direta no solo, suspensão direta no solo após 20 dias de semeadura e *spray* foliar. Contudo, são

necessários mais testes para confirmação de colonização de *B. bassiana* endofítica em *E. grandis*.

O forrageamento de eucalipto tratado com *B. bassiana* de modo endofítico foi alterado após a primeira oferta, no qual ocasionou redução nos consumos foliares após a segunda oferta. Dessa forma, demonstrando a vantagem no uso de técnicas de colonização endofítica de *B. bassiana* para o cultivo de plantas de eucalipto.

Ocorreram alterações no comportamento de operárias de *A. subterraneus* de um dos formigueiros utilizados. Dessa forma, a utilização de *B. bassiana* de modo endofítico em *E. grandis* pode ser uma alternativa para redução dos danos de *A. subterraneus* por meio de modulações comportamentais. Todavia, vale destacar a necessidade de mais estudos com as metodologias utilizadas, em virtude de influências abióticas no crescimento da planta colonizada e teste com um maior número de formigueiros.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afandhi, A., Widjayanti, T., Emi, A.A. L., Tarno, H., Afiyanti, M., Sari, R.N. (2019) Endophytic fungi *Beuveria bassiana* Balsamo accelerates growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 6:1-6.
- Almeida, A.C., Landsberg, J.J., Sands, P.J. (2004) Parameterisation of 3-PG model for fast-growing *Eucalyptus grandis* plantations. *Forest Ecology and Management*. 193:179-195.
- Alves, G.S., Bertini, S.C.B., Barbosa, B.B., Pimentel, J.P., Ribeiro Junior, V.A., Mendes, G.O., Azevedo, L.C.B. (2021). Fungal endophytes inoculation improves soil nutrient availability, arbuscular mycorrhizal colonization and common bean growth. *Rhizosphere*. 18:1-10.

- Araújo, M.S., Rodrigues, C. A., Oliveira, M.A., Jesus, F.G. (2015) Controle biológico de formigas-cortadeiras: o caso da predação de fêmeas de *Atta* spp. por *Canthon virens*. *Revista de Agricultura Neotropical*. 2:8–12.
- Araújo, M.S., Rodrigues, C.A., Oliveira, M.A., Jesus, F.G. (2015) Controle biológico de formigas-cortadeiras: o caso da predação de fêmeas de *Atta* spp. por *Canthon virens*. *Revista de Agricultura Neotropical*. 2:8-12.
- Azevedo, G.B., Novaes, Q.S., Oliveira, S.A.G.T., Silva, H.F., Sobrinho, G.G.R., Novaes, A. B. E (2017) Effect of *Trichoderma* spp. on *Eucalyptus camaldulensis* clonal seedlings growth. *Scientia Forestalis*. 45: 343-352.
- Bael, S.A., Seid, M.A., Wcislo, W.T. (2012) Endophytic fungi increase the processing rate of leaves by leaf-cutting ants (*Atta*). *Ecological Entomology*. 37:318-321.
- Bamisile, B.S., Dash, C.K., Akutse, K.S., Qasim, M., Aguila, L.C., Wang, F., Keppanan, R., Wang, L. (2019) Endophytic *Beuaveria bassiana* in foliar-treated Citrus limon plants acting as a growth supressor to three successive generation of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). *Insects*. 19:1-15.
- Barra-Bucari, L., González, M.G., Iglesias, A.F., Aguayo, G.S., PeNalosa, M. G., Vera, P. V. (2020) *Beauvaria bassiana* multifunction as na endophyte: grwth promotion and biologic of trialeurodes vaporariorum, (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae) in tomato. *Insects*. 11:591.
- Barros, N.F. (1990) Relação Solo-Eucalipto. (ed) Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 330p.
- Batista, K.O.M., Silva, D.V., Nascimento, V.L., Souza, D.J. (2022) Effects of *Thichoderma strigosellum* in *Eucalyptus urophylla* development and leaf-cutting ant behavior. *Journal of Fungi*. 8:1-14.
- Behie, S.W., Bidochka, M.J. (2014) Ubiquity of insect-derived nitrogen transfer to plants by endophytic insect-pathogenic fungi: An additional branch of the soil nitrogen cycle. *Applied and Environmental Microbiology*. 80:1553–1560.
- Berti Filho, E. (1990) O controle biológico dos insetos-praga, p. 87-104. In: Crocomo, W. B. (ed.), Manejo Integrado de Pragas. São Paulo, Unesp, p. 358.
- Bittleston, L., Brockmann, F., Wcislo, W., Van Bael, S. (2011) Endophytic fungi reduce leaf-cutting ant damage to seedlings. *Biology Letters*. 7:30–32.



- Bollazzi, M., Roces, F. (2011) Information needs at the beginning of foraging: Grass-cutting ants trade off load size for a faster return to the nest. *Plos One*. 6:1-9.
- Britto, J.S., Forti, L.C., Oliveira, M.A., Zanetti, R., Wilcken, C.F., Zanuncio, J.C., Loeck, A.E., Caldato, N., Nagamoto, N.S., Lemes, P.G., Camargo, R.S. (2016) Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. *International journal of research in environmental studie*. 3:11-92.
- Chagas Junior, A.F., Gomes, F.L., Souza, M.C., Martins, A., Oliveira, R.S., Giongo, M., Chagas, L.F.B. (2021) *Thichoderma* como promotor de crescimento de mudas de eucaliptos. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*. 9:60-72.
- Correia, T.P., Prado, D.O., Lyra, G.B., Araújo, E.J.G., Lyra, G.B. (2019) Edaphic-climatic zoning of *Eucalyptus* species in the Rio de Janeiro State, Brasil. *Floresta e ambiente*. 1:1-10.
- De Oliveira, M.A., De Castro Della Lucia, T.M., Della Lucia, R.M., Dos Anjos, N., Da Silva Araujo, M., Leite, B.S. (2014) The simulated effect of defoliation in the growth of the *Eucalyptus grandis*. *Chimical Engineering Transactions*. 39:1543-1548.
- Della Lucia, T.M.C., Gandra, L.C., Guedes, R.N.C. (2014). Managing leaf-cutting ants: peculiarities; trends and challenges. *Pest Management Science*. 70:14-23.
- Dornhaus, A., Powell, S. (2010) Foraging and defense strategies. In L. Lach, C. Parr, e K. L. Abbott (Eds.), *Ant ecology*. Oxford, UK: Oxford University Press, p. 210-232.
- Dussutour, A., Deneubourg, J.L., Beshers, S., Fourcassi, V. (2009) Individual e collective problem-solving in a foraging context the leaf-cutting ant *Atta colombica*. *Animal Cognition*. 1:21–30.
- Dye, P.J., Jacobs, S., Drew, D. (2004) Verification of 3-PG growth and water-use predictions in twelve *Eucalyptus* plantation stands in Zululand, South Africa. *Forest Ecology and Management*, v:197-218.
- Espinosa, F., Vidal, S., Rautenbach, F., Lewu, F., Nchu, F. (2019) Effects of *Beuaveria bassiana* (Hypocreales) on plant growth and secondary

- metabolites of extracts of hydroponically cultivated chive (*Allium schoenoprasum* L. [Amaryllidaceae]). *Heliyon*. 5:1-6.
- Estrada, C., Wcislo, W.T., Van Bael, A. (2013). Symbiotic fungi alter plant chemistry that discourages leaf-cutting ants. *New Phytologist*. 198: 241–251.
- Eze, P.M., Abonyi, D.O., Abba, C.C., Proksch, P., Okoye, F.B.C., Esimone, C.O. (2019) Toxic, but beneficial compounds from endophytic fungi of *Carica papaya*, *The EuroBiotech Journal*. 3:105-111.
- Falibene, A., Roces, F., Rössler, W. (2015) Long-term avoidance memory formation is associated with a transiente increase in mushroom body synaptic complexes in leaf-cutting ants. *Front. Behav. Neurosci*. 9:84.
- Fowler, H.G., Della Lucia, T.M.C., Moreira, D.D.O. (1993) Posição taxonomica das formigas cortadeiras. p 4-25. *In: Della Lucia TMC (org). As formigas cortadeiras*. Viçosa: Folha de Viçosa, 262p.
- Gilljam, J., Leonel, J., Cousins, I., Benskin, J.P. (2015) Is Ongoing Sulfloramid Use in South America a Significant Source of Perfluorooctanesulfonate (PFOS)? Production Inventories, Environmental Fate, and Local Occurrence. *Environmental Science & Technology*. 50:653–659.
- Goettel, M.S., Eilenberg, J., Glare, T. (2005) Entomopathogenic Fungi and their Role in Regulation of Insect Populations. *In: GILBERT, L. I; GILL, S. S. (Eds.) Insectcontrol biological andsynthetic agents*.\_San Diego: Academic Press, p. 361-405.
- Golfari, L. (1980) *Manual de Reflorestamento do Estado do Rio de Janeiro* 1. ed. Rio de Janeiro: Secretaria de Planejamento e Coordenação Geral do Governo do Estado do Rio de Janeiro, 382p.
- Gomez-Vidal, S., Salinas, J., Tena, M., Lopez-Llorca, L.V. (2009) Proteomic analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) responses to endophytic colonization by entomopathogenic fungi. *Electrophoresis*. 30:2996–3005.
- Gonzalez-Mas, N., Valverde-García, R., Gutiérrez-Sánchez, F., Quesada-Moraga, E. (2021) Effect of passage though the plat on virulence and endophytic behavioural adaptation in the entomopathogenic fungus *Beuaveria bassiana*. *Biological Control*. 160:1-7.
- Gordon, D.M. (1996). The organization of work in social insect colonies. *Nature*. 380:121-124.

- Hölldobler, B.K., Wilson, E. (1977). Weaver Ants. *Scientific American*. 237:146-155.
- Howard, D.F. e Tschinkel, W.R. (1981). Internal distribution of liquid foods in isolated Workers of the fire ant, *Solenopsis invicta*. *Journal of Insect Physiology*. 27:67-74.
- Industria Brasileira de Árvores – IBÁ. Relatório anual IBÁ 2021. São Paulo Studio 113, 2021, 93p.
- Jaber, L.R., Ownley, B.H. (2018) Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens. *Biological Control*. 116:36-45.
- Jia, M., Chen, L., Xin, H.L., Zheng, C. J., Rahman, K., Han, T., Qin, L. P. (2016) A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: a systematic review. *Frontier in Microbiology*. 7:1-14.
- Machado, L.M., Silva, T.N., Polezel, D.R., de Oliveira, A.A., O. Ramalho, M., Pagnocca, F.C., Bueno, O.C. (2021) Attractivity or Repellence: Relation between the Endophytic Fungi of Acalypha, Colocasia and the Leaf-Cutting Ants-*Atta sexdens*. *Advances in Entomology*. 09:85-99.
- Martins, F.B., Silva, J.C., Streck, N.A. (2007) Estimativa da temperatura-base para emissão de folhas e do filocrono em duas espécies de eucalipto na fase de muda. *Revista Árvore*. 3:373-381.
- Mas-González, N., Sánchez-Gutiérrez, F., Otriz-Sánchez, A., Grandi, L., Turlings, T.C.J., Muñoz-Redondo, J.M., Moreno-Rojas, J.M., Moranga-Quesada, E. (2021) Entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* affects plant volatile emissions in the presence or absence of Chewing and sap-sucking insects. *Frontier in Plant Science*. 12:1-13.
- McKinnon, A.C., Glare, T.R., Ridgway, H.J., Mendoza-Mendoza, A., Holyoake, A., Godsoe, W.K., Bufford, J.L. (2018) Detection of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* in the Rhizosphere of Wound-Stressed *Zea mays* Plants. *Front. Microbiol.* 9:1-16.
- Mejia; S.Y.M.; Rodríguez, J., Montoya-Lerma, J. (2018) *Euphorbia cotinifolia* (Euphorbiaceae): a promising alternative for leaf cutting ant *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae) control. *Biocontrol Science and Technology*. 28:486-495.

- Miguel, P.S.B., Miguel, F.B., Moreira, B.C., Oliveira, M.N.V., Delvaux, J.C., Souza Freitas, F., Borges, A.C., Costa. (2019) Diversity the endophytic filamentous fungal leaf community at diferente development stages of *eucalyptus*. *Journal of Forestry Research*. 30:1093-1103.
- Ministry of the Environment National implementation plan Brazil: Convention Stockholm / Ministry of the Environment. Brasília: MMA, p. 178, 2015.
- Mota Filho, T.M.M., Stefanelli, L.E.P., Camargo, R.S., Matos, C.A.O., Forti, L.C. (2021). Biological control in leaf-cutting ants, *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae), using pathogenic fungi. *Revista Árvore*. 45:1-10.
- Nascimento, R.A.; Nunoo, D.B.O., Bizkarguenaga, E., Schultes, L., Zabaleta, I., Benskin, J.P., Spanó, S., Leonel, J. (2018) Sulfloramid use in Brazilian agriculture: A source of per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) to the environment. *Environmental Pollution*. 242:1436-1443.
- Nickele, M.A., Reis Filho, W., Penteadó, S.R.C., Queiroz, E.C., Schaitza, E.G., Pie, M.R. (2020) Potential damage by *Acromyrmex* ant species in pine plantations in southern Brazil. *Agricultural and Forest Entomology*. 23:32-40.
- Nickele, M.A., Reis Filho, W., Penteadó, S.R.C., Queiroz, E.C., Schaitza, E.G., Pie, M.R. (2020) Potential damage by *Acromyrmex* ant species in pine plantations in southern Brazil. *Agricultural and Forest Entomology*. 23:32-40.
- Pal, S., Ghosh, S.K. (2018) Phosphate Solubilization study of Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and its effects on brinjal plant (*Solanum melongena* L.) growth. In: Dulai D., Sovan R., Gopal C.B., editors. *Biotechnology and Nature*. Kabitika; Paschim Medinipur, India, p. 109–121.
- Quesada-Moraga, E., Munoz-Ledesma, F., and Santiago-Alvarez, C. (2009) Systemic protection of *Papaver somniferum* L. against *Iraella luteipes* (Hymenoptera: Cynipidae) by an endophytic strain of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Environmental entomology*. 38:723–730.
- Ridley, P., Howse, P.E., Jackson, C.W. (1996) Control of the behaviour of leaf-cutting ants by their “symbiotic” fungus. *Experientia*. 52:631-635.

- Roces, F. (2002) Individual complexity and self-organization in foraging by leaf-cutting ants. *Biological Bulletin*. 202:1–7.
- Rocha, S.L., Evans, H.C., Jorge, V.L., Cardoso, L.A.P., Pereira, F.S.T., Rocha, F.B., Barreto, R.W., Hart, A.G., Elliot, S.L. (2017) 7 Recognition of endophytic *Trichoderma* species by leaf-cutting ants and their potential in a Trojan-horse management strategy. *Royal Society Open Science*. 4:1-14.
- Rodrigues, K.F. (1994). The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. *Mycologia*. 86: 376-386.
- Röschard, J., Roces, F. (2003) Cutter, carriers and transport chains: Distance-dependent foraging strategies in the grass-cutting ant *Atta vollenweideri*. *Insectes Sociaux*. 50:237-244.
- Saar, M., Hershkovitz, D., Amano, O., Bega, D., Subach, A., Scharf, I. (2020) The effect of food preference, landmarks, and maze shift on maze-solving time in desert ants. *Behaviour*. 157:629–665.
- Sánchez-Rodríguez, A.R., Raya-Díaz, S., María Zamarreño, A., María García-Mina, J., Del Campillo, M.C., Quesada-Moraga, E. (2018) An endophytic *Beauveria bassiana* strain increases spike production in bread and durum wheat plants and effectively controls cotton leafworm (*Spodoptera littoralis*) larvae. *Biological Control*. 116:90-102.
- Saverschek, N., Roces, F. (2011) Foraging leafcutter ants: Olfactory memory underlies delayed avoidance of plants unsuitable for symbiotic fungus. *Animal Behaviour*. 3:453-458.
- Silva, A.C.L., Silva, G.A., Abib, P.H.N., Carolino, A.T., Samuels, R.I. (2020) Endophytic colonization of tomato plants by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for controlling the South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*. *CABI Agriculture and Bioscience*. 1:1-9.
- Skinner, M., Parker, B.L., Kim, J.S. (2014) *Role Of Entomopathogenic Fungi In Integrated Pest Management*. Dharam, P. A. (ed.) *Integrated Pest Management*, Academic Press, p. 169–191.
- Soares, F.B., Monteiro, A.C., Barbosa, J.C, Mochi, D.A. (2017) Population density of *Beauveria bassiana* in soil under the action of fungicides and native microbial populations. *Acta Scientiarum*. 39:465-474.
- Teodoro, T.B.P. (2021) Utilização de fungos entomopatogênicos e micopatogênicos como alternativa de controle biológico de formigas

- cortadeiras. Tese (doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 116p.
- Sousa, K.K.A., Catalani, G.C., Gianeti, T.M.R., Camargo, R.S., Caldato, N., Ramos, V.N., Forti, L.C. (2020) A volatile semiochemical released by the fungus *Garden of leaf-cutting ants*. *Florida Entomologist*. 1:1-8.
- Thaochan, N., Ngampongsai, A., Prabhakar, C.S., Hu, Q. (2021) *Beauveria bassiana* PSUB01 simultaneously displays biocontrol activity against *Lipaphis erysimi* (Kalt.) (Hemiptera: Aphididae) and promotes plant growth in Chinese kale under hydroponic growing conditions. *Biocontrol Science and Technology*. 31:997-1015.
- Tomilova, O.G., Kryukova, N.A., Efimova, M.V., Kovtun, I.S., Kolomeichuk, L.V., Kryukov, V.Y., Glupov, V.V. (2021) Early physiological response of potato plants to entomopathogenic fungi under hydroponic condition. *Horticulturae*. 7:1-16.
- Van Bael, S.A., Seid, M.A., Wcislo, W.T. (2012) Endophytic fungi increase the processing rate of leaves by leaf-cutting ants (*Atta*). *Ecological Entomology*. 37:318-321.
- Vasconcelos, H.L., Cherrett, J.M. (1997) Leaf-cutting ants and early forest regeneration in central Amazonia: effects of herbivory on tree seedling establishment. *Journal of Tropical Ecology*. 3:357-370.
- Wei, Q.Y., Li, Y.Y., Xu, C. (2020) Endophytic colonization by *Beauveria bassiana* increases the resistance of tomatoes against *Bemisia tabaci*. *Arthropod-Plant Interactions*. 14:289–300 (2020).
- Wei, Q.Y., Li, Y.Y., Xu, C. (2020) Endophytic colonization by *Beauveria bassiana* increases the resistance of tomatoes against *Bemisia tabaci*. *Arthropod-Plant Interactions*. 14:289–300.
- Zair, A., Sadek, M.M., Bengtsson, M., Hansson, B. S., Witzgall, P., Anderson, P. (2013) Herbivore-induced plant volatiles provide associational resistance against a ovipositing herbivore. *Journal of Ecology*. 101:410-417.
- Zanetti, R., Zanuncio, J.C., Santos, J.C., Silva, W.L.P., Ribeiro, G.T., Lemes, P. G. (2014) An overview of integrated management of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in Brazilian forest plantations. *Forests*. 5:439–454.

Zitlalpopoca-Hernandez, G., Najera-Rincon, M.B., Del-Val, E., Bernardo, M., Alejandro, A., Jackson, T., Larsen, J. (2017) Multitrophic interactions between maize mycorrhizas, the root feeding insect *Phyllophaga vetula* and the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied Soil Ecol.*115: 38-43.

### 3.2 PRODUTIVIDADE MASSAL DE *Escovopsis* SSP. PARA PROGRAMAS DE CONTROLE BIOLÓGICO DE FORMIGAS CORTADEIRAS

#### RESUMO

O microambiente do ninho das formigas é formado por um complexo de organismos benéficos e maléficos à colônia. Dentre esses tipos de interações, as das formigas com o fungo simbiote são acompanhadas por fungos parasitas especializados do gênero *Escovopsis*. Novas pesquisas são realizadas para o entendimento e identificação desse parasita para fins de uso em alternativas de controle biológico de formigas cortadeiras. Entretanto, há poucos relatos sobre o modo de produção massal desse parasita. O presente estudo teve como objetivo desenvolver metodologias para a produção massal de diferentes isolados de *Escovopsis* ssp. por meio de fermentação semissólida em diferentes substratos. Assim como avaliar a influência dos substratos na virulência de *Escovopsis* sobre o jardim de fungo simbiote. Foram utilizados quatro isolados de *Escovopsis* oriundos de formigueiros de *Atta sexdens rubropilosa* (AT-01 e AT-02) e *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (AC-01 e AC-02), e para substrato foram escolhidos arroz branco, arroz parboilizado, aveia laminada e canjiquinha (milho triturado). Os ensaios foram realizados com aplicação de suspensão de conídios dos isolados em cada substrato e ao final avaliado a produtividade de conídios. Já



a virulência, foi avaliada através da aplicação de suspensão de conídios dos isolados em cada substrato e aplicado em jardins de formigas *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. Após a aplicação, foi avaliado o tempo necessário para formação de micélio e colonização total do jardim. Foram observadas diferenças nas relações entre isolado/substrato. Apenas o isolado AT-02 não obteve diferenças estatísticas quanto à produtividade de conídios nos substratos. A maior produtividade de conídios foi observada no isolado AT-01 ( $1,1 \times 10^9$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ). Entre os substratos, a maior produtividade foi em aveia laminada ( $1 \times 10^9$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ). Os quatro isolados estudados colonizaram totalmente os jardins, porém o isolado AC-02 foi o mais lento para iniciar a produção de micélio e colonizar totalmente o jardim. A combinação aveia lâmina e AT-01 proporcionou alta produtividade de conídios e maior virulência.

Palavras chaves: produção massal, *Acromyrmex*, micoparasita.

## ABSTRACT

The microenvironment of the ant nest is formed by a complex of beneficial and harmful organisms in the colony. Among these types of interactions, that of ants with the symbiont fungus is accompanied by specialized parasitic fungi of the genus *Escovopsis*. New research is being carried out to understand and identify this parasite for use in alternative biological control of leaf-cutting ants. However, there are few reports on the mass production of this parasite. The present study aimed to develop methodologies for mass production of different *Escovopsis* isolates through semi-solid fermentation in different substrates. As well as evaluating the influence of substrates on the virulence of *Escovopsis* on the symbiont fungus garden. Four *Escovopsis* isolates from anthills of *Atta sexdens rubropilosa* and *Acromyrmex subterraneus subterraneus* were used, AT-01, AT-02, AC-01 and AC-02, and white rice, parboiled rice, rolled oats and hominy (crushed corn) were used for substrate. The assays were carried out with the application of conidia suspension of the isolates in each substrate and, at the end,

the conidia production was evaluated. Virulence was evaluated through the application of conidia suspension of the isolates after growth in each substrate and applied in *Acromyrmex* ant gardens. After application, the time required for mycelium formation and total colonization of the garden was evaluated. Differences were observed in the relationship between isolate/substrate, only isolated AT-02 did not obtain statistical differences regarding the production of conidia in the substrates. There are statistical differences in conidia production in laminated oat and parboiled rice, with higher production in the concentration of  $1 \times 10^9$  conidia mL<sup>-1</sup>. The highest total conidia production was observed in isolate AT-01 ( $1.1 \times 10^9$  conidia mL<sup>-1</sup>) and among the substrates the highest total production was observed in laminated oat ( $1 \times 10^9$  conidia mL<sup>-1</sup>). The four isolates studied fully colonized the gardens, but the isolate AC-02 was the slowest to start mycelium production and fully colonize the garden. The isolate AT-01 was the main producer of conidia and laminated oat was the substrate that provided the best environment for conidia production. The combination oat lamina and AT-01 provides high conidia production and greater virulence.

Keywords: mass production, *Acromyrmex*, mycoparasite.

## INTRODUÇÃO

As formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* são identificadas em todo território brasileiro e possuem importância econômica pela atividade de forrageamento durante todo o ano (Hernandez e Jaffé, 1995). Dentro do ninho, o material vegetal é processado e utilizado como substrato para o fungo *L. gongylophorus*, do qual é a fonte de carboidratos, polissacarídeos e especificamente nas estruturas fúngicas denominadas “gongilídios”, lipídios para alimentação das formigas (Aylward et al., 2015; Khadempout et al., 2021). Os ninhos de espécies *Acromyrmex* ssp. podem ter como características tamanhos pequenos, em relação aos da espécie *Atta* sp., e numerosas colônias por área, que resultam em grandes prejuízos em cultivos (Loeck e Gusmão, 1998).

O controle químico usando iscas é a principal forma de manejo de formigas cortadeiras. Entretanto, as consequências da dependência do controle químico para garantir a produtividade, contaminações no meio ambiente, animais e humanos, intensificam estudos com técnicas alternativas para um controle seguro e economicamente viável (Morini et al., 2005; Mejia et al., 2018). O uso de fungos para controlar pragas é uma estratégia promissora para o controle de formigas. Nesse contexto, pesquisas usando *B. bassiana*, *Metarhizium*, *Trichoderma*, *Isaria farinosa* e *Escovopsis* visam à busca por alternativas de controle desses insetos (Lopez e Orduz, 2003; Loureiro e Monteiro, 2005; Folgarait et al., 2011; Folgarait et al., 2020).

Dentre esses gêneros, destacam-se *Escovopsis*, que está presente/associado aos jardins de formigas a mais de 60 milhões de anos, causando danos e ocorrendo de forma concomitante com fungo simbiote (Currie et al., 2003). As diferentes espécies de *Escovopsis* são descritas como parasitas especializados na interação com as formigas e o *L. gongylophorus*, no qual degradam e consomem as hifas do simbiote (Currie, 2001; Currie et al., 2003; Reynolds e Currie et al., 2004; Marfetan et al., 2015; Batey et al., 2020).

Para utilização de *Escovopsis* e de outros fungos em metodologias de controle é necessário a produção de grandes quantidades de propágulos. A produção massal de fungos pode ocorrer através de fermentação em meio sólido ou semissólido, bifásico ou líquido. A fermentação em meio semissólido pode ser definida como o crescimento de microrganismos em um substrato sólido, poroso e com umidade necessária para o desenvolvimento do microrganismo desejado (Ruiz-Leza, 2004; Rahardjo et al., 2006). O principal substrato utilizado na fermentação sólida de fungos é o arroz e também são utilizados outros substratos, tais como a canjiquinha, farinha de milho, fubá de milho e trigo moído (Ottati-De-Lima et al., 2010). Assim como resíduos agroindustriais, por exemplo: bagaço de cana, palha de arroz e casca de soja (Oliveira et al., 2020).

No Brasil, a produção de fungos comercialmente é focada nas espécies *Metarhizium anisopliae* (Metschn) (Hypocreales, Ascomycota) e *Beauveria bassiana* (Balsamo) (Hypocreales, Ascomycota) (Mascarin et al., 2019). Fungos com potencial para o controle de formigas como os do gênero *Escovopsis* não possuem bases literárias com melhores substratos e isolados para produção massal. Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar a influência de diferentes

substratos em fermentação semissólida sobre a produção de conídios e verificação da virulência de isolados de *Escovopsis* ssp. sobre *L. gongylophorus*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta e manutenção das formigas cortadeiras e fungo simbiote

A coleta de ninhos de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* foi realizada em campo no município de Bom Jardim, Rio de Janeiro (22° 09' 07" S e 42° 25' 10" W), com a retirada da colônia composta por rainha(s); operárias e seu fungo simbiote *L. gongylophorus*. As colônias coletadas foram acondicionadas em recipientes plásticos com capacidade de 2L e encaminhadas a Unidade de Mirmecologia da UENF. A identificação das espécies de *Acromyrmex* foi conforme a chave de Fowler et al. (1993). As colônias foram mantidas em salas com ambiente controlado com modelo proposto por Della Lucia et al. (1993), umidade relativa de 70% e temperatura de 27°C e 12 horas de fotoperíodo. *L. gongylophorus* foi cultivado pelas formigas nos recipientes plásticos que permaneciam dentro de bandejas com as bordas revestidas de talco puro, a fim de evitar fuga. Foram ofertadas diariamente folhas de *Acalypha wilkesiana* para o forrageamento das formigas.

### Origem dos isolados de *Escovopsis* ssp. e preparo dos inóculos

Para o preparo dos inóculos, foram selecionados quatro isolados de *Escovopsis* ssp. oriundos da micoteca do Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (LEF) (Tabela 1). Os fungos foram cultivados em placa de Petri em meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar) e mantidos em câmara do tipo B.O.D no escuro a 27°C até o amadurecimento dos conídios que para esses isolados é indicado pela presença da coloração marrom (Meirelles et al., 2015).

Posteriormente, foram transferidos para geladeira, onde foram mantidos até a utilização nos ensaios.

Tabela 1. Identificação e origem de isolados de *Escovopsis*

<b>Formigueiro de origem</b>	<b>Código de identificação</b>
<i>Acromyrmex subterraneus subterraneus</i>	AC-01
<i>Acromyrmex subterraneus subterraneus</i>	AC-02
<i>Atta sexdens rubropilosa</i>	AT-01
<i>Atta sexdens rubropilosa</i>	AT-02

#### Produção de conídios em meio semissólido

O experimento foi realizado adotando delineamento inteiramente casualizado. Os ensaios foram constituídos por quatro diferentes substratos: arroz branco, arroz parboilizado, aveia laminada e canjiquinha (milho triturado). Foi utilizado o arroz parboilizado como padrão, visto que é um dos substratos mais utilizados na produção massal de fungos. Em cada tipo de substrato, foram inoculados 4 isolados diferentes, AT-01 e AT-02 (oriundos de *Atta sexdens rubropilosa*) e AC-01 e AC-02 (oriundos de *Acromyrmex subterraneus subterraneus*), totalizando 16 tratamentos no total. Para cada tratamento, foram estabelecidos 5 repetições.

Para produção dos conídios, foram utilizados 5 g de cada substrato, acondicionados em frasco de vidro Erlenmeyer de 50 mL. Na sequência, foram adicionados 2,5 mL de água destilada aos tratamentos arroz branco, arroz parboilizado e aveia laminada. Apenas na canjiquinha foi adicionado 3,75 mL (valor definido em pré-teste). Após a hidratação dos substratos, os Erlenmeyers foram tampados com auxílio de gaze e algodão e autoclavados a 121°C por 20 minutos.

Os substratos foram inoculados em câmara de fluxo laminar com 500 µl de suspensão de  $1 \times 10^6$  conídios mL<sup>-1</sup> de cada isolado de *Escovopsis* ssp. Para que ocorresse a distribuição da suspensão por todo substrato foi realizada a homogeneização manualmente com auxílio de espátula de aço inoxidável esterilizada. Em seguida, os tratamentos foram mantidos em B.O.D a 27 °C no escuro e com avaliações diárias até o amadurecimento dos conídios.

Após o amadurecimento dos conídios, entre 6 e 13 dias, foi realizada a quantificação de conídios. Para tal, em câmara de fluxo laminar, foi retirado todo o conteúdo dos substratos dos Erlenmeyers e feito suspensões com Tween 80 (0,05%). Após removida a parte sólida, alíquotas das suspensões foram observadas no microscópio com auxílio da câmara de Neubauer para a contagem da concentração de conídios.

Virulência de *Escovopsis* ssp. usando diferentes substratos contra jardim de *Acromyrmex subterraneus subterraneus*

Foram realizados bioensaios para avaliar a virulência dos quatro isolados de *Escovopsis* ssp. crescidos nos quatro tipos de substratos, como descrito acima, totalizando 16 tratamentos, com 3 repetições cada. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Inicialmente, foi selecionado um formigueiro de *A. subterraneus subterraneus* (denominado formigueiro 1) oriundo da Unidade de Mirmecologia da UENF e retirada uma alíquota do jardim de fungos. Após, foram retiradas todas as formigas, exceto as mínimas. Para cada repetição, foi pesado 2g do jardim de fungo e acondicionados em recipientes plásticos com capacidade de 145 mL. A base do recipiente foi preenchida com ágar-água para manter a umidade (Figura 1).



Figura 1. Jardim de fungo de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* em metodologia utilizada para realização dos ensaios.

Para inocular os isolados de *Escovopsis* ssp., foram preparadas suspensões de  $1 \times 10^7$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  e aplicado 500  $\mu\text{l}$  da suspensão sobre o jardim de fungos em cada repetição. Em seguida, os recipientes foram mantidos em câmara do tipo B.O.D a 27°C no escuro, com avaliações visuais diárias do nível de colonização do isolado de *Escovopsis* ssp. sobre o jardim de fungo, para estabelecimento do início da formação de micélios e do tempo necessário para a colonização total do jardim e conseqüente colapso do formigueiro.

#### Análise estatística

Os valores das médias do tempo de formação de micélio, colapso do jardim de fungo e número de conídios produzidos foram submetidos a ANOVA two-way seguida pelo teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Todas as análises e gráficos foram realizados com o software Sigma-Plot v. 12.5.

## RESULTADOS

Produção de conídios de *Escovopsis* ssp.

A partir dos dados foram obtidas médias das produções de conídios dos quatro isolados de *Escovopsis* ssp. conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2. Média ( $\pm$  EP) da produção de conídios de quatro isolados de *Escovopsis* ssp. em diferentes substratos por fermentação semissólida

Substrato	Isolado de <i>Escovopsis</i>	Produção média de conídios (conídios mL <sup>-1</sup> )
Canjiquinha	AC-01	$7 \times 10^8 \pm 1 \times 10^8$ Ab
	AT-02	$3 \times 10^8 \pm 7 \times 10^7$ Aa
	AT-01	$2 \times 10^8 \pm 4 \times 10^7$ Ac
	AC-02	$3 \times 10^8 \pm 1 \times 10^8$ Ab
Aveia	AC-01	$8 \times 10^8 \pm 1 \times 10^8$ Bb
	AT-02	$3 \times 10^8 \pm 7 \times 10^7$ Ba
	AT-01	$1 \times 10^9 \pm 4 \times 10^8$ Aa
	AC-02	$8 \times 10^8 \pm 1 \times 10^8$ Ba
Arroz Parboilizado	AC-01	$1 \times 10^9 \pm 2 \times 10^8$ Aa
	AT-02	$6 \times 10^8 \pm 2 \times 10^8$ Ba
	AT-01	$1 \times 10^9 \pm 2 \times 10^8$ Aa
	AC-02	$1 \times 10^8 \pm 7 \times 10^7$ Bb
Arroz Branco	AC-01	$5 \times 10^8 \pm 5 \times 10^7$ Ab
	AT-02	$4 \times 10^8 \pm 7 \times 10^7$ Aa
	AT-01	$8 \times 10^8 \pm 6 \times 10^7$ Ab
	AC-02	$1 \times 10^8 \pm 9 \times 10^7$ Ab

Letras maiúsculas: comparação dos isolados em relação a cada substrato utilizado. Letras minúsculas: comparação dos substratos em relação a cada isolado utilizado. Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $\alpha=5\%$ ).

Todos os isolados de *Escovopsis* ssp. testados foram capazes de completar o desenvolvimento até a produção de conídios nos quatro substratos utilizados, canjiquinha, aveia laminada, arroz branco e arroz parboilizado. Entretanto, o isolado AC-01 produziu maior número de conídios apenas em arroz parboilizado ( $1 \times 10^9$  conídios mL<sup>-1</sup>) ( $p < 0,05$ ), não havendo diferença estatística entre os outros substratos pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). Para AT-02, não houve diferenças estatísticas entre os substratos ( $p > 0,001$ ). O isolado AT-01 produziu de



forma igual em aveia laminada e arroz parboilizado ( $1 \times 10^9$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ) ( $p > 0,05$ ), seguido, respectivamente, por arroz branco e canjiquinha. Para o AC-02 a maior produção de conídios foi em aveia laminada ( $8 \times 10^8$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ) ( $p < 0,05$ ), mas não ocorreu diferença estatística entre a produção de conídios nos outros substratos ( $p > 0,05$ ) (Tabela 2).

O substrato canjiquinha proporcionou a produção de conídios de forma igual em todos os isolados utilizados ( $p > 0,001$ ). Na aveia laminada, o isolado AT-01 produziu mais conídios ( $1 \times 10^9$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ) ( $p < 0,05$ ), seguido pelos outros três substratos que produziram estatisticamente a mesma quantidade de conídios ( $p > 0,05$ ). O substrato arroz parboilizado proporcionou as maiores produções de conídios dos isolados AC-01 e AT-01 ( $1 \times 10^9$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ), seguido de forma estatisticamente igual os isolados AT-02 e AC-02. No arroz branco, todos os quatro isolados produziram quantidades de conídios estatisticamente iguais ( $p > 0,001$ ) (Tabela 2).

A produção total de conídios quando comparando os isolados foi estatisticamente diferente entre os tratamentos ( $p < 0,001$ ) (Figura 1). A alta produção do isolado AT-01 foi confirmada ( $1,1 \times 10^9$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ), o qual foi estatisticamente diferente dos outros três isolados selecionados ( $p < 0,05$ ).

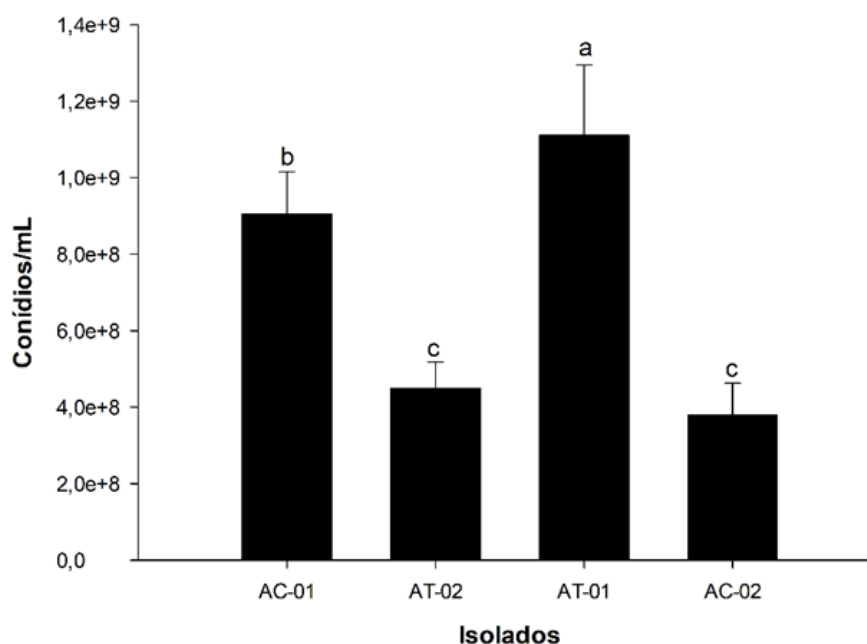


Figura 1. Produção total de conídios  $\text{mL}^{-1}$  de cada isolado de *Escovopsis* ssp. cultivados em diferentes substratos em fermentação semissólida. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

A Figura 2 demonstra as diferenças visuais no crescimento e produção de conídios das primeiras repetições de cada substrato e isolados, no qual é possível notar o contraste de isolado AT-01 em comparação aos outros isolados. O segundo isolado de maior produção total foi AC-01 ( $9 \times 10^8$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ), seguido pelos AT-02 e AC-02 com produção total estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ( $\alpha=5\%$ ,  $P \Rightarrow 0,05$ ).

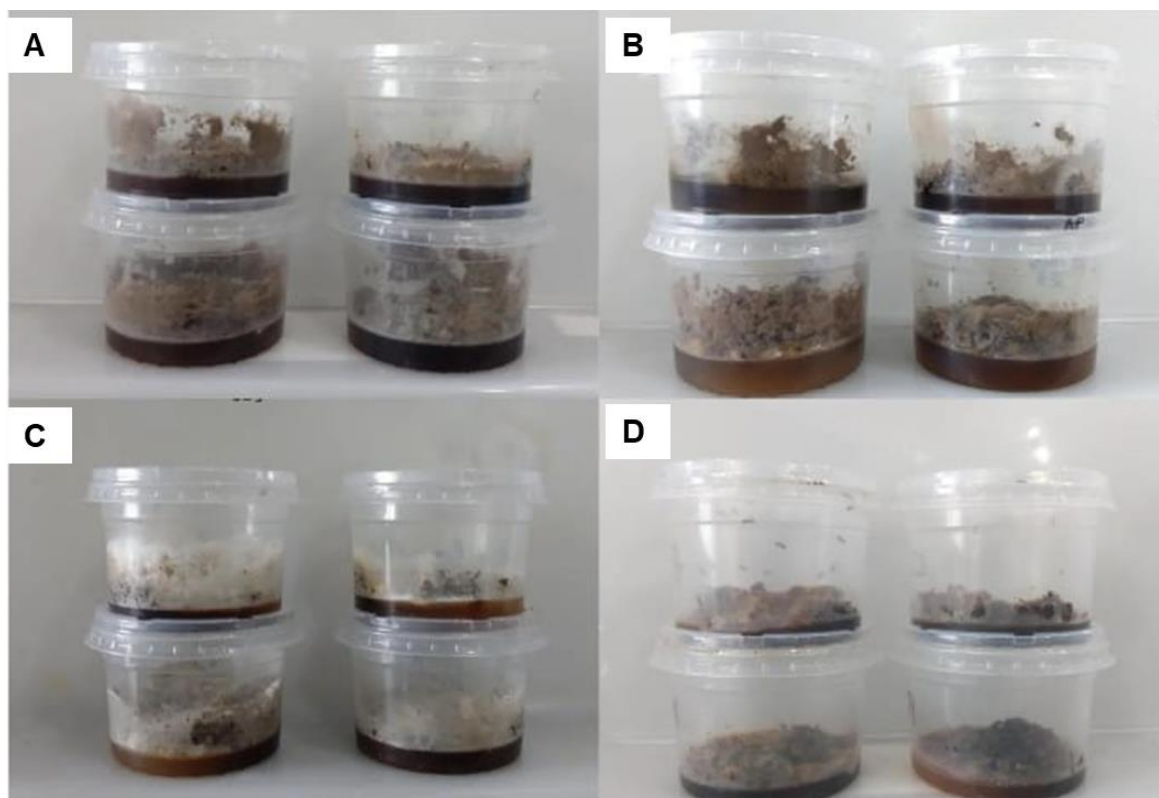


Figura 2. Virulência de isolados de *Escovopsis* ssp. crescidos em diferentes substratos sobre jardim de fungo de *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. Letras indicam a colonização dos jardins pelos isolados: (A) AT-01, (B) AC-01, (C) AT-02 e (D) AC-02. Quanto aos recipientes em cada quadrante: (Superior esquerdo) Canjiquinha, (Inferior esquerdo) Aveia laminada, (Superior direito) Arroz branco e (Inferior direito) Arroz parboilizado.

Os substratos apresentaram diferenças estatísticas quanto ao número total de conídios/ $\text{mL}^{-1}$  ( $p < 0,001$ ) (Figura 3). O substrato aveia laminada foi o que mais proporcionou a alta produção de conídios ( $1 \times 10^9$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ) ( $p < 0,05$ ), seguido pelo arroz parboilizado ( $9 \times 10^8$  conídios  $\text{mL}^{-1}$ ) ( $p < 0,05$ ). Enquanto os substratos arroz branco e canjiquinha foram igualmente menos produtivos pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

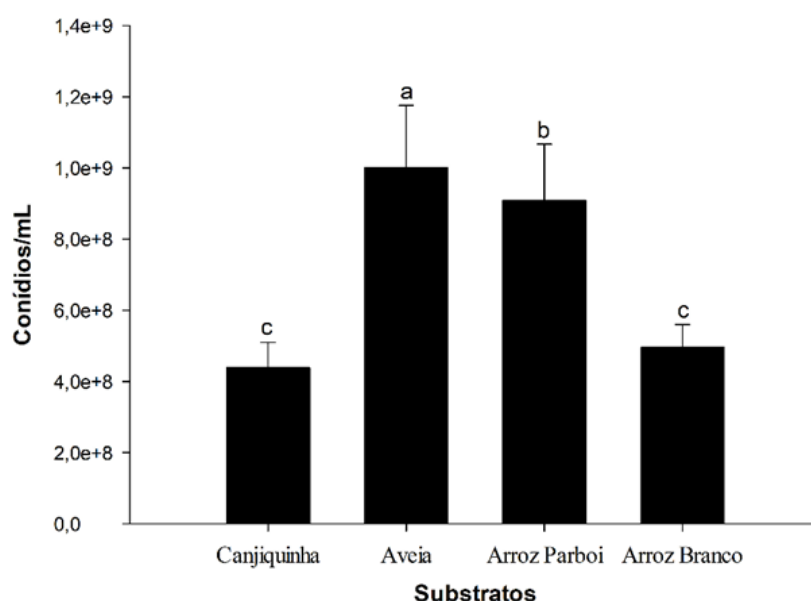


Figura 3. Produção total de conídios mL<sup>-1</sup> de isolados de *Escovopsis* ssp. em cada substrato cultivados por fermentação semissólida. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

#### Virulência de *Escovopsis* ssp. ao jardim de fungo de *Acromyrmex subterraneus subterraneus*

Todos os conídios dos isolados de *Escovopsis* ssp. cultivados em cada tipo de substrato: canjiquinha, aveia laminada, arroz branco e arroz parboilizado, foram eficientes em germinar e colonizar os jardins de fungo, levando-os ao colapso. Porém, houve diferença estatística em relação ao tempo para que o micélio se desenvolvesse ( $p < 0,001$ ;  $F=405,0$ ;  $GL=3$ , Tabela 3). Os isolados AC-01, AT-01 e AT-02 iniciaram o crescimento de micélio no jardim ao 2º dia após a inoculação dos conídios. A velocidade de produção de micélio não diferiu estatisticamente para AC-01, AT-01 e AT-02 em todos os substratos pelo teste de Tukey ( $\alpha=5\%$ ,  $p>0,05$ ). A produção de micélio mais lenta ocorreu com o isolado AC-02 que iniciou tal produção após 5 dias da inoculação dos conídios produzidos usando os substratos canjiquinha e arroz branco e com 6 dias quando foram inoculados conídios produzidos usando aveia laminada e arroz parboilizado. Entretanto, para o isolado AC-02 o tempo médio de início de produção de micélio foi estatisticamente igual em todos os substratos utilizados (Tukey  $\alpha=5\%$ ,  $p>0,05$ ).

Em relação ao tempo necessário para a colonização e colapso do jardim de fungos, os isolados foram estatisticamente diferentes entre si ( $p < 0,001$ ;  $F = 337,59$ ;  $GL = 3$ ) (Tabela 3). O isolado AT-01 apresentou o menor tempo para colonização total do fungo, com média de 6 dias ( $p < 0,05$ ). Mas, não houve diferença estatística em relação aos conídios produzidos em diferentes substratos ( $p > 0,05$ ). O isolado AT-02 foi estatisticamente igual ao AT-01 quando testou conídios produzidos em canjiquinha e arroz branco e, quando conídios foram produzidos em aveia laminada e arroz parboilizado, foi igual ao AC-01 (8 dias) ( $p < 0,05$ ). Já o AC-01 foi estatisticamente igual ao AT-02 em todos os substratos estabelecidos. Assim como para o início da produção de micélio, o AC-02 apresentou o maior tempo para colonizar todo o jardim de fungo, com médias de 12 a 13 dias após a inoculação e não houve diferenças estatísticas entre os tipos de substratos utilizados ( $p > 0,05$ ).

Tabela 3. Tempo médio ( $\pm$  EP), em dias, para iniciar a produção de micélio e para colonização total (colapso) do jardim de fungos quando inoculando conídios dos isolados de *Escovopsis* ssp. produzidos em diferentes substratos

Substrato	Isolado de <i>Escovopsis</i>	Micélio (dias)	Colonização total (dias)
Canjiquinha	AC-01	2 Ba	8 Ba
	AT-02	2 Ba	7 BCa
	AT-01	2 Ba	6,66 $\pm$ 0,66 Ca
	AC-02	5,33 $\pm$ 0,66 Aa	12,33 $\pm$ 0,66 Aa
Aveia	AC-01	2 Ba	8 Ba
	AT-02	2 Ba	7,33 $\pm$ 0,33 Ba
	AT-01	2 Ba	6 Ca
	AC-02	6 Aa	13 Aa
Arroz Parboilizado	AC-01	2 Ba	8 $\pm$ Ba
	AT-02	2 Ba	7,66 $\pm$ 0,33 Ba
	AT-01	2 Ba	6 Ca
	AC-02	6 Aa	13 Aa
Arroz Branco	AC-01	2 Ba	8 Ba
	AT-02	2 Ba	7 BCa
	AT-01	2 Ba	6 Ca
	AC-02	5,66 $\pm$ 0,33 Aa	12,33 $\pm$ 0,66 Aa

Letras maiúsculas: comparação do isolado em relação ao substrato utilizado, tanto para iniciar a formação de micélio quanto para a colonização total do jardim de fungos. Letras minúsculas: comparação dos substratos em relação ao isolado utilizado, tanto para iniciar a formação de micélio quanto para a colonização total do jardim de fungos. Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de tukey ( $\alpha = 5\%$ ).

## DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostram pela primeira vez a produção de conídios de *Escovopsis* ssp. em diferentes substratos e a possível influência dos meios de cultivo na virulência contra *L. gongylophorus*. Dessa forma, foram utilizados isolados de fungos diferentes, assim como os substratos utilizados para suas produções.

A adaptabilidade dos isolados estudados aos diferentes substratos proporciona uma facilidade ao processo de produção massal, uma vez que independente do substrato, os quatro isolados de *Escovopsis* ssp. foram patogênicos e colonizaram todo o fungo simbiote de *A. subterraneus subterraneus*. A escolha do substrato é importante na produção massal de fungos, visto que está correlacionada aos custos e à qualidade dos propágulos produzidos (El Damir, 2006).

Em situação de campo, os conídios de fungos precisam possuir a capacidade de sobreviver nas adversidades encontradas no ambiente natural. Meios específicos ou substratos pobres, como o arroz parboilizado, podem ocasionar situação de estresse e ocasionar a seleção de indivíduos mais, portanto necessitam ter a viabilidade e capacidade de colonização de superfície (Wood e Tveit, 1955; Negri et al., 2010). O mesmo deve ocorrer com *Escovopsis* sp., pois além das condições de estresse no campo, também há as respostas das formigas ao organismo maléfico. Desse modo, *Escovopsis* sp. deve crescer de forma rápida e colonizar toda a superfície do fungo simbiote para que tenha chance de sucesso.

As maiores diferenças entre os tempos médios de crescimento até o colapso do jardim foram entre os isolados AT-01 e o AC-02. Observa-se que os isolados oriundos de formigueiros de *A. sexdens rubropilosa* foram mais virulentos no jardim de fungos utilizado no estudo, que foi cultivado por *A. subterraneus subterraneus*. Já foi proposto que ocorre uma coevolução antagônica entre a *Pseudonocardia* das formigas *Acromyrmex* sp. com cepas de *Escovopsis* sp. pertencentes a jardins de *Acromyrmex* sp. (Pulsen et al., 2009; Caldera e Currie, 2012; Meirelles et al., 2014). Os mesmos autores mencionam que ocorre a

produção de substâncias antibióticas direcionadas a cepas de *Escovopsis* sp. e que ocasionam o desenvolvimento de resistência por pressão seletiva.

Nos ensaios realizados neste trabalho foram retiradas as formigas de todas as castas, exceto as mínimas, e utilizado apenas o jardim de fungos, mas mesmo com a ausência da maioria das formigas com biofilme bacteriano, ainda há presença de actinobactérias que controlem infecções de *Escovopsis* sp. em colônias de *Acromyrmex* sp. Entretanto, não foram capazes de retardar o colapso do jardim, e assim, foram observadas diferenças entre os tempos de início do desenvolvimento de micélio até o colapso total. Diferenças na infecção de *L. gongylophorus* também foram observadas por Silva et al. (2006), em que os isolados mais eficientes de *Escovopsis weberi* inibiram até 68 e 67% do crescimento do fungo simbionte, já os menos eficientes 43 e 26%. Em testes sem a presença de formigas, observaram o colapso de *L. gongylophorus* de *A. subterraneus subterraneus* aos 11 dias após a inoculação de *Escovopsis*, *Escovopsioides* e *Trichoderma* (Mendonça et al., 2021). No presente estudo o isolado AT-01 colapsou o jardim de fungo até o sexto dia após a inoculação.

Dentre os isolados, o AT-01 foi o maior produtor de conídios e com destaque no número de conídios nos substratos aveia laminada e arroz parboilizado. O outro isolado de formigueiro de *Atta* sp., AT-02, foi o mais adaptável, pois produziu de forma igual em todos os substratos testados. A diferença entre os isolados pode ocorrer por diversas razões. Kant et al. (1996) destacaram que há individualidade entre cepas e que as necessidades nutricionais também diferem e, portanto, devem ser realizados estudos antes da aplicação desses microrganismos no campo.

Já entre os isolados oriundos de *A. subterraneus subterraneus* a maior compatibilidade entre os substratos foi distinta, em que o isolado AC-01 foi o segundo maior produtor de conídios/mL com destaque quando usando arroz parboilizado. Já o AC-02 foi o de menor produção entre todos os isolados estudados, entretanto a maior produção ocorreu usando aveia laminada. Além do uso de diferentes substratos, a produção de conídios é afetada pela disponibilidade e acessibilidade dos nutrientes nos substratos que são mediados pela porosidade e estrutura da matéria utilizada e, além disso, podem ser alterados pela umidade e esterilização (Cavalcante et al., 2007). O nível de

umidade é um fator não explorado em nosso estudo e que pode proporcionar modificações na produção dos conídios dos isolados testados.

Dentre os substratos utilizados, a produção total de conídios foi maior na aveia laminada, seguido pelo arroz parboilizado. Devido às características oportunistas do *Escovopsis* sp. e às defesas das formigas contra microrganismos prejudiciais ao simbionte, quanto maior o número de propágulos e maior virulência, maior poderão ser as chances de colonizar o jardim. Tal hipótese pode ser mais promissora quando testada em formigueiros jovens, visto que o controle de formigueiros com *Escovopsis* sp. é mais fácil em colônias jovens (Mendonça et al., 2021).

No presente estudo ocorreu que o isolado AT-01 foi o de maior produção de conídio e também apresentou a maior virulência sobre o jardim de fungo de formiga cortadeira. Enfatiza-se que produção de conídios e virulência não são características diretamente proporcionais, como observado em estudo com trinta isolados de *M. anisopliae* em que as altas produções de conídios não foram correlatas com a virulência sobre o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Quinelato et al., 2012). No presente estudo também foi observado a maior produção de conídios e maior virulência em conídios oriundos do cultivo em aveia laminada, que pode ser justificado, pois a virulência pode ter uma relação com carbono e nitrogênio do substrato utilizado para o crescimento (Currie et al., 1999; Currie, 2001; Safavi et al., 2007).

A maior compatibilidade no número de conídios produzidos em aveia proporciona mais uma observação aos métodos de criação de formigas cortadeiras, pois é comumente ofertado aveia para formigueiros em condição de laboratório. Logo, caso ocorra condições adequadas, a aveia ofertada poderá vir a ser mais um substrato para o crescimento de *Escovopsis* ssp. e, por consequência, a infecção de formigueiros das criações. Portanto, deve ser utilizado com precaução.

Dhodary et al. (2018) utilizaram flocos de aveia em ensaios com *Acromyrmex octospinosus* para avaliar a aceitação e reconhecimento das formigas à aveia tratada e não tratada com shearininas, substância produzida por *Escovopsis* sp., como substrato para *L. gongylophorus*. Inicialmente as formigas aceitam e incorporam ao jardim o tratamento e controle, mas após dois dias identificam a shearininas e passam a incorporar apenas o controle. Em nossos

testes, com a média de dois dias já ocorre a produção de micélio na maioria dos isolados testados, sendo assim uma vantagem no controle caso seja adicionado algum composto que ocasione uma camuflagem química.

A utilização de aveia para o crescimento de *Escovopsis* sp. é relatada, principalmente, em meios de cultura combinados com ágar em pesquisas para identificação de espécies. Montoya et al., 2019 descreveram as espécies *E. clavatus* e *E. multiformis* utilizando ágar-aveia. Em mesma combinação, foi descoberta a espécie *E. trichodermoides* que teve o crescimento mais rápido em comparação aos meios BDA e extrato de malte-ágar (EMA) em temperaturas de 25 a 30°C (Masiulionis et al., 2014).

Também vale destacar a importância de propriedades e parâmetros necessários nos substratos escolhidos para a produção massal de *Escovopsis* ssp. O pH é um dos fatores limitantes na produção massal de fungos. Kleespies e Ziemmermann (1992) recomendaram que o pH para o desenvolvimento de *Metarhizium anisopliae* seja moderadamente ácido e destacaram que o ambiente levemente ácido pode reduzir a possibilidade de crescimento de outros microrganismos. As alterações do pH influenciam a produção de conídios, no qual cepas de *B. bassiana* produzem mais conídios com pH em torno de 6 e 7 (Karthikeyan et al., 2008). *Escovopsis* sp. é naturalmente identificado dentro de câmaras de jardins de fungo, que são ambientes ligeiramente ácidos de pH 5,2 (Semenova et al., 2011). Logo, deve ser selecionado um substrato que possua a propriedade de permanecer com pH ligeiramente ácido, pois além de ser identificado em locais levemente ácidos, Dhodary e Spiteller (2021) observaram que a alcalinização do meio pode inibir o desenvolvimento de *E. weberi*, no qual o pH 7,5 inibiu até 90% o crescimento e o pH 8 inibiu completamente. O pH também interfere no acúmulo de biomassa e formação de metabólitos secundários e, conseqüentemente, na morfologia dos micélios (Kim et al., 2003).

Outro parâmetro fundamental para a produção de microrganismos em fermentação em estado sólido é o fornecimento de oxigênio (Chen, 2013). A falta de aeração somada à agitação constante ocasionou aglomeração do substrato e baixo desenvolvimento de *Aspergillus awamori* (Diaz et al., 2009). Além disso, durante a produção de conídios deve-se observar a quantidade de CO<sub>2</sub> presente, Garza-López et al. (2011) observaram que a adição de 5% de CO<sub>2</sub> na produção de conídios de *B. bassiana* ocasionou uma redução de 85% no desenvolvimento



e produção de conídios. Os mesmos autores verificaram que o aumento de CO<sub>2</sub> estimulou a produção de amilases. No presente estudo foram utilizados recipientes plásticos de 145 mL para aumentar a aeração e acomodação do jardim de fungo e *Escovopsis* ssp., diferindo de outros trabalhos com *Escovopsis* ssp. que são comumente utilizadas placas de Petri como em Jiménez-Gómez et al. (2021) e Mendonça et al. (2021).

A área superficial da matéria utilizada é importante para aeração e suporte do desenvolvimento físico e nutricional do fungo (Jenjins et al., 1998). O arroz é um substrato já citado como bom para a produção de fungos, pois possui grande área superficial e, em virtude dessa e outras características é utilizado em diversos estudos de produção de propágulos e metabólitos (Dorta e Arcas, 1998). Além disso, Barra-Bucarei et al. (2016) obtiveram maior produção de conídios em arroz parboilizado já utilizado previamente para o crescimento de *M. anisopliae* em comparação ao arroz parboilizado novo.

Quanto à nutrição, a relação carbono e nitrogênio influenciou a produção média e a qualidade dos blastosporos produzidos por *B. bassiana* (Lane et al., 1991). Ali et al. (2009) observaram que substratos com relação carbono e nitrogênio (35:1) estimularam a germinação mais rápida de *Isaria fumosoroseus*, assim como proporcionaram maior virulência. Os mesmos autores também confirmaram correlação entre a disponibilidade de nutrientes e a atividade das enzimas protease Pr1 e lipase que são importantes no processo de infecção. A nutrição também pode ser mediada por diferença entre cepas, em ensaios com isolados de *Aspergillus oryzae* foi observado que ocorreram predileções diferentes, em que um isolado se desenvolveu mais rápido em meio rico em carboidrato e o outro em proteína (Chacón-Vargas et al., 2021).

Ainda são necessários estudos para o entendimento e identificação das espécies de *Escovopsis*, uma vez que são complexas as relações entre *Escovopsis*, *Leucoagaricus* e formigas cortadeiras e ainda são realizados estudos com reformulações de espécies de *Escovopsis* em novos gêneros, como *Escovopsis kreiselii* em *Sympodiorosea kreiselii* e *Escovopsis trichodermoides* em *Luteomyces trichodermoides* (Christopher et al., 2021; Montoya et al., 2021; Pietrobon et al., 2022). É possível utilizar *Escovopsis* ssp. em técnicas de controle biológico já estabelecidas para formigas cortadeiras, como exemplo a substituição

de *Trichoderma virens* em iscas combinadas com *B. bassiana* (Folgarait e Goffré, 2021).

## CONCLUSÕES

Os isolados utilizados nesse estudo foram capazes de produzir conídios em todos os substratos utilizados. O isolado AT-01 demonstrou o melhor desempenho na produção de conídios em destaque com uso de aveia laminada. A escolha do substrato deve ocorrer após estudos de cepa/substrato, disponibilidade local e custo. Foi evidenciado nesse estudo que a aveia proporcionou o melhor ambiente para a produção de conídios e maior virulência quando combinada ao isolado AT-01. Vale destacar que o arroz parboilizado, que é o principal substrato para o cultivo de outros fungos, também teve efeitos positivos na produção de conídios e virulência de *Escovopsis* ssp.

Os quatro isolados utilizados nesse estudo foram capazes de colonizar e causar a morte do fungo simbiote quando conídios foram inoculados em pedaços de jardim apenas com a presença de formigas mínimas. Até o momento há poucos relatos de técnicas para a produção massal de *Escovopsis* ssp., sendo esse estudo uma alternativa para novas pesquisas que venham utilizar a fermentação em meio semissólido de *Escovopsis* ssp. Destaca-se também o uso dos recipientes plásticos de 145 mL como metodologia alternativa eficiente para ensaios com jardins de fungo e *Escovopsis* ssp.

Estudos sobre a produção massal de fungos possuem grande importância, pois auxiliam no desenvolvimento de pesquisas que necessitam a multiplicação de microrganismos. Além de possibilitar a redução de gastos de empresas de controle biológico com descrição de melhores condições para o desenvolvimento de bioinseticidas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali, S., Huang, Z., Ren, S. (2009) Media composition influences on growth, enzyme activity, and virulence of the entomopathogen *hyphomycetelsaria fumosoroseus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 131:30–38.
- Aylward, F.O., Khadempour, L., Tremmel, D.M., McDonald, B.R., Nicora, C.D. (2015) Correction: Enrichment and Broad Representation of Plant Biomass-Degrading Enzymes in the Specialized Hyphal Swellings of *Leucoagaricus gongylophorus*, the Fungal Symbiont of Leaf-Cutter Ants. *Plos One*. 10:1-2.
- Barra-Bucari, L., González, M.G., Iglesias, A.F., Aguayo, G.S., PeNalosa, M. G., Vera, P. V. (2020) *Beauvaria bassiana* multifunction as na endophyte: grwth promotion and biologic of trialeurodes vaporariorum, (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae) in tomato. *Insects*. 11:591.
- Batey, S.F.D., Greco, C., Hutchings, M.I., Wilkinson, B. (2020) Chemical warfare between fungus-growing ants and their pathogens. *Current Opinion in Chemical Biology*. 59:172-181.
- Caldera, E.J. e Currie, C. R. (2012). The Population Structure of Antibiotic-Producing Bacterial Symbionts of *Apterostigma dentigerum* Ants: Impacts of Coevolution and Multipartite Symbiosis. *The American Naturalist*. 5:604–617.
- Cavalcante, R.S., Lima, H.L. S., Pinto, G.A.S., Gava, C.A.T., Rodrigues, S. (2007) Effect of Moisture on *Trichoderma* Conidia Production on Corn and Wheat Bran by Solid State Fermentation. *Food and Bioprocess Technology*. 1:100-104.
- Chacón-Vargas, K., MccCarthy, C.O., Choi, D., Wang, L., Yu, J.H., Gibbons, J. G. (2021) Genomes from diferente clades reveals independent evolution of alpha-amylase duplication, variation in secondary metabolismo genes, and diferences in primary metabolismo. *Frontier Microbiology*. 12:1-14.
- Chen, H. (2013) Aerobic Solid-State Fermentation, Modern Solid State Fermentation. *Springer*. Springer Netherlands, 197 p.
- Christopher, Y., Aguilar, C., Gálvez, D., Wcislo, W.T., Gerardo, N.M., Fernández-Marín, H.F. (2021) Interactions among Escovopsis, antagonistic microfungi

- associated with the fungus-growing ant symbiosis. *Journal of Fungi*. 12:1-13.
- Currie, C.R. (2001). Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. *Oecologia*. 128, 99-106.
- Currie, C.R., Mueller, U.G., Malloch, D. (1999) The agricultural pathology of ant fungus gardens. *Proc Natl Acad Sci*. 96:7998–8002.
- Currie, C.R., Wong, B., Stuart, A.E., Schultz, T.R., Rehner, S.A., Mueller, U.G. (2003) Ancient tripartite coevolution in the attine ant-microbe symbiosis. *Science*. 299:386-388.
- Dhodary, B., Schilg, M., Wirth, R., e Spitteller, D. (2018). Secondary Metabolites from *Escovopsis weberi* and Their Role in Attacking the Garden Fungus of Leaf-Cutting Ants. *Chemistry - A European Journal*. 17:4445–4452.
- Diaz, A., de Ory, I., Caro, I., Blandino, A. (2009) Solid state fermentation in a rotating drum bioreactor for the production of hydrolytic enzymes. Icheap-9. 9th International Conference on Chemical and Process Engineering 1–3.
- Dorta, B., Arcas, J. (1998) La esporulacion de *Metarhizium* en fermentacion en estado solido con aireacion forzada. *Enzyme and Microbial Technology*. 23:501-505.
- EL DAMIR, M. (2006) Effect of growing media and water volume on conidial production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Biological Sciences*. 6:269-274.
- Folgarait, P., Gorosito, N., Poulsen, M., Currie, C. R. (2011) Preliminary In Vitro Insights into the Use of Natural Fungal Pathogens of Leaf-cutting Ants as Biocontrol Agents. *Current Microbiology*. 3:250-258.
- Folgarait, P.J., Goffré, D. (2021). Biological control of leaf-cutter ants using pathogenic fungi: experimental laboratory and field studies. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 169:813–824.
- Folgarait, P.J., Goffré, D., Giraldo Osorio, A. (2020) *Beuaveria bassiana* for the control of leafcutter ants: strain and host differences. *Biocontrol Science and Technology*. 30:996-1005.
- Garza-López, P.M., Königsberg, M., Saucedo-Castañeda, G., Loera, O. (2011) Perfiles diferenciales de *Beuaveria bassiana* (Bals.-Criv) Vuill. en respuesta al CO<sub>2</sub>: Producción de conidios y amilasas. *Agrociencia*. 45:761-770.

- Hernández, J.V., Jaffé, K. (1995) Dano econômico causado por populações de formigas *Atta laevigata* (F. Smith) em plantações de *Pinus caribaea* Mor. e elementos para o manejo da praga. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*. 24:287-298.
- Jenkins, N.E., G. Heviefio, J. Langewald, A.J. Cherry, and C.J. Lomer. (1998) Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News and Information*. 19:21-32.
- Jiménez-Gómez, I., Borcoto, M.O., Montoya Q.V., Goes, A.C., Monteiro, L.S.V.E., Bueno, O.C., Rodrigues, A. (2021) Host susceptibility modulates *Escocopsis* pathogenic potential in the fungiculture of higher attine ants. *Frontier in Microbiology*. 12:1-14.
- Kant, R., Pandey, S.D., Sharma, S.K. (1996) Role of biological agents for the control of mosquito breeding in rice fields. *Indian Journal Malariology*. 33:209–215.
- Karthikeyan, A., Shanthi, V., Nagasathya, A. (2008) Effect of diferente media and pH on the growth of *Beuveria bassiana* and its parasitismo on leaf eating caterpillars. *Journal of Agriculture and Biological Sciences*. 2:117-119.
- Khadempour, L., Kyle, J.E., Webb-Robertson, B.M., Nicora, C.D., Smith, F.B., Smith, R.D. (2021) From plants to ants: fungal modification of leaf lipids for nutrition and communication in the leaf-cutter ant fungal garden ecosystem. *mSystems*. 6:01307-01320.
- Kim, S.W., Hwang, H.J., Xu, C.P., Sung, J.M., Choi, J.W., Yun, J.W. (2003) Optimization of submerged culture process for the production of mycelial biomass and exo-polysaccharides by *Cordyceps militaris* C738. *Journal of Applied Microbiology*. 94:120–126.
- Kleespies, R.G. e Zimmermann, G. (2008) Production of blastospores by three strains of *Metarhizium anisopliae* (metch.) sorokin in submerged culture. *Biocontrol Science and Technology*. 2:127-135.
- Lane, B.L., Trinci, P.J., Gillespie, A.T. (1991) Endogenous reserves and survival of blastospores of *Beauveria bassiana* harvested from carbon- and nitrogen-limited batch cultures. *Mycological Research*. 95:821–828.
- Loeck, A., Gusmão, L.G. (1998) Controle de *Acromyrmex heyeri* Forel, 1899 e *Aceomyrmex ambiguus* Emery, 1887 (Hymenoptera: Formicidae) com fluramim na localidade de pelotas, RS. *Rev. Bras. de Agrociência*. 4:59-63.

- Lopez, E., Orduz, S. (2003) *Metarhizium anisopliae* and *Trichoderma viride* for control of nests of the fungus-growing ant, *Atta cephalotes*. *Biological Control*. 27:194–200.
- Loureiro, E. S., Monteiro, A.C. (2005) Patogenicidade de isolados de três fungos entomopatogênicos a soldados de *Atta sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae). *Revista Arvore*. 29:553-561.
- Mascarin, M.G., Biaggioni, R.L., Delalibera, Í., Kort, É.F.K., Luz, C., Faria, M. (2019) Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology*. 165:46-53.
- Masiulionis, V.E., Cabello, M.N., Seifert, K.A., Rodrigues, A., Pagnocca, F.C. (2015) *Escovopsis trichodermoides* sp. nov., isolated from a nest of the lower attine ant *Mycocepurus goedii*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107:731-740.
- Meirelles, L.A., Mendes, T.D., Solomon, S.E., Bueno, O.C., Pagnocca, F.C., Rodrigues, A. (2014) Broad *Escovopsis*-inhibition activity of *Pseudonocardia* associated with *Trachymyrmex* ants. *Environmental Microbiology Reports*. 6:339–345.
- Mejia; S.Y.M.; Rodríguez, J., Montoya-Lerma, J. (2018) *Euphorbia cotinifolia* (Euphorbiaceae): a promising alternative for leaf cutting ant *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae) control. *Biocontrol Science and Technology*. 28:486-495.
- Mendonça, D.M.F., Caixeta, M.C.S., Martins, G.L., Moreira, C.C., Kloss, T.G., Elliot, S.L. (2021) Low virulence of the fungi *Escovopsis* and *Escovopsioides* to a leaf-cutting ant-fungus symbiosis. *Frontier in Microbiology*. 12:1–17.
- Montoya, Q.V., Martiarena, M.J.S., Bizarria, R., Gerardo, N.N., Rodrigues, A. (2021) Fungi inhabiting attine ant colonies: reassessment of the genus *Escovopsis* and description of *Luteomyces* and *Sympodiorosea* gens. *Nov. IMA Fungus*. 23:1-18.
- Morini, M.S.C., Bueno, O.C., Bueno, F.C., Leite, A.C., Hebling, M.J.A., Pagnocca, F.C., Fernandes, J.B., Vieira, P.C., Silva, M.F.G.F. DA. (2005) Toxicity of sesame seed to leafcutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*. 45:195-204.

- Negri, G., May De Mio, L.L., Wordell Filho, J.A. (2010). Produção e armazenamentode *Trichothecium roseum* para uso como biopesticida. *Scientia Agraria*. 11: 247-254.
- Oliveira, F. Melo, M.R., Buzato, J.B. (2020) Effect of agro-industrial residues mixtures on thr production of endoglucanase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Acta Scientiarum Technology*. 42:1-9.
- Ottati-de-Lima, E.L., Batista Filho, A., Almeida, J.E.M., Gassen, M.H., Wenzel, I.M., Almeida, A.M.B., Zapellini, L.O. (2014) Produção semissólida de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em diferentes substratos e efeito da radiação ultravioleta e da temperatura sobre propágulos desses entomopatógenos. *Arquivos do Instituto Biológico*. 77:1-9.
- Pagnocca, F.C. (2015) *Escovopsis trichodermoides* sp. nov., isolated from a nest of the lower attine ant *Mycocepurus goeadii*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 3:731-740.
- Pietrobon, T.C., Kooij, P.W., Montoya, Q.V., Rodrigues, A. (2022) *Escovopsioides nivea* is a non-specific antagonistic symbiont of ant-fungal crops. *Fungal Ecology*. 56:1-9.
- Poulsen, M., Cafaro, M.J., Erhardt, D.P., Little, A.E.F., Gerardo, N.M., Tebbets, B., Currie, C.R. (2009) Variation in *Pseudonocardia* antibiotic defence helps govern parasite-induced morbidity in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. *Environmental Microbiology Reports*. 4:534–540.
- Quinelato, S., Golo, P.S., Perinotto, W.M.S., Sá, M.G.C., Angelo, I.C., Moraes, A.M.L., Bittencourt, V.R.E.P. (2012). Virulence potential of *Metarhizium anisopliae* s.1. isolates on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larve. *Veterinary Parasitology*, 190:556-565.
- Rahardjo, Y. S.P., Tramper, J., Rinzema, A. (2006) Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. *Biotechnology Advances*. 24:16-179.
- Reynolds, H.T., Currie, C.R. (2004) Pathogenicity of *Escovopsis weberi*: The parasite of the attine ant-microbe symbiosis directly consumes the ant-cultivated fungus. *Mycologia*. 96:955–959.
- Safavi, S.A., Shah, F.A., Pakdel, A.K., Rasouljan G.R., Bandani, A.R., Butt, T.M. (2007) Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beuaveria bassiana*. *FEMS Microbiology Letters*. 270:116-123.

- Semenova, T.A., Hughes, D.P., Boomsma, J.J., Schiøtt, M. (2011) Evolutionary patterns of proteinase activity in attine ant fungus gardens. *BMC Microbiology*. 11:1-11.
- Silva, A., Rodrigues, A., Bacci, M., Pagnocca, F.C., Bueno, O.C. (2006). Susceptibility of the ant-cultivated fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales: Basidiomycota) towards microfungi. *Mycopathologia*. 162:115-119.
- Tonet, G.L., Reis, E.M. (1979) Patogenicidade de *Beauveria bassiana* em inseto-praga da soja. *Pesquisa agropecuária brasileira*. Brasília, 14:89-95,
- Wood, R.K.S., Tveit, M. (1955) Control of plant diseases by use of antagonistic organisms. *Botanical Review*. 21:441-492.



#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

Estudos sobre alternativas de controle ao uso dos químicos são cada vez mais necessários, em virtude de aumentos crescentes sobre informações dos prejuízos ocasionados ao uso excessivo de compostos químicos em cultivos agrícolas. O controle através de microrganismos são alternativas promissoras para o manejo de pragas, porém o controle de insetos como as formigas cortadeiras necessita de múltiplas alternativas para o controle. As formigas possuem mecanismos de proteção que podem reduzir a eficácia de métodos de controle.

Os trabalhos relatados nesta dissertação descrevem duas possibilidades de redução dos danos ocasionados por *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. A primeira com uso de plantas de *Eucalyptus grandis* tratadas com diferentes métodos de inoculação de *Beauveria bassiana*, no qual foi possível observar alteração no forrageamento e comportamento de operárias. A inoculação de *B. bassiana* também promoveu o aumento do diâmetro do caule, massa fresca e seca da parte aérea.

A segunda possibilidade de redução de dano é através do uso de *Escovopsis* ssp. para infecção do jardim de fungo. O trabalho aqui relatado descreveu metodologias para a produção massal de quatro isolados de *Escovopsis* ssp., no qual foi observado que aveia laminada proporciona o melhor ambiente para produção de *Escovopsis* ssp., e que influencia na produção de conídios e virulência.

Os resultados dos trabalhos descritos nesta dissertação proporcionam alternativas para a redução de danos de formigas cortadeiras em curto prazo com uso de plantas tratadas com *B. bassiana* e em médio/longo prazo com a disponibilidade de informações de base para a multiplicação de *Escovopsis* ssp.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akello, J., Dubois, T., Gold, C.S., Coyne, D., Nakavuma, J., Paparu, P. (2007) *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin as an endophyte in tissue culture banana (*Musa* spp.). *Journal of Invertebrate Pathology*. 96:34–42.
- Alurappa, R., Chowdappa, S. (2018) Antimicrobial activity and phytochemical analysis of endophytic fungal extracts isolated from Ethno-Pharmaceutical Plant *Rauwolfia tetraphylla* L. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 12:317-332.
- Alves, B.S., Lopes, R.B. (2008) Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. In: Alves, S.B. (ed.) *Controle microbiano de pragas na América Latina: Avanços e desafios*. Piracicaba, p. 69-104.
- Alves, S.B. (1992) Perspectiva para utilização de fungos entomopatogênicos no controle de pragas no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 27:77-86.
- Araújo, M.S., Rodrigues, C.A., Oliveira, M.A., Jesus, F.G. (2015) Controle biológico de formigas-cortadeiras: o caso da predação de fêmeas de *Atta* spp. por *Canthon virens*. *Revista de Agricultura Neotropical*. 2:8–12.
- Augustin J.O., Simões T.G., Dijksterhuis J., Elliot S.L., Evans H.C. (2017) Putting the waste out: a proposed mechanism for transmission of the mycoparasite *Escovopsis* between leafcutter ant colonies. *Royal Society Open Science*. 4:1-16.
- Azevedo, J. (2014) Endophytic Fungi from Brazilian Tropical Hosts and Their Biotechnological Applications. In: Kharwar, R., Upadhyay, R., Dubey, N.,

- Raghuwanshi, R. (eds) *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security*. Springer, New Delhi, p. 17-22.
- Azevedo, J.L., Maccheroni, Júnior, W., Araújo, W.L. (2003) Importância dos microorganismos endofíticos na agricultura. *In: Luz, W.C. (Ed). RAPP: Revisão anual de patologia de plantas*. Passo Fundo: Padre Berthier dos Missionários da Sagrada Família, p. 333-71.
- Baccaro, F.B., Feitosa, R.M., Fernandez, F., Fernandes, I.O., Izzo, T.J., Souza, J.L.P., Solar, R. (2015) Guia para os gêneros de formigas do Brasil. Editora INPA, Manaus, p. 1-388.
- Bamisile, B.S, Dash, C.K., Akutse, K.S., Qasim, M., Aguila, L.C., Wang, F., Keppanan, R., Wang, L. (2019). Endophytic *Beauveria bassiana* in foliar-treated Citrus limon plants acting as a growth suppressor to three successive generations of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). *Insects*. 19:1-15.
- Barelli L, Moonjely S, Behie S.W., Bidochka M.J. (2016) Fungi with multifunctional lifestyles: endophytic insect pathogenic fungi. *Plant Mol Biol*. 90:657–646.
- Batey, S.F.D., Greco, C., Hutchings, M.I., Wilkinson, B. (2020) Chemical warfare between fungus-growing ants and their pathogens. *Current Opinion in Chemical Biology*. 59:172-181.
- Batista, K.O.M., Silva, D.V., Nascimento, V.L., Souza, D.J. (2022) Effects of *Thichoderma strigosellum* in *Eucalyptus urophylla* development and leaf-cutting ant behavior. *Journal of Fungi*. 8:1-14.
- Bernardo, C.C., Barreto, L.P., Silva, C.S.R.E., Luz, C., Arruda, W., Fernandes, É.K.K. (2018) Conidia and blastospores of *Metarhizium* spp. And *Beauveria bassiana* s.l.: Their development against the tick *Rhipicephalus microplus*. *Ticks Tick Borne Diseases*. 5:1334-1342.
- Bittleston, L., Brockmann, F., Wcislo, W., Van Bael, S. (2011) Endophytic fungi reduce leaf-cutting ant damage to seedlings. *Biology Letters*. 7:30–32.
- Boaretto, M.A.C., Forti, L.C. (1997) Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. *Série Técnica IPEF*. 11:31-46.
- Borba, R.S., Loeck, A.E., Bandeira, J.M., Moraes, C.L., Centenaro, E.D. (2006) Crescimento do fungo simbiote de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* em meios de cultura com diferentes extratos. *Ciência Rural*. 36:725-730.

- Brady, S. G., Schultz, T. R., Fisher, B. L., Ward, P. S. (2006) Evaluating alternative hypotheses for the early evolution and diversification of ants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 48:18172-18177.
- Britto, J.S., Forti, L.C., Oliveira, M.A., Zanetti, R., Wilcken, C.F., Zanuncio, J.C., Loeck, A.E., Caldato, N., Nagamoto, N.S., Lemes, P.G., Camargo, R.S. (2016) Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. *International journal of research in environmental studie*. 3:11-92.
- Cantagalli, L.B., Lopes, D.A., Stuchi, A.L.B., Ruvolo-Takasusuki, C.C.R. Leaf-cutting ants *Acromyrmex niger* Smith, 1858 (Hymenoptera: Formicidae) used as bioindicators of agrotoxics residues. *Acta Biologica Comlombiana*. 2:233-240.
- Cavero, P.A.S., Hanada, R.E., Gasparotto, L., Coelho Neto, R.A., Souza, J.T. (2015) Biological control of banana black Sigatoka disease with *Trichoderma*. *Ciência Rural*. 6:951-957.
- Cremer, S.; Armitage, S. A. O.; Schmid-Hempel, P. (2007) Social immunity. *Current Biology*. 17:693-702.
- Currie, C.R., Wong, B., Stuart, A.E., Schultz T.R., Rehner, S.A., Mueller, U.G., Sung, G. H., Spatafora, J. W., Straus, N.A. (2003) Ancient tripartite coevolution in the attine ant–microbe symbiosis. *Science*. 229:386–285.
- Currie, C.R., Wong, B., Stuart, A.E., Schultz, T.R., Rehner, S.A., Mueller, U.G. (2003) Ancient tripartite coevolution in the attine ant-microbe symbiosis. *Science*. 299:386-388.
- Davidson, D.W., Cook, S.C., Snelling, R.R., Chua, T.H. (2003) Explaining the Abundance of Ants in Lowland Tropical Rainforest Canopies. *Science*. 300:969-972.
- Daza, F.F.F., Roman, G.R., Rodriguez, M.V., Vargas, I.A.G., Heano, H.C., Cereda, M.P., Mulet, R.A.C. (2019) Spores of *Beuaveria bassiana* and *Trichoerma lignorum* as a bioinsecticide for the control of *Atta cephalotes*. *Biological research*. 52:1-28.
- De Bary, A. (1866) Morphologie und physiologie der Pilze, Flechten und Myxomycenten. Engelamn, Leipzig, p. 1-316.
- Del-Claro, K., Santos, J. C., Júnior, A. (2002) Etograma da formiga arborícola

- Cephalotes pusillus* (Klug, 1824) (Formicidae: myrmicinae). *Revista de Etologia*. 4:31-40.
- Della Lucia, T.M.C. (1993) As formigas cortadeiras. Editora Folha de Viçosa, Viçosa: UFV. 262p.
- Della Lucia, T.M.C. (2011) *Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo*. 1. Ed. Viçosa: UFV, 419p.
- Della-Lucia, T.M.C., Gandra, L.C., Guedes, R.N.C. (2014) Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. *Pest Management Science*. 70:14–23.
- Dussutour, A., Deneubourg, J.L., Beshers, S., Fourcassi, V. (2009) Individual e collective problem-solving in a foraging context the leaf-cutting ant *Atta colombica*. *Animal Cognition*. 1:21–30.
- El-Deeb, H.M., Lashin, S.M., Arab, YA-S. (2012) Reaction of some tomato cultivars to tomato leaf curl virus and evaluation of the endophytic colonisation with *Beauveria bassiana* on the disease incidence and its vector, *Bemisia tabaci*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 45:1538–1545.
- Farji-Brener, A.G., Ghermandi, L. (2008) Leaf-cutting ant nest near roads increase fitness of exotic plant species in natural protected areas. *Proceedings of the Royal Society*. 275:1431-1440.
- Feng, M.G., Poprawski, T.J. Khachatourians, G. (1994) Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beuavria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Science and Technology*. 1:3-34.
- Fisher, P. J., Stradling, D.J., Pegler, D.N. (1994) Formigas cortadeiras, seus jardins de fungos e a formação de basidiomata de *Leucoagaricus gongylophorus*. *Micologista*. 8:128-131.
- Fittkau, E.J., Klinge, H. (1973) On biomass and trophic structure of the Central Amazonian rain forest ecosystem. *Biotropica*. 1:2-14.
- Folgarait, P., Gorosito, N., Poulsen, M., Currie, C. R. (2011) Preliminary In Vitro Insights into the Use of Natural Fungal Pathogens of Leaf-cutting Ants as Biocontrol Agents. *Current Microbiology*. 3:250-258.
- Folgarait, P.J., Goffré, D., Giraldo Osorio, A. (2020) *Beuaveria bassiana* for the controlo fleafcutter ants: strain and host differences. *Biocontrol Science and Technology*. 30:996-1005.

- Forti, L.C., Pretto, D.R., Nagamoto, N. S., Padovani, C. R., Camargo, R. S., Andrade, A. P. P. (2007) Dispersal of the delayed action insecticide sufluramid in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*. 50:149-1163.
- Gao, F.K., Dai, C.C., Liu, X.Z. (2010) Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *Afr. J. Microbiol. Res.* 4:1346–1351.
- Gathage, J.W., Lagat, Z.O., Fiaboe, K.K.M., Akutse K.S., Ekese, S., Maniania, N.K. (2016) Prospects of fungal endophytes in the control of *Liriomyza leafminer* flies in common bean *Phaseolus vulgaris* under field conditions. *Bio Control*. 61:741–753.
- Geraldo, N.M., Mueller, U.G., Currie, C. (2004) Exploiting a mutualism: parasite specialization on cultivars within the fungus-growing ant symbiosis. *BMC Ecology and Evolution*. 6:1791–1798.
- Ghorbanpour, A., Salimi, A., Ghanbary, M.A.T., Pirdashti, H., Dehestani, A. (2018) The effect of *Trichoderma harzianum* in mitigating low temperature stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Scientia Horticulturae*. 230:134-141.
- Goffré, D., Cavallo, E.C., Cavalitto, S.F., Folgarait, P.J. (2018) Selection and yield optimisation of a *Beauveria bassiana* isolate for the biological control of leaf cutter ants. *Biocontrol Science and Technology*. 28:672-687.
- Goffré, D., Folgarait, P.J. (2018) Insights into the biodiversity and causes of distribution of potential entomopathogens associated with leaf-cutting ants. *Insectes sociaux*. 65:03-115.
- Gonzalez-Mas, N., Valverde-García, R., Gutiérrez-Sánchez, F., Quesada-Moraga, E. (2021) Effect of passage through the plant on virulence and endophytic behavioural adaptation in the entomopathogenic fungus *Beuaveria bassiana*. *Biological Control*. 160:1-7.
- Jaber, L.R., Ownley, B.H. (2018) Can we use entomopathogenic fungi as endophytes for dual biological control of insect pests and plant pathogens. *Biological Control*. 116:36-45.
- Jafelice, R., Almeida, C.G., Meyer, L.F.C., Vasconcelos, H. (2011) Fuzzy parameters in a partial differential equation model for population dispersal of leaf-cutting ants. *Nonlinear Analysis Real World Applications*. 6:3397-3412.
- Kandel, S.L., Herschberger, N., Kim, S.H., Doty, S.L. (2015) Diazotrophic

- endophytes of poplar and willow for growth promotion of rice plants in nitrogen-limited conditions. *Crop Science*. 55:1765-1772.
- Keller, S., Kessler, P., Schweizer, C. (2003) Distribution of insect pathogenic soil fungi in Switzerland with special reference to *Beauveria brongniartii* and *Metharhizium anisopliae*. *Biocontrol*. 48:7-19.
- Kruger, R.D., Posadas, J.B., Lewylle, M.A, Mini, J.I., Lecuona, R.E. (2014) Solid substrate production and formulation of an isolate of *Metarhizium anisopliae* for biological control of stem bug *Tibraca limbativentrisa*. *World Appl Sci*. 32:1242-1251.
- Lacey, L.A., Frutos, R., Kaya, H.K., Vail, P. (2001) Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future?. *Biological Control*. 21:230–248.
- Lefort, M-C., McKinnon A.C., Nelson T.L., Glare T.R. (2016) Natural occurrence of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* as a vertically transmitted endophyte of *Pinus radiata* and its effect on above- and below-ground insect pests. *New Zealand Plant Protection*. 69:68–77.
- Lima, C.A., Della-Lúcia, T.M.C., Anjos, N.S. (2001) Formigas cortadeiras: biologia e controle. UFV, Viçosa, p. 28.
- Lopez, E., Orduz, S. (2003) *Metarhizium anisopliae* and *Trichoderma viride* for control of nests of the fungus-growing ant, *Atta cephalotes*. *Biological Control*. 27:194–200.
- Loreto, R. G., Hughes, D. P. (2016) Disease in the Society: Infectious Cadavers Result in Collapse of Ant Sub-Colonies. *Plos One*. 11:1-13.
- Machado, A.C.R., Monteiro, A.C., Mochi, D.A., Yoshida, L. (2009) Resíduos e subprodutos agroindustriais e grãos como substratos para produção do fungo entomopatogênico *Lecanicillium lecanii*. *Bragantia*. 6:703-714.
- Małagocka, J., Eilenberg, J., Jensen, A.B. (2019) Social immunity behaviour among ants infected by specialist and generalist fungi. *Current Opinion in Insect Science*. 33:99–104.
- Mayhé-Nunes, A.J. (1991) Estudo de *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae) com ocorrência constatada no Brasil: subsídios para uma análise filogenética. 122 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- Marfetan, J.R., Romero, A.I., Folgarait, P.J. (2015) Pathogenic interaction between *Escovopsis weberi* and *Leucoagaricus* sp.: mechanisms involved and



- virulence levels. *Fungal Ecology*. 17:52-61.
- Mascarin, M.G., Biaggioni, R.L., Delalibera, Í., Kort, É.F.K., Luz, C., Faria, M. (2019) Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. *Journal of Invertebrate Pathology*. 165:46-53.
- Masiulionis, V.E., Pagnocca, F.C. (2020) In vitro study of volatile organic compounds produced by the mutualistic fungus of leaf-cutter ants and the antagonist *Escovopsis*. *Fungal Ecology*. 48: 100986.
- Mattoso, T.C., Moreira, D.D.O., Samuels, R.I. (2011) Symbiotic bacteria on the cuticle of the leafcutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* protect workers from attack by entomopathogenic fungi. *Biology letters*. 8:461-464.
- McKinnon A.C., Glare, T.R., Ridgway, H.J., Mendoza-Mendoza, A., Holyoake, A., Godsoe, W.K., Bufford, J.L. (2018) Detection of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* in the Rhizosphere of Wound-Stressed *Zea mays* Plants. *Front. Microbiol*. 9:1-16.
- Meirelles, L.A., Montoya, Q.V., Solomon, S.E., Rodrigues, A. (2015) New light on the systematics of fungi associated with attine ant gardens and the description of *Escovopsis kreiselii* sp. nov. *Plos one*. 10:1-14
- Mejia; S.Y.M.; Rodríguez, J., Montoya-Lerma, J. (2018) *Euphorbia cotinifolia* (Euphorbiaceae): a promising alternative for leaf cutting ant *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae) control. *Biocontrol Science and Technology*. 28:486-495.
- Méndez-González, F., Loera-Corral, O., Saucedo-Castañeda, G., Favela-Torres, E. (2018) Chapter 7: Bioreactors for the production of biological control agents produced by solid-state fermentation. *Curr Dev Biotechnol Bioeng*. 7:109–121.
- Mendonça, D.M.F., Caixeta, M.C.S., Martins, G.L., Moreira, C.C., Kloss, T.G., Elliot, S.L. (2021) Low virulence of the fungi *Escovopsis* and *Escovopsioides* to a leaf-cutting ant-fungus symbiosis. *Frontier in Microbiology*. 12:1–17.
- Meyling, N.V., Schmidt, N.M., Eilenberg, J. (2012) Occurrence and diversity of fungal entomopathogens in soils of low and high Arctic Greenland. *Polar Biology*. 35:1439–1445.
- Mighell, K., Van Bael, S. (2016) Selective elimination of microfungi in leaf-cutting ant gardens. *Fungal Ecology*. 24:15-20.

- Miranda-Fuentes, P., García-Crneros, A.B., Montilla-Carmona, A.M., Molinero-Ruiz, L. (2020) Evidence of soil-located competition as the cause of the reduction of sunflower verticillium wilt by entomopathogenic fungi. *Plant Pathology*. 69:1492-1503.
- Montoya, Q.V., Martiarena, M.S., Polezel, D.A.; Kakuzu, S., Rodrigues, A. (2019) More pieces to a huge puzzle: Two new *Escovopsis* species from fungus gardens of attine ants. *MycKeys*. 46:97–118.
- Montoya-Lerma, J., Giraldo-Echeverri, C., Armbrrecht, I., Farji-Brener, A., Calle, Z. (2012) Leaf-cutting ants revisited: Towards rational management and control. *International Journal of Pest Management*. 58:225–247.
- Mota Filho, T.M.M., Stefanelli, L.E.P., Camargo, R.S., Matos, C.A.O., Forti, L.C. (2021). Biological control in leaf-cutting ants, *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae), using pathogenic fungi. *Revista Árvore*. 45:1-10.
- Mousa, W.K., Raizada, M.N. (2013) The Diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes: An interdisciplinary perspective. *Front Microbiol*. 4:1-18, 2013.
- Mueller, U.G. (2002) Ant versus Fungus versus Mutualism: Ant-Cultivar Conflict and the Deconstruction of the Attine Ant-Fungus Symbiosis. *The American Naturalist*. 160:67:98.
- Murakami, T. (2020) Non-Inseminated Queens Have Worker-Like Behaviors in Colonies of Fungus-Growing Ants, *Mycetomoellerius turrifex* Wheeler (Attini, Hymenoptera). *Sociobiology*. 3:358-363.
- Oliveira, F. Melo, M.R., Buzato, J.B. (2020) Effect of agro-industrial residues mixtures on the production of endoglucanase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Acta Scientiarum Technology*. 42:1-9.
- Ottati-de-Lima, E.L., Batista Filho, A., Almeida, J.E.M., Gassen, M.H., Wenzel, I.M., Almeida, A.M.B., Zapellini, L.O. (2014) Produção semissólida de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em diferentes substratos e efeito da radiação ultravioleta e da temperatura sobre propágulos desses entomopatógenos. *Arquivos do Instituto Biológico*. 77:1-9.
- Parra, J.R.P., Botelho, P.S.M., Corrêa-Ferreira, B.S., Bento, J.M.S. Controle biológico: terminologia. In: Parra, J.R.P; Botelho, P.S.M.; Corrêa-Ferreira, B.S.; Bento, J.M.S. (2002) Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores. Manole, São Paulo, p. 1-16.

- Pimentel, I.C., Gabardo, J., Poitevin, C.G., Stuart, A.K.C., Azevedo, J.L. (2016) Incidence of endophytic fungi and occurrence of *Beauveria* and *Paecilomyces* in maize (*Zea mays* L.) under field and greenhouse conditions. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environmental Sciences*. 18:47–53.
- Posada, F., Vega F.E. (2005) Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) as an endophyte in cocoa seedlings (*Theobroma cacao*). *Mycologia* .97:1195–1200.
- Prakash, G.V.S.B., Padmaja, V., Kiran, R.R.D. (2008) Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. *Bioresour. Technol* 99:1530-1537.
- Quesada-Moraga, E., Muñoz-Ledesma, F., Santiago-Alvarez, C. (2009) Systemic protection of *Papaver somniferum* L. against *Iraella luteipes* (Hymenoptera: Cynipidae) by an endophytic strain of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Environmental Entomology*. 38:723–730.
- Rahardjo, Y. S.P., Tramper, J., Rinzema, A. (2006) Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. *Biotechnology Advances*. 24:16-179.
- Reynolds, H.T., Currie, C.R. (2004) Pathogenicity of *Escovopsis weberi*: The parasite of the attine ant-microbe symbiosis directly consumes the ant-cultivated fungus. *Mycologia*. 96:955–959.
- Rocha, S.L., Evans, H.C., Jorge, V.L., Cardoso, L.A.P., Pereira, F.S.T., Rocha, F.B., Barreto, R.W., Hart, A.G., Elliot, S.L. (2017) 7 Recognition of endophytic *Trichoderma* species by leaf-cutting ants and their potential in a Trojan-horse management strategy. *Royal Society Open Science*. 4:1-14.
- Rodrigues, K.F. (1994) The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. *Mycologia*. 3:376-386.
- Sánchez-Rodríguez, A., Sanz, M.R., Rodríguez, J.R.B. (2015) Occurrence of eight UV filters in beaches of Gran Canaria (Canary Islands). Na approach to environmental risk assessment. *Chemosphere*. 131:85-90.
- Schultz, T.R., Meier, R. (1995) A phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. *Systematic Entomology*. 4:337-370.
- Shabana Y.M, R. Charudattan, A.H. Abou T.J., Pablo M., Erin N. R., Waldemar K.

- (2010) Production and Application of the Bioherbicide Agent *Dactylaria Higginsii* on Organic Solid Substrates. *Biological Control*. 54:159-65.
- Sharma, A., Srivastava, A., Shukla, A., Srivastava, K., Srivastava, A., Saxena, A. (2020) Entomopathogenic Fungi: A Potential Source for Biological Control of Insect Pests. *In: Solanki M., Kashyap P., Kumari B. (eds) Phytobiomes: Current Insights and Future Vistas, Springer Nature Singapore Pte Ltd*, p. 225-250.
- Silva, A.C.L., Silva, G.A., Abib, P.H.N., Carolino, A.T., Samuels, R.I. (2020) Endophytic colonization of tomato plants by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for controlling the South American tomato pinworm, *Tuta absoluta*. *CABI Agriculture and Bioscience*. 1:1-9.
- Silva, D.G., Lucena Júnior, A., Sarmiento, R. A., Silva, C.L.S., Tenório, A.C.T., Souza, D.J.; Melo, M.S. (2020) Encapsulated baits containing zinc sulfate and *Trichoderma harzianum* reduce fungal garden in *Atta sexdens* colonies. *Revista de Agricultura Neotropical*. 7:46-52.
- Šimonovičová, A., Vojtková, H., Nosalj, S., Piecková, E., Švehláková, H., Kraková, L., Drahovská, H., Stalmachová, B., Kučová, K., Pangallo, D. (2021) *Aspergillus niger* environmental isolates and their specific diversity through metabolite profiling. *Frontier in Microbiology*. 12:1-13.
- Souza, D.J., Santos, J.F.L., Della Lucia, T.M.C. (2011) Organização social das formigas cortadeiras. *In: T. M.C. DELLA LUCIA (eds.), Formigas-cortadeiras da bioecologia ao manejo*. Viçosa: Editora UFV, p. 126–140.
- Stone, J.K., Bacon, C.W., e White, J.F. (2000) Uma Visão Geral dos Micróbios Endofíticos: Definido o Endofitismo. *In: Bacon, C.W., White, J.F, (eds.) Microbial Endophytes*, Marcel Dekker, Nova York, 3-29.
- Taerum, S.J., Cafaro, M.J., Little, A.E., Schultz, T.R., Currie, C.R. (2007) Low host-pathogen specificity in the leaf-cutting ants microbe symbiosis. *Proceedings of the Royal Society*. 274:1971-1978.
- Tian, B., Xie, J., Fu, Y. Cheng, J., Li, B., Chen, T., Zhao, Y., Gao, Z., Yang, P., Jian, D. (2020) A cosmopolitan fungal pathogen of dicots adopts an endophytic lifestyle on cereal crops and protects them from major fungal diseases. *The ISME Journal*. 14: 3120–3135.
- Tian, B., Xie, J., Fu, Y. Cheng, J., Li, B., Chen, T., Zhao, Y., Gao, Z., Yang, P., Jian, D. (2020) A cosmopolitan fungal pathogen of dicots adopts an

- endophytic lifestyle on cereal crops and protects them from major fungal diseases. *The ISME Journal*. 14: 3120–3135.
- Tomilova, O.G., Shaldyaeva, E.M., Kryukova, N.A., Pilipova, Y.V., Schmidt, N.S., Danilov, V.P., Kryukov, V.Y., Glupov, V.V. (2020) Entomopathogenic fungi decrease Rhizoctonia disease in potato in field conditions. *PeerJ*. 2020. 8:1-26.
- Travaglini, R.V., Stefanelli, L.E.P., Arnosti, A., Camargo, R.S., Forti, L.C. (2017) Isca encapsulada atrativa visando controle microbiano de formigas cortadeiras, *Tekhne e Logo*. 8:100-111.
- Truyens, S., Weyens, N., Cuypers, A., Vangronsveld, J. (2015) Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants. *Environmental Microbiology Reports*. 7:40–50.
- Valencia-Giraldo, S.M., Castaño-Quintana, K., Giraldo-Echeverri, C., Armbrecht, I., Montoya-Lerma, J. (2020) Refuse dumps in *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Myrmicinae) nests as a source of native entomopathogens for biological control. *Biocontrol Science and Technology*. 30:132-142.
- Vasconcelos, H.L., Fowler, H.G. (1999) Foraging and fungal substrate selection by leaf-cutting ants. In: Meer, R.K.V.; Jaffé, K., Cedeño, A. (Eds.), *Applied Myrmecology: A World Perspective*, Boulder: Westview Press, p. 410-419.
- Vega, F.E. (2008) Insect pathology and fungal endophytes. *Journal of invertebrate pathology*. 98:277-279.
- Vega, F.E. (2018) The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: A review. *Mycologia*. 110:4–30.
- Vieira, A.S., Morgan, E.D., Drijfhout, F.P., Camargo-Mathias, M.I. (2012) Chemical Composition of Metapleural Gland Secretions of Fungus-Growing and NonFungus-Growing Ants. *Journal of Chemical Ecology*. 38:1289–1297.
- Wheeler, W.N. (1910) *The ants: their structure, development and behavior*. New York, Columbia University Press, 663 p.
- Wilson, E.O. (1980) Caste and Division of Labor in Leaf-Cutter Ants (Hymenoptera: Formicidae: Atta). *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 7:143-156