

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS

**ISCAS BIOLÓGICAS PARA CONTROLE DE FORMIGAS
CORTADEIRAS (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**

Cruz das Almas, Fevereiro de 2016

ADLA MÉRCIA CAROBENSE DA PALMA

**ISCAS BIOLÓGICAS PARA CONTROLE DE FORMIGAS
CORTADEIRAS (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado do Curso de Engenharia Florestal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, pela estudante Adla Mércia Carobense da Palma, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Florestal, sob a orientação da Prof.^a Rozimar de Campos Pereira.

Cruz das Almas, Fevereiro de 2016

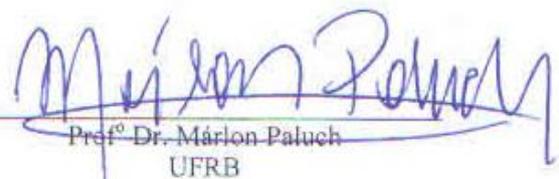
ADLA MÉRCIA CAROBENSE DA PALMA

**ISCAS BIOLÓGICAS PARA CONTROLE DE FORMIGAS CORTADEIRAS
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado do Curso de Engenharia Florestal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, pela estudante Adla Mércia Carobense da Palma, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Florestal, sob a orientação da Prof.^a Rozimar de Campos Pereira.

APROVADO:


Dr. Marcus Vinicius Masson
Copener Florestal Ltda.


Prof.^o Dr. Márlon Paluch
UFRB


Dr.^a Rozimar de Campos Pereira
Orientadora
UFRB

A Deus por me permitir chegar até aqui,
À minha família pelo amor e por estar sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Rozimar de Campos Pereira, por ter me conduzido com muita paciência e sabedoria necessária para elaboração deste trabalho.

Aos meus amigos agradeço a cada um que se dispôs a me ajudar e tranquilizar com apoio no dia-a-dia: Bruna Neybergh, Crislane Neves, Daniel Lima, José Linhares, Karol Damasceno, Renan Garrido, Renata Passos e Thaís Soares.

Aos meus pais Antônio e Alaide Palma pelo amor, confiança, paciência e incentivos, tornando possível a concretização deste sonho.

As minhas irmãs Amanda e Andressa Palma por serem as melhores amigas e companheiras.

Aos meus amados sobrinhos Benício e Isabela pelo carinho e alegria que me proporcionam.

As minhas tias que não viam a hora de me formar!

A todos os professores, colegas e técnicos, pelo conhecimento compartilhado.

A Universidade Federal do Recôncavo da Bahia pela oportunidade de enriquecer a minha vida profissional e pessoal através do Curso de Engenharia Florestal.

RESUMO

As formigas cortadeiras causam grandes prejuízos às culturas florestais e agrícolas, por ocasionar elevados danos nos plantios. O método químico, na atualidade, é a melhor alternativa no controle às formigas, sendo a forma mais usual as iscas granuladas que contém sulfluramida. Pesquisas que visam o uso de iscas biológicas formuladas com fungos entomopatogênicos poderiam vir a substituir este método. O objetivo deste trabalho foi formular e testar iscas biológicas a base de fungo entomopatogênico. A metodologia foi desenvolvida no *Campus* da UFRB na cidade de Cruz das Almas, com a obtenção de isolados, crescimento vegetativo e produção de conídios em meio e cultura (BDA), isolamento dos conídios no corpo dos insetos, preparação das suspensões concentradas a $1,0 \times 10^7$ e $1,0 \times 10^8$ conídios /mL para cada fungo. Para o teste de patogenicidade foram coletadas operárias maiores de formigueiros de *Atta laevigata* “saúva-cabeça-de-vidro”. Na confecção das iscas foram coletados materiais vegetais como folhas de angico-vermelho, acalifa, rosa, e também resíduo de laranja e farinha de trigo. Depois de prontas, foi realizada a avaliação de atratividade e carregamento das iscas pelas operárias, com a contagem do tempo gasto. Os isolados *Aspergillus flavus* e *Trichoderma harzianum*, foram patogênicos a operárias de *A. laevigata* em laboratório. Todas as iscas formicidas testadas apresentam igual atratividade à *A. laevigata*, com tempo médio de carregamento de 0,67 minutos, apresentando o angico-vermelho menor tempo para transporte. O delineado foi em blocos casualizados, com os dados submetidos a análise de variância com teste Tukey a 5 % de probabilidade.

Palavras-chave: Fungos entomopatogênicos, Controle biológico, Atrativos.

ABSTRACT

Leaf-cutter ants cause great loss to forest and agricultural crops, by causing significant damage in plantations. Nowadays, the chemical method is the best alternative to control these ants. The most common form of this method is the granulated baits that contain sulfuramide. Research that aim at the use of biological baits formulated with entomopathogenic fungi could come to replace this method. The objective of this study was to develop and test biological baits using entomopathogenic fungi. The methodology was developed on the UFRB campus in the city of Cruz das Almas, with isolated fungi, vegetative growth and conidia production in culture medium (PDA), isolation of conidia in the body of insects, preparation of suspensions concentrated to $1,0 \times 10^7$ and $1,0 \times 10^8$ conidia /mL for each fungus. For the pathogenicity test, large workers were collected from *Atta laevigata* colonies. In the manufacturing of baits, plant materials such as “angico vermelho” leaves (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan), acalypha wilkesiana and roses were collected, as well as orange and flour wastes. Once ready, an evaluation of attractiveness and carrying of the baits by the workers was performed, recording the time they spent. The isolated *Aspergillus flavus* and *Trichoderma harzianum* were pathogenic to the *A. laevigata* in laboratory. All insecticide baits tested present equal attractiveness to the *A. laevigata*. The average carrying time was 0,67 minutes and the “angico-vermelho” presented the lowest transportation time. The design was in randomized blocks and the data was submitted to analysis of variance by the Tukey’s test at 5% probability.

Keywords: Entomopathogenic fungi, Biological control, Attractive.

SUMÁRIO

i. RESUMO	6
ii. ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3. OBJETIVOS	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÃO	36
7. REFERÊNCIAS	37

1. INTRODUÇÃO

As formigas cortadeiras representam as mais importantes pragas do setor florestal brasileiro, elevando os custos de implantação e manutenção de florestas plantadas (MARICONI, 1970; DELLA LUCIA, 1993, HERNANDEZ; JAFFÉ, 1995). O controle desses insetos pode representar altos custos de produção e do tempo gasto no controle de outras pragas (VILELA, 1986) e 30% dos gastos com a floresta até o terceiro ciclo (ALÍPIO, 1989), o que corresponde a 7,41% do preço da madeira em pé (REZENDE et al., 1983).

Por ser considerada uma praga em potencial e causar sérios desfolhamento tem-se buscado modelo de estudo no desenvolvimento de novos formicidas, com a finalidade de serem usados para permitir seu controle, reduzindo assim as perdas causadas por sua atividade forrageira (NAGAMOTO et al., 2004, 2007).

Estes formicidas têm sido desenvolvidos para serem empregados na forma de isca granulada, pois é a principal técnica de controle que tem demonstrado eficiência na redução de danos causados por estas formigas (FORTI et al., 2007). Entretanto, segundo Forti et al. (1998), seu desenvolvimento em escala industrial, com adição de ingredientes ativos conhecidos pode ser considerado relativamente recente, pois somente a partir de 1960 é que foram testadas com resultados satisfatórios. Desde então, diversos estudos foram realizados não somente com a finalidade de tornar esta técnica cada vez mais eficiente, como também reduzir sua agressão aos agroecossistemas (BOARETTO; FORTI, 1997).

A maior parte destes estudos se depara com a dificuldade de encontrar um bom formicida, pois além de eficiente contra as formigas, deve conter características físico-químicas que reduzam seu efeito tóxico ao meio ambiente como, por exemplo, o tempo necessário para que ocorra sua degradação após a aplicação no campo (BOARETTO; FORTI, 1997; FORTI et al., 1998). Um exemplo de ingrediente ativo cujo uso como formicida foi proibido são os clorados (dodecacloro, aldrin e heptacloro) (NAKANO, 1994), devido ao seu poder residual muito elevado, persistindo no ambiente por muitos anos, podendo contaminar o homem e animais, sendo substituído pela sulfluramida (LARANJEIRO; ZANUNCIO, 1995).

As empresas de reflorestamento têm empregado o controle químico de formigas cortadeiras de forma sistemática, através de iscas, termonebulização e fumigantes, sendo o aspecto econômico das operações de grande importância, em virtude dos altos

custos envolvidos. Os produtos comerciais disponíveis até alguns anos atrás eram, de modo geral, formulados à base de inseticidas clorados, mas cuja fabricação foi suspensa pela legislação brasileira. O dodecacloro, ingrediente ativo mais usado até sua proibição, foi substituído pela sulfluramida, mas permaneceram os danos ecológicos. Além do alto custo ocasionado pelo uso de iscas à base de sulfluramida, os aspectos ambientais têm levado as empresas a investir na melhoria do rendimento operacional das técnicas de controle químico e na experimentação de novas tecnologias, objetivando minimizar os impactos ao meio ambiente e atendendo as demandas de certificação. (BOARETTO e FORTI 1997).

No ano de 2009 a sulfluramida foi enquadrada como poluente orgânico e todos os produtos à base dessa substância, registrados no Brasil, foram proibidos em empresas que desejam manter ou obter o selo verde FSC (Forest Stewardship Council), ou Conselho de Manejo Florestal. O FSC é o selo de maior reconhecimento mundial para indústrias florestais e obtê-lo significa manter-se no mercado internacional (ARAÚJO, 2011). Por consequência, torna-se urgente a procura por novos ingredientes ativos para iscas formicidas de eficácia similar ou superior à sulfluramida, existindo a necessidade de estimular pesquisas que visam o uso de iscas biológicas para o controle de formigas. Neste contexto, novas tecnologias utilizando iscas formuladas com fungos entomopatogênicos poderiam vir a substituir o método químico (LOUREIRO; MONTEIRO, 2005).

As perspectivas atuais de controle biológico das formigas cortadeiras encontram-se relacionadas, principalmente, à investigação de microrganismos agentes de controle biológico, sendo os fungos os mais usados, devido ao modo como atacam o hospedeiro (por contato ou por ingestão), pela sua grande quantidade na natureza e variabilidade genética (OTTATI-DE-LIMA, 2007). Com técnicas adequadas de bioensaios é possível isolar fungos altamente virulentos, com características adequadas para serem utilizados como inseticidas visando o controle de inúmeras pragas de culturas, principalmente as formigas cortadeiras (ALVES, 1998).

A formiga *Atta laevigata* (F. Smith, 1858), cujos nomes populares mais frequentes são "saúva-cabeça-de-vidro" e "saúva-de-vidro", apresenta vasta distribuição geográfica (quase todo o Brasil) e é nociva. Segundo Gonçalves (1960) realiza corte de gramíneas e dicotiledôneas, porém, prefere estas últimas. A literatura menciona seus danos em eucaliptos, pinheiros, milho, mandioca, cana de açúcar, coqueiros novos, algodoeiro, menstraço, guanxuma branca, capim-gordura, grama-batatais e rabo-de-vaca

(LUEDERWALDT, 1926; GONÇALVES, 1960). Poucos trabalhos foram realizados sobre esta espécie com relação ao seu controle biológico.

Por isso, pesquisas que visem à descoberta ou que ao menos possam servir de subsídios científicos para o desenvolvimento de novos ingredientes ativos para serem empregados em iscas formicidas são de extrema importância, pois permitem o uso de produtos fitossanitários seguros e eficientes, tornando-se uma opção de controle ambientalmente e economicamente viável.

Nesse contexto, uma alternativa para o controle das formigas saúvas é o controle biológico com o uso de fungos entomopatogênicos. O controle biológico é específico, permanente e econômico (ALVES, 1998), pois, em geral, os gastos com a utilização de produtos biológicos são menores, em comparação com outros produtos. Entretanto, há poucas informações sobre o efeito desses fungos no controle de formigas cortadeiras ou formigas lava-pés (PEREIRA et al., 1993).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. As formigas cortadeiras

As formigas cortadeiras, que abrangem os gêneros *Atta* (conhecidas como saúvas) e *Acromyrmex* (quenquéns), são insetos da ordem Hymenoptera, subfamília Myrmicinae, família Formicidae, tribo Attini. São de hábito social, uma vez que se organizam em grupos, apresentando diferentes castas e divisão de atividades bem definida. Estas desenvolveram o hábito de cultivar um fungo simbiote do gênero *Leucoagaricus* do qual se alimentam (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

Elas ocorrem em muitos países do novo mundo, com exceção do Chile e das ilhas de Cuba e Trinidad e Tobago (MICHELS et al., 2001). Todas as Attini cultivam um fungo que é a principal fonte alimentar das larvas e que também constitui parte da alimentação dos adultos (MUELLER, 2002; SILVA et al., 2003). Entretanto, no Brasil as formigas dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* têm maior importância agrícola.

Ambos os gêneros têm sido descritos como os herbívoros dominantes da Região Neotropical, consumindo muito mais vegetação que qualquer outro grupo de animais de diversidade taxonômica comparável, com a inclusão também de mamíferos, hemípteros e lepidópteros (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

Encontram-se distribuídos por todo o território nacional e com intensa atividade durante o ano, atacando várias culturas agrícolas, pastagens e, em particular, os reflorestamentos (HERNANDEZ; JAFFÉ, 1995), desde as plantas em viveiros até o campo definitivo (ZANETTI et al., 2003).

A sobrevivência da formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Formicidae: Myrmicinae: Attini) está associada ao sucesso no cultivo do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* (Möller) Singer (Basidiomycota: Agaricales), o qual lhe serve como principal suplemento alimentar durante milhões de anos de coevolução, sendo necessário o corte de partes de plantas para ser incorporado como substrato no seu jardim (MUELLER, 2002).

Porém, além da estreita relação desta espécie com seu fungo simbiote, também pode ocorrer uma associação negativa (não simbiote) com outros fungos como, por exemplo, *Escovopsis* (Ascomycota) que é um parasita especializado do fungo *L. gongylophorus* com origem conhecida nos jardins de Attini, podendo ser horizontalmente transmitido entre as colônias (CURRIE et al., 1999) ou por espécies de invertebrados que vivem em associação com o cultivo do fungo de formigas e que

ocasionalmente se movem entre as colônias transportando-o (CURRIE, 2001). A comunidade microbiana dentro das colônias é considerada bastante extensa, pois vem sendo reportada por Rodrigues et al. (2008) e Mendes et al. (2012), os quais relatam a existência de associações com diferentes espécies de fungos.

Entretanto, estudos relatam o comportamento da comunidade microbiana após o uso de ingredientes ativos em iscas formicidas (RODRIGUES, 2004; CARLOS et al., 2011), principalmente *Escovopsis* spp., *Syncephalastrum racemosum* (Cohn) Schröter (Zygomycota), *Trichoderma harzianum* Rifai (Ascomycota) e *Fusarium oxysporum* Schlechtendal (Ascomycota) fungos que prevaleceram após serem tratados com iscas tóxicas, sendo o rápido crescimento de fungos filamentosos devido, provavelmente, ao estresse causado na associação entre formiga e fungo simbiote (RODRIGUES et al., 2005).

As iscas contendo ingrediente ativo com ação rápida, dependendo da idade da colônia, podem não matá-la, mas afetá-la drasticamente com a morte de operárias. Com essas infecções persistentes, o fungo parasita ocasiona um impacto significativo na sanidade e sobrevivência dos ninhos, diminuindo a taxa de crescimento, esta traduzida na redução da biomassa tanto de formigas como do fungo simbiote (CURRIE, 2001).

Contudo, o uso de iscas que promovam sinergismo com fungos parasitas pode provocar um impacto inicial muito grande na colônia, pois além da grande mortalidade de operárias e desorganização da divisão de trabalho, pode ainda, favorecer o estabelecimento do fungo parasita dentro do ninho, potencializando o controle destas.

As formigas cortadeiras desempenham diferentes funções de acordo com suas castas, que são divisões morfofisiológicas dos indivíduos de uma colônia de acordo com sua função na sociedade. As castas são divididas em temporárias e permanentes. Temporárias (alados sexuais) são as fêmeas (tanajuras ou içás) e machos (bitus). Permanentes (ápteros sexuais) as rainhas são férteis, põem os ovos e mantêm a colônia organizada. As operárias são estéreis, divididas em: a) Jardineiras - cultivam o fungo. b) Cortadeiras - cuidam da prole, cortam e transportam o alimento e constroem o ninho. c) Soldados - defendem a colônia e auxiliam as cortadeiras (ZANETTI et al. 2002).

3.2. Importância econômica

Os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* são de grande importância econômica, devido ao desfolhamento de plantas, na maioria das vezes atacam monoculturas como substrato para o fungo mutualista, o qual é cultivado no interior de câmaras subterrâneas (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

As formigas-cortadeiras utilizam diversas plantas para cultivar o fungo do qual se alimentam. Elas podem cortar flores e folhas ou utilizar porções já desprendidas. São conhecidas pela complexidade de suas preferências, dependentes, em parte, das características físicas dos vegetais (REIS FILHO et al., 2007). Parâmetros químicos e físicos influenciam na aceitação desses materiais pelas formigas (FOWLER; STILES, 1980). De modo geral, as formigas cortadeiras têm preferência pelas partes tenras das plantas (REIS FILHO et al., 2007).

Segundo Amante (1967), dez saúveiros adultos ha^{-1} cortam aproximadamente 21 Kg de folhas dia^{-1} , reduzindo em mais de 50% a capacidade de pastagem, além de proporcionar maior desenvolvimento de plantas daninhas. Os prejuízos causados pela atividade de *A. sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae), numa densidade de 4 colônias ha^{-1} foram calculados em 14% para plantações de *Eucalyptus* spp. e 14,5% para a produção de *Pinus* spp. (AMANTE, 1972). *A. sexdens rubropilosa* é popularmente conhecida como “sauva-limão” e encontra-se distribuída pelos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Mato Grosso, Goiás e Paraná (DELLA LUCIA et al., 1993). Segundo Zanetti et al. (2003), as formigas-cortadeiras são consideradas as principais pragas de reflorestamentos no Brasil.

3.3. Métodos de controle

Devido aos grandes prejuízos que as formigas cortadeiras podem causar em plantações florestais, medidas de controle devem ser adotadas como forma de minimizar seus danos e perdas de produtividade. Os principais métodos de controle de formigas cortadeiras estudados são: químico, cultural, físico, biológico, mecânico e resistência de plantas (ARAÚJO et al., 2003). Em razão de sua importância econômica, a escolha na utilização do método de controle se torna essencial para manter a produtividade dos cultivos. Existem diversas formas de controle, porém todas sem grande sucesso (DELLA LUCIA, 1993).

Na década de 50, com o desenvolvimento de inseticidas sintéticos, os métodos químicos têm sido efetivamente utilizados no controle destes insetos, seja pelos pequenos produtores ou grandes empresas (OLIVEIRA et al., 2011).

O controle cultural consiste na aração e gradagem do solo para formigueiros com até quatro meses de idade, pois, nesta fase, a colônia tem uma única câmara que se localiza a aproximadamente 20 centímetros de profundidade do solo havendo grande probabilidade das lâminas do equipamento atingirem e matar a rainha (DELLA LUCIA, 1993; OLIVEIRA et al., 2011).

O método de controle cultural é com uso de culturas armadilhas ao redor da cultura principal. Essas plantas podem ser atrativas ou provocarem efeitos tóxicos ou repelentes para as formigas cortadeiras, afastando-as da cultura principal por um tempo (DELLA LUCIA, 1993; BOARETTO; FORTI, 1997).

O controle mecânico assemelha-se ao cultural, consistindo na escavação dos formigueiros até que a rainha seja localizada e morta. É um método para pequenas áreas e ninhos iniciais (DELLA LUCIA, 1993).

O método físico consiste no uso de barreiras para proteger a copa das árvores é um método antigo e muito utilizado para se evitar o ataque das formigas, no qual são usados cones plásticos invertidos e tiras plásticas cobertas com graxa ou vaselina colocadas nos troncos das árvores, impedindo que as formigas subam para desfolhar. Este é um método eficiente, que necessita de vistorias e reparos constantes para que a proteção das árvores seja prolongada (JUSTI JUNIOR. et al., 1996).

3.3.1. Controle Químico de formigas-cortadeiras

Considerados insetos eficientes no corte e transporte de folhas, as formigas-cortadeiras possuem várias características biológicas e comportamentais que lhes conferem tal denominação. Contudo, tais características constituem uma barreira para a utilização de novas moléculas e técnicas de controle dessas pragas (MARINHO et al., 2006).

Entretanto, o controle químico dessas formigas tem sido efetivamente utilizado desde a década de 50 do século passado, quando os inseticidas foram sintetizados, variando na formulação e modo de aplicação, sendo o único com tecnologia disponível para utilização prática no controle de formigas-cortadeiras, principalmente com o uso de iscas tóxicas (BOARETTO; FORTI, 1997). Outros métodos de controle vêm sendo testados para formigas-cortadeiras (biológico, por exemplo), no entanto, o controle

químico é o único com tecnologia disponível para uso em grande escala, destacando-se a termonebulização e as iscas tóxicas como as técnicas mais eficientes (MOREIRA et al., 2004).

O controle químico é o único que detém tecnologia disponível para ser utilizado em escala comercial no controle de formigas cortadeiras, apesar de todas restrições no seu uso (BUENO, 2013). Apresenta várias formulações, entre elas os pós, que são formulados à base de deltametrina, clorpirifós, malation ou fention e aplicados com equipamento manual denominado polvilhadeira. A morte das formigas acontece pelo contato direto com o produto (OLIVEIRA et al., 2011).

A termonebulização consiste na produção de uma fumaça tóxica, a partir da queima de óleo diesel ou querosene, no qual é liberada junto ao formicida. A aplicação é feita diretamente nos olheiros, através de equipamentos denominados termonebulizadores. Esse método é considerado eficiente para o controle de grandes ninhos em áreas extensas, sendo atualmente uma das formas mais empregadas no controle de formigas cortadeiras (BOARETTO; FORTI, 1997; OLIVEIRA et al., 2011).

A isca granulada consiste na mistura de um ingrediente ativo dissolvido em óleo de soja e incorporado a um substrato atrativo, geralmente polpa cítrica desidratada, prensados na forma de *pellets*. É um método eficiente, embora apresente limitações de uso em dias chuvosos e em áreas muito extensas, além da possibilidade de intoxicação de outros animais (BOARETTO; FORTI, 1997; OLIVEIRA et al., 2011).

Dentre as formas existentes de controle das formigas cortadeiras o destaque é para o controle químico, principalmente, pela formulação iscas granuladas. No Brasil, os ingredientes ativos registrados para uso em iscas são o fipronil, o clorpirifós e a sulfluramida (BOARETTO; FORTI, 1997). A sulfluramida é derivada de um composto químico pertencente à família do PFOS, um poluente orgânico persistente, biocumulativo e carcinogênico (OECD, 2002; COMISSÃO de Revisão dos POPs, 2006).

Em maio de 2009 o Brasil e outros 182 países participaram da 4ª reunião da Convenção de Estocolmo, na qual tratavam sobre o tema Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs). A convenção deliberou a incorporação do ácido perfluooctano sulfônico (PFOS) que incluem compostos derivados como a sulfluramida e do perfluorooctano sulfonil fluoreto (PFOSF) na lista dos POPs (CONFERÊNCIA das Partes, 2009). Porém, por não existir um substituto para a sulfluramida, a Convenção

decidiu aceitar a continuidade de seu uso na produção exclusiva de iscas formicidas, alertando para o a diminuição desse poluente (CONFERÊNCIA das Partes, 2009).

Além dessa limitação, empresas que desejam manter ou obter o selo FSC (Forest Stewardship Council), devem adaptar-se. O FSC é hoje o selo mais reconhecido mundialmente, com presença em mais de 75 países. Seu objetivo é difundir o uso racional da floresta, garantindo sua existência no longo prazo. Para atingir este objetivo, o FSC criou um conjunto de regras reconhecidas internacionalmente, chamadas Princípios e Critérios, que conciliam as salvaguardas ecológicas com os benefícios sociais e a viabilidade econômica (WWF, 2016).

Uma das estratégias para se alcançar este selo e diminuir o uso desses químicos poluentes está no controle biológico com uso de fungos entomopatogênicos. Este método certamente é uma área promissora de pesquisa, mas ainda são necessários conhecimentos biológicos para que estratégias de controle para formigas cortadeiras possam ser, de fato, aplicadas. Vários autores já testaram a ação de entomopatogênicos sobre as formigas (BUSARELLO, 2008; CASTILHO et al., 2010; JACCOUD et al., 1999; LOUREIRO; MONTEIRO, 2005; LOPEZ; ORDUZ, 2003; QUIROZ, 1996; SANTOS et al., 2007).

3.3.2. Controle biológico de formigas-cortadeiras

O controle biológico consiste no emprego de um organismo (predador, parasita ou patógeno) que ataca outro que esteja causando danos econômicos às culturas. É uma forma que visa diminuir a população praga. No entanto, a introdução de inimigos naturais no ambiente, ainda não pode ser visualizada como estratégia de controle para as formigas cortadeiras devido aos poucos estudos nesta área (BOARETTO; FORTI, 1997; DELLA LUCIA, 1993).

Por outro lado, pesquisas relacionadas às condições ambientais como luz e temperatura já foram exploradas por alguns autores para explicar respostas comportamentais e formas de controle alternativo (PARRA et al., 1974; ROCES; KLEINEIDAM, 2000), bem como o uso de plantas com propriedades inseticidas, podendo provocar efeitos diretos sobre as operárias de formigas-cortadeiras ou indiretos sobre o crescimento de seu fungo simbionte.

Outro campo bem explorado é o uso de agentes entomopatogênicos como *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. (Ascomycota: Hypocreales) e *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales) para o controle de formigas

(JACCOUD et al., 1999; LOUREIRO & MONTEIRO, 2005) ou combinados com inseticidas (SANTOS et al., 2007). Porém, apesar dos esforços envolvendo o conhecimento de áreas relacionadas a outros métodos, o controle químico de formigas-cortadeiras ainda se constitui no método mais amplamente utilizado, por ser considerado o mais eficiente dentre os métodos de controle disponíveis (OLIVEIRA et al., 2011).

No Brasil, a maioria dos estudos tem sido realizada com os fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, contudo, os resultados ainda não são conclusivos. (BOARETTO; FORTI, 1997).

O fato dos entomopatógenos serem muito estudados deve-se às suas características, pois atuam por contato e ingestão, existem em grande quantidade na natureza, sendo o solo o seu maior reservatório, e devido a sua grande variabilidade genética, tornando-se difícil do inseto se tornar resistente (ALMEIDA; BATISTA FILHO, 2006).

O ciclo das relações fungo-hospedeiro depende das condições ambientais, como temperatura, luz, umidade, radiação solar e condições nutricionais e suscetibilidade do hospedeiro e apresenta as seguintes fases: adesão, germinação, formação de apressórios, formação do grampo de penetração, penetração, colonização e reprodução (ALMEIDA; BATISTA FILHO, 2006).

Nas fase de adesão os mecanismos envolvidos ainda não são totalmente conhecidos. Sabe-se que existem forças eletrostáticas envolvidas, além de relações de umidade e temperatura. A germinação ocorre quando o fungo encontra condições favoráveis de umidade (acima de 90%), temperatura de 23 a 30°C, pH (5,5 a 7,0), oxigênio e nutrição, o fungo germina produzindo o tubo germinativo. A formação de apressórios acontece numa dilatação na extremidade do tubo germinativo. Onde ocorre a migração de conteúdo citoplasmático tornando esta área num ponto de intensa atividade metabólica. A formação do grampo de penetração pode ocorrer uma diferenciação da hifa no apressório, tornando-a mais saliente, transformando-a numa espécie de grampo para perfuração da cutícula do inseto. Na penetração estão envolvidos os processos físico e químico, sendo que neste ocorre à liberação de enzimas como: quitinases, lipases e proteases, que facilitam a penetração mecânica. A colonização ocorre quando a hifa penetra e inicia o crescimento e colonização do corpo do inseto a partir dos corpos gordurosos, passando para o tubo digestivo, causando paralisação da alimentação e interrupção alimentar, atinge o sistema nervoso causando a paralisação do inseto, os músculos, tornando o inseto rígido e atinge a traquéia por onde

sai o corpo do inseto para se reproduzir. O fungo pode se reproduzir por processos sexual ou assexual, sendo que a maioria dos trabalhos realizada para o controle de pragas é com a fase assexuada (ALMEIDA; BATISTA FILHO, 2006).

Para uma melhor dinamização no uso de fungos criou-se formulações para que pudessem ser aplicadas de maneira mais eficiente. Alves (1998) descreve formulações de produtos biológicos que são de grande utilidade na obtenção de grânulos de micélios de fungos imobilizados, como sua adição em iscas granuladas, que é um método econômico e prático.

Nesse sentido uma consideração importante é com relação à aceitação das iscas, que deve apresentar características como atratividade, características físicas, como massa e diâmetro compatíveis para o bom carregamento, além da influencia de vários fatores, bióticos e abióticos, que interferem diretamente na sobrevivência e propagação dos entomopatógenos (SILVA, 2007).

3. OBJETIVOS

Geral:

O objetivo deste trabalho é formular e testar uma isca biológica a base de fungos entomopatogênicos confeccionadas com diferentes substratos, bem como testar sua atratividade em campo.

Específicos:

1. Avaliar a patogenicidade de quatro isolados de fungos entomopatogênicos em laboratório sobre formigas cortadeiras de *Atta laevigata* (F. Smith, 1858) (Hymenoptera: Formicidae).
2. Testar atratividade das iscas confeccionadas com diferentes substratos no campo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.2. Área experimental

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Entomologia e área experimental do *Campus* da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, localizado na cidade de Cruz das Almas, na região do Recôncavo Baiano, no planalto pré-litorâneo, a uma latitude de 12°40'19" Sul, longitude de 39°06'22" WGr e a 220 m de altitude. A região apresenta clima subúmido, com umidade relativa média do ar de 80%, temperatura média anual de 24°C e precipitação média de 1.224 mm/ano (EMBRAPA, 1993). Os meses mais chuvosos são abril e maio (150 mm/mês), e os mais secos, setembro e outubro (60 mm/mês).

Parte dos trabalhos foram desenvolvidos em formigueiros selecionados de *Atta laevigata* no *Campus* da UFRB, em Cruz das Almas.

4.2.1. Procedência dos isolados de fungos entomopatogênicos

Os isolados testados usados no bioensaios foram obtidos da Coleção de Fungos Entomopatogênicos da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (isolados coletados em Campo).

Insetos mortos foram coletados utilizando pinças entomológicas na área de plantio da Copener Florestal em Inhambupe – Bahia e em áreas da UFRB, sendo estes, já encontrados mortos com indício de desenvolvimento fúngico (figura 1). Os insetos coletados foram acondicionados em pequenos recipientes de vidro e identificados com data e local de coleta. Os recipientes foram levados ao laboratório e em seguida colocados em câmara úmida por três dias para favorecer a esporulação ($28\pm 1^\circ\text{C}$, $80\pm 1\%$ de UR) medido por termohigrômetro modelo 303C.

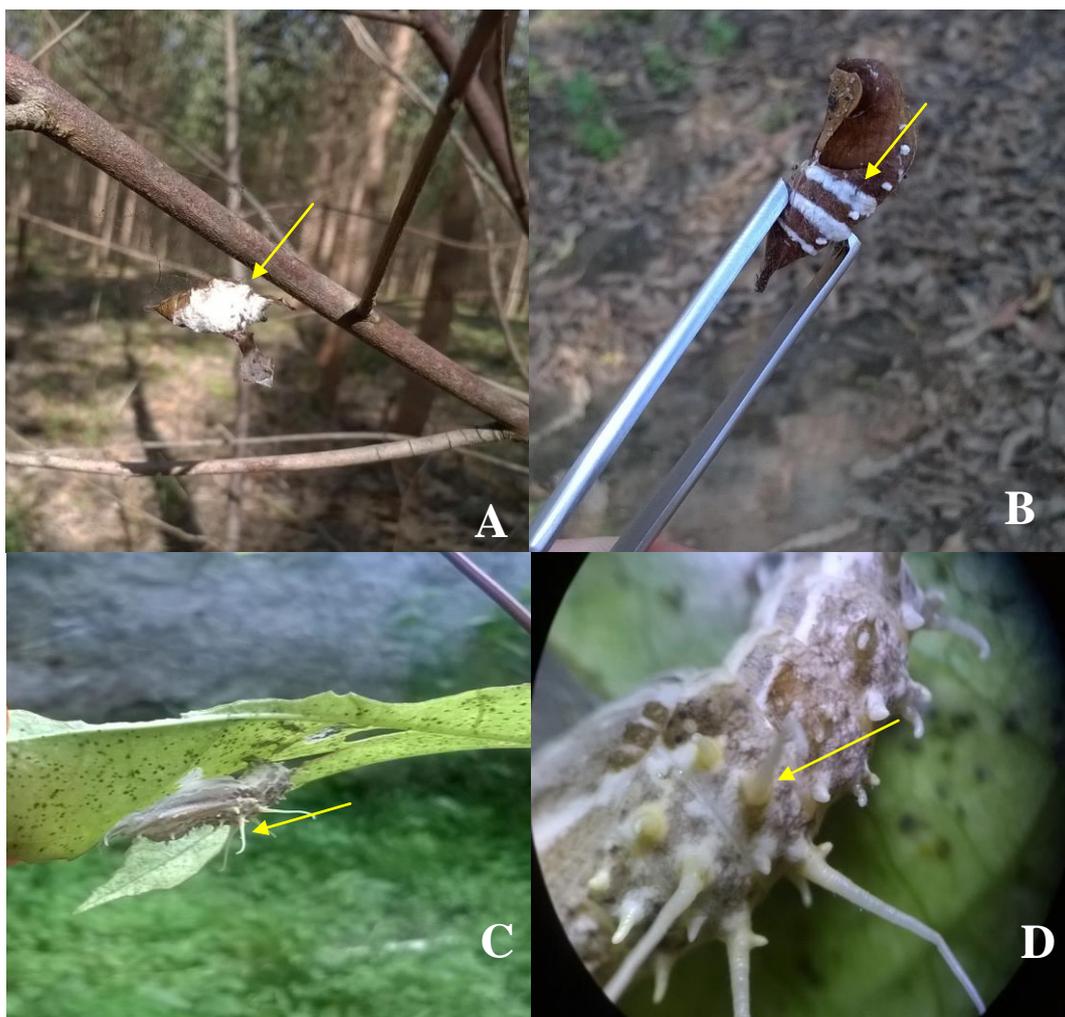


Figura 1. Fungos encontrados em pupas de lepidópteros da espécie *Sarsina violascens* (A), com extrusão fúngica (B) coletados na Copener Florestal, em Inhambuê. Lepidópteros com extrusão fúngica em pupas de *Dione juno juno* na cidade de Cruz das Almas (C, D).

Posteriormente o corpo dos insetos foram esterilizados externamente inserindo-os por um minuto em hipoclorito de sódio a 1% e em seguida em álcool 70% por 30 segundos, transferindo-os para solução de tiosulfato de sódio a 10% para remoção do cloro por mais 30 segundos, enxaguando por três vezes em água destilada. Após a esterilização, os insetos foram colocados em placa de petri com algodão umedecido em água destilada colocados em câmara úmida para esporulação.

4.1.2. Crescimento vegetativo e produção de conídios em meio e cultura

O isolamento dos conídios no corpo dos insetos se deu com auxílio de uma agulha fina e esterilizada. Esses esporos foram colocados em lâmina com corante azul de metileno a 1% diluído em água destilada, para microscopia e identificação preliminar no microscópio ótico Olympus CX21 com objetiva de 100x. Em câmara de fluxo

laminar vertical previamente esterilizada com álcool 70%, cada fungo foi inoculado em um ponto central nas placas através de uma alça de platina, previamente flambada sobre placas de Petri, contendo meio de cultura BDA (200 g de extrato de batata, 20 g de ágar-ágar e 20 g de dextrose em 1000 mL de água destilada), sendo necessária a realização de repicagens visando à purificação das colônias de fungos. As placas foram armazenadas em temperatura ambiente e umidade relativa do ar ($28\pm 1^\circ\text{C}$, $80\pm 1\%$ de UR) medido por termohigrômetro modelo 303C. O período de incubação foi de 15 dias.

4.1.3. Identificação dos isolados

Posteriormente foram preparadas lâminas para identificação desses fungos em microscópio ótico, com auxílio de chaves dicotômicas e ajuda de um taxonomista especialista em micologia, Dr^a Thaís Feijó, utilizando de literatura específica (Humber 1998 e Rifai 1969).

4.1.4. Preparação das suspensões

Para as suspensões foram utilizados quatro fungos: *Aspergillus flavus* – (Trichocomaceae); *Paecilomyces lilacinus* - (Trichocomaceae); *Trichoderma harzianum* - (Hypocreaceae) e *Cladosporium* sp - (Davidiellaceae) (Tabela 1). Os conídios foram removidos por meio de raspagem, com auxílio de espátula de metal, previamente flambada, do meio de crescimento (BDA), a seguir foram preparadas em solução em água destilada estéril. A contagem do número de esporos foi feita em câmara de Neubauer em microscópio ótico (100x) e suas concentrações foram ajustadas por meio de diluições em série de $1,0 \times 10^7$ e $1,0 \times 10^8$ conídios /mL de acordo com a literatura, para cada fungo.

Tabela 1. Procedência dos isolados testados em condições de laboratório.

Espécie	Características	Origem	Hospedeiro
<i>Aspergillus flavus</i>	Cosmopolita, produz micotoxinas (aflatoxinas) responsáveis por grandes perdas econômicas. Causam infecções oportunistas em humanos. Produtor de enzimas de interesse alimentício.	Copener	<i>Atta</i> sp.

<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Saprófita, encontrado na rizosfera de muitas culturas. Pode desenvolver-se num amplo intervalo de temperatura – dos 8°C aos 38°C e tem grande tolerância ao pH. Apresenta resultados promissores para o controlo biológico contra os nemátodes das galhas das raízes.	Campus da UFRB (Cruz das Almas, BA)	Lagarta
<i>Trichoderma harzianum</i>	Utilizado como fungicida foliar e tratamento de sementes. Os produtos biotecnológicos comerciais como 3Tac têm sido úteis para o tratamento de <i>Botrytis</i> , <i>Fusarium</i> e <i>Penicillium</i> sp. É também utilizado para a fabricação de enzimas.	Copener Florestal	Cochonilha
<i>Cladosporium</i> sp.	Endofítico importante no controle biológico de insetos e de fungos fitopatogênicos envolvidos na deterioração do grão de café. Atua como regulador das populações de pulgões.		Inseto não identificado

4.1.5. Teste de Patogenicidade a *Atta laevigata* em laboratório.

Para o teste de patogenicidade foram coletadas no mês de dezembro de 2015, operárias maiores de formigueiros de *Atta laevigata* “saúva-cabeça-de-vidro” obtidos de saúvas com intensa atividade, localizado no campus da UFRB (12°65’S, 39°08’W), com o auxílio de pinça entomológica. As operárias maiores foram transportados para o laboratório em frascos plásticos de 145 mL com tampa, sendo esses materiais previamente esterilizados. As operárias foram mantidas no laboratório em

condições ambientais de temperatura e umidade relativa do ar ($28\pm 1^{\circ}\text{C}$, $80\pm 1\%$ de UR) por uma hora até a realização do teste.

Estas foram divididos em grupos de oito, para cada tratamento ($T=9$), número total de formigas 288 previamente desinfestadas em hipoclorito de sódio a 1% e imergidas, em suspensões com concentrações de $1,0 \times 10^7$ e $1,0 \times 10^8$ conídios/mL e um tratamento contendo apenas água destilada (testemunha). Em seguida, as formigas foram colocadas no interior de câmaras úmidas e mantidas em local com temperatura ambiente de $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$, com umidade relativa do ar acima de 80%, mantendo-se assim, condições ideais para os insetos e fungos. Durante a condução do experimento não foi oferecido alimento as operárias. A avaliação foi realizada computando a mortalidade diária dos indivíduos de cada tratamento durante 168 horas. Nesse período, foi calculada, para cada isolado, a mortalidade acumulada = [(número de indivíduos mortos/número total de indivíduos)*100]. Para confirmação da mortalidade pelo fungo, as operárias maiores mortas foram desinfestados externamente com álcool 70% e água destilada.

Para confirmação da morte as formigas, foram colocados em placas de Petri mantidas a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$, com umidade relativa do ar acima de 80%. A confirmação da mortalidade pelo patógeno se deu pela observação do crescimento micelial e conidiogênese do fungo sobre cadáver das formigas. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento, sendo 8 operárias por repetição. Para o teste de mortalidade acumulada as médias foram transformadas em Raiz de $Y+1,0-\text{SQRT}(Y+1,0)$, pelo programa Sisvar. Para obtenção dos valores de TL50 (em horas) procedeu-se análise de Probit.

4.3. Confeção das iscas atrativas

Para confecção das iscas foram feitas coletas de plantas (Tabela 2) no *campus* da UFRB, enquanto a laranja e o trigo foram obtidas comercialmente. A confecção das iscas foi feita de forma artesanal, as folhas e bagaço da laranja foram secas em estufa a 50°C durante 48h. Em seguida, foram trituradas em liquidificador até pó. Misturou-se então a farinha de trigo (aglutinante), óleo de soja (lubrificante) e água destilada na proporção, em peso, de 14:5:1 (farinha de trigo: material triturado: óleo de soja). Posteriormente, a pasta formada foi colocada em uma seringa de 60 mL e confeccionado os *pellets*. As iscas foram deixadas para secar a temperatura ambiente por 48h e posteriormente cortadas com o comprimento de aproximadamente 2 mm

semelhante à isca comercial padrão, três marcas muito utilizadas apresentam diâmetros: $2,15 \pm 0,12$; $2,58 \pm 0,15$ e $2,60 \pm 0,16$ mm. A testemunha nos testes de atratividade consistiu de grânulos de farinha de trigo sem atrativo. As iscas foram confeccionadas com grânulos de massa semelhante à da carga média transportada por operárias de *Atta bisphaerica* (determinada previamente em 1200 forrageadoras) com carga média de ± 8 mg (Lima et al., 2003), com formato e diâmetro semelhantes ao das iscas granuladas comerciais.

Tabela 2. Espécies vegetais utilizadas como atrativos no desenvolvimento das iscas artesanais.

Nome vulgar	Espécie	Família
Acalifa	<i>Acalypha wilkesiana</i>	Euphorbiaceae
Angico-vermelho	<i>Anadenanthera macrocarpa</i> (Benth.) Brenan	Fabaceae
Mini rosa	<i>Rosa chinensis</i> var. <i>mínima</i>	Rosaceae

4.2.1 Avaliação da atratividade e carregamento das iscas no campo

Foram utilizados quatro formigueiros previamente marcados de *Atta laevigata* medindo em média 10 m² de área de terra solta conforme Della Lucia (1993), distantes aproximadamente 50 m um do outro. Localizados no Campus da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas. Os testes foram realizados no mês de julho de 2015. Para avaliação da atratividade das iscas seguiu-se os seguintes tratamentos: iscas de folhas; iscas de polpa cítrica e iscas sem atrativo. As iscas foram oferecidas aos formigueiros de *A. laevigata* Inicialmente observou-se o horário e o carreiro de maior atividade de forrageamento dos ninhos. Em seguida foram oferecidos 10 grânulos a cada lado do carreiro a uma distância de 10 cm dos tratamentos. Durante o teste foram realizadas observações visuais, a partir das 17 horas, horário de início das atividades de forrageamento nos ninhos.

Dentro do período de observação foi verificado o tempo gasto para o primeiro contato físico, o tempo para o início do recrutamento das iscas e o tempo gasto para transportar todos os *pellets*. Os testes foram realizados seis vezes em cada formigueiro. O experimento foi delineado em blocos casualizados, em que cada formigueiro correspondeu a um bloco. Para análise do tempo gasto no recrutamento e no transporte das iscas realizou-se análise de variância com teste Tukey a 5 % de probabilidade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2. Crescimento dos fungos

O isolado de *P. lilacinus* mostrou colônia com micélio flocoso, coloração vinho e reverso incolor, abundante esporulação, sendo os conídios elipsóides, com parede lisa. As colônias do *Trichoderma harzianum* são de rápido crescimento micelial branco-verde dá origem rapidamente a conidióforos agregados, muito ramificados em tufo. O *Aspergillus flavus* apresentou micélio de cor verde e conídios esféricos ou semi-esféricos, levemente rugosos. O *Cladosporium* sp. apresentou colônias forma aveludadas, com dobras radiais, em tons verdes oliva ao marrom (Figura 2).

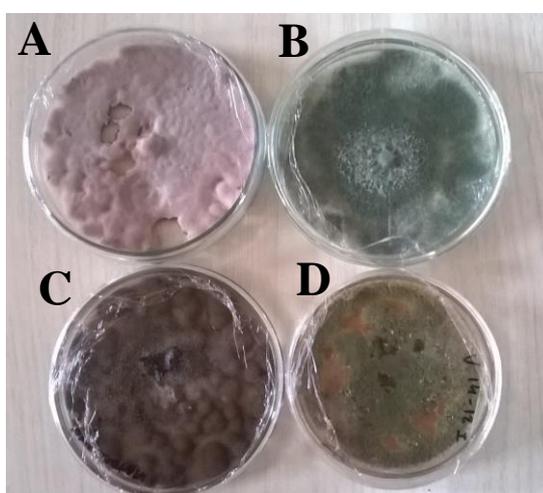
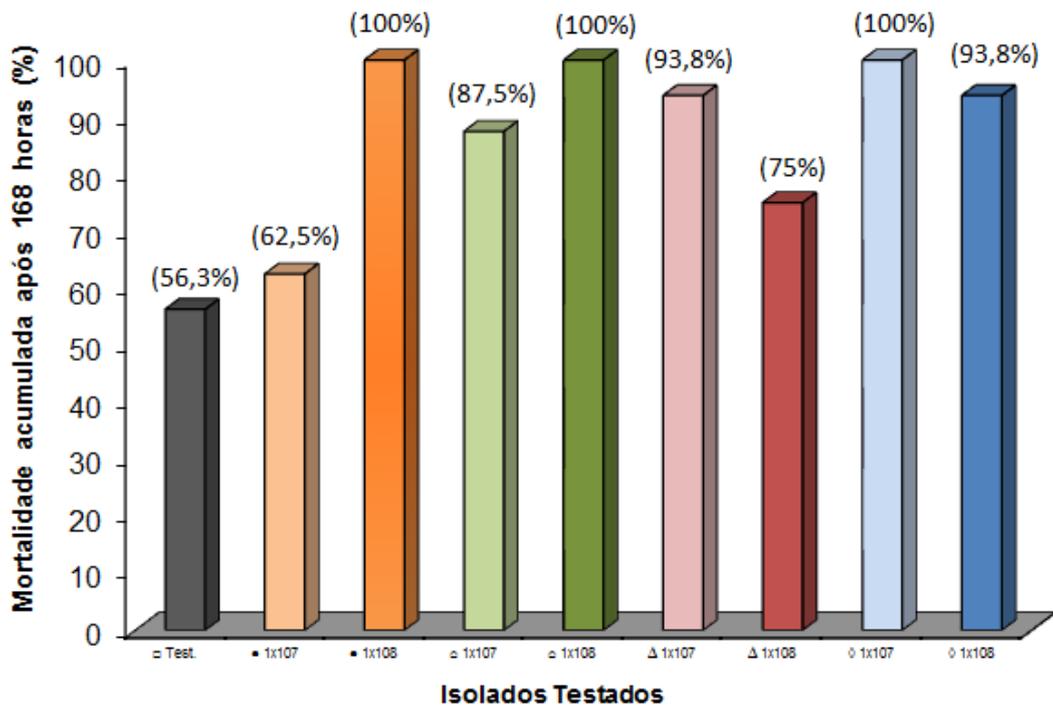


Figura 2. Crescimento das colônias em meio BDA dos fungos (A) - *Paecilomyces lilacinus*, (B) - *Trichoderma harzianum*, (C) - *Cladosporium* sp. e (D) - *Aspergillus flavus*.

5.3. Teste de patogenicidade

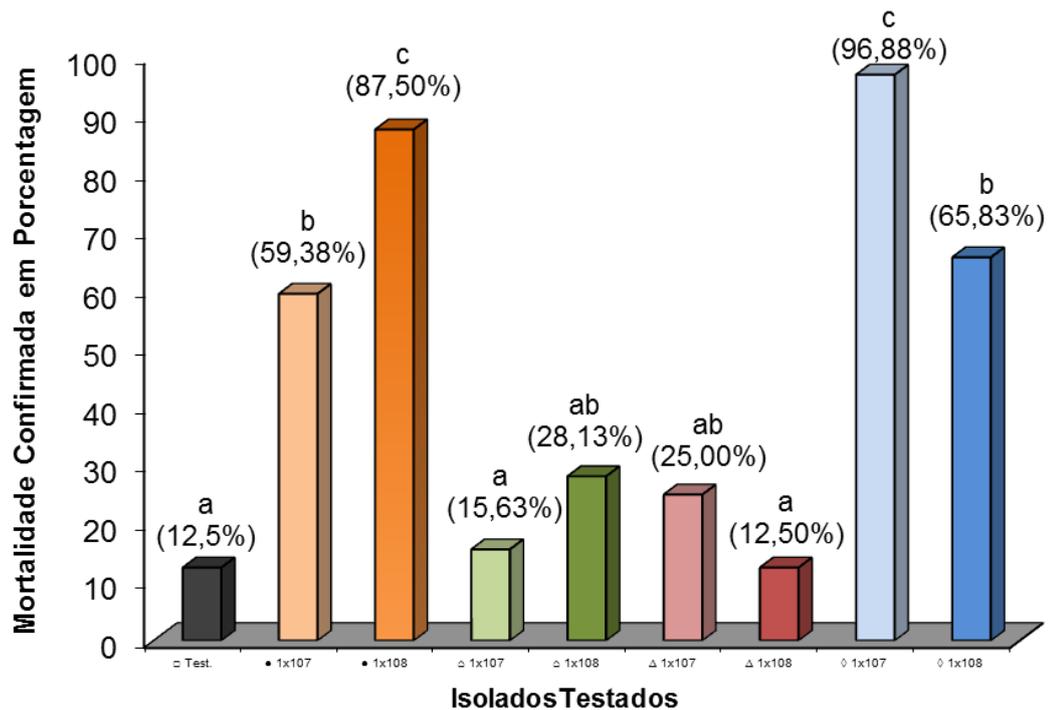
Por meio dos resultados apresentados, no experimento em laboratório, os fungos testados foram visualizados a partir das 72 horas após a inoculação, provocando mortalidade superior à observada no tratamento Testemunha (água) e continuou até 168 h após inoculação, quando ocorreu mortalidade total para maioria dos tratamentos com fungos (Figura 3). O fato da mortalidade das formigas ser maior de 50% pode estar associado além da morte pelo isolado, com a falta de alimento, doença ou senescência dessas.



□ - Testemunha; ● - *Trichoderma harzianum*; ◻ - *Cladosporium* sp. Δ - *Paecilomyces lilacinus*; ◊ - *Aspergillus flavus*.

Figura 3. Mortalidade acumulada de operárias de *Atta laevigata* ao final de 168 horas após a inoculação com *Trichoderma harzianum*, *Cladosporium* sp. *Paecilomyces lilacinus* e *Aspergillus flavus* nas concentrações de $1,0 \times 10^7$, $1,0 \times 10^8$, em condições de laboratório.

Dos quatro isolados testados sobre operárias maiores da espécie de saúva, os isolados de *Cladosporium* sp. e *Paecilomyces lilacinus* causaram menos de 28,13% de mortalidade após 168 horas da inoculação dos fungos (figura 4), por ser considerada baixa foram excluídos para futura consideração como agentes de controle biológico dessas formigas.



*Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

□ - Testemunha; ● - *Trichoderma harzianum*; ◻ - *Cladosporium sp.* Δ - *Paecilomyces lilacinus*; ◊ - *Aspergillus flavus*.

Figura 4. Mortalidade confirmada de operárias de *Atta laevigata* após 72 horas e ao final de 168 horas da inoculação com isolados de *Trichoderma harzianum*, *Cladosporium sp.*, *Paecilomyces lilacinus* e *Aspergillus flavus*, em condições de laboratório.

Analisando a patogenicidade dos isolados, em função do tempo após a inoculação, observou-se que os isolados *Trichoderma harzianum* e *Aspergillus flavus* foram virulentos para cada uma das duas concentrações sendo as médias 59,4% e 87,5% e 96,8% 65,6% respectivamente para 1,0x10⁷ 1,0x10⁸ (figura 4).

Os fungos *T. harzianum* e *A. flavus* foram capazes de crescer em cadáveres de operárias maiores de *A. laevigata* (Figura 5), sendo essa característica favorável, pois sugere que os isolados apresentam potencial epizootico, ou seja, capacidade de causar infecções secundárias e, portanto, de atingirem um maior número de indivíduos na colônia (DIEHL-FLEIG et al., 1988).

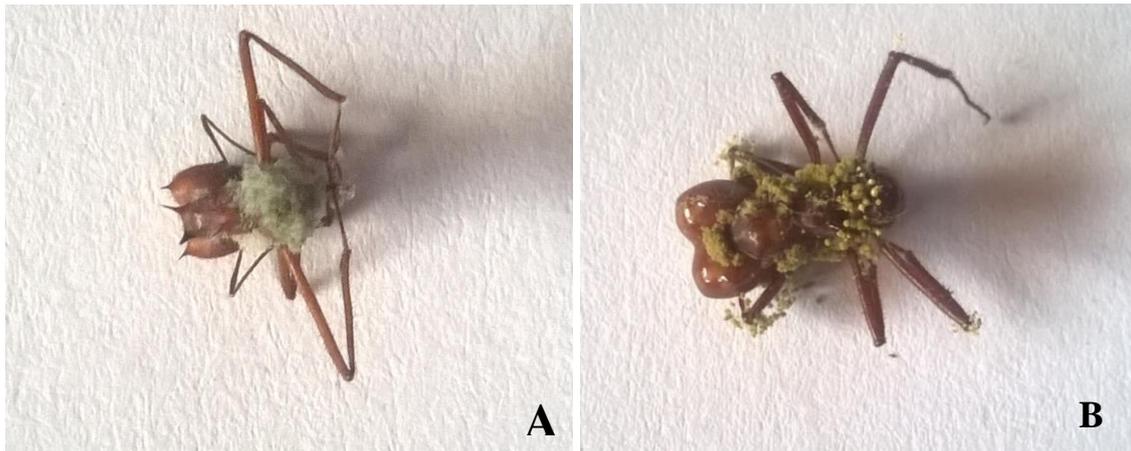


Figura 5. Extrusão fúngica sobre o corpo de operárias de *A. laevigata* (A) *Trichoderma harzianum* e (B) *Aspergillus flavus*.

Os dois fungos apresentaram capacidade semelhante de crescer em cadáveres de formigas. Todavia, houve diferenças entre isolados quanto às concentrações, tendo os isolados de *Trichoderma* a $1,0 \times 10^8$ e *Aspergillus* com a concentração de $1,0 \times 10^7$ apresentando alta mortalidade, mostrando maior capacidade de esporular em cadáveres de *A. laevigata*. Isolados de *B. bassiana* esporulou sobre 88% dos cadáveres de operárias de *S. invicta* (PEREIRA et al., 1993), dado esse inferior ao encontrado no presente trabalho (96,8%) para o isolado de *Aspergillus* em *A. laevigata*.

Aspergillus flavus, embora considerado saprófitas (DOMSCH et al., 1980), podem causar doenças em insetos em determinadas circunstâncias (HUGHES; BOOMSMA, 2004).

Segundo QUIROZ (1996) os fatores de mortalidade mais importantes para rainhas de *A. mexicana* são os fungos entomopatogênicos. Em levantamentos realizados pelo autor, no México, foram identificadas várias espécies, destacando-se nos ensaios de patogenicidade *B. bassiana*, *Paecilomyces farinosus*, como os mais promissores no controle biológico.

Os fungos *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *P. farinosus* se mostraram eficientes patógenos, pois provocaram alta mortalidade, matando mais que 80% de soldados de *A. sexdens sexdens* em condições de laboratório, nos quatro primeiros dias de aplicação. (LOUREIRO; MONTEIRO, 2005)

Os melhores resultados de controle de formigas cortadeiras utilizando-se fungos foram obtidos em condições de laboratório, onde se pode observar mortalidade de até 100% de grupos isolados de formigas (ALVES; SOSA GÓMES, 1983; JACCOUD, 1996). A baixa efetividade em campo é atribuída a diversos fatores comportamentais e

fatores químicos (JACCOUD *et al.*, 1999). Contra a formiga *S. invicta* o fungo *B. bassiana* demonstra ser uma forma promissora de controle biológico, causando mortalidade em todos os estágios de desenvolvimento (OI *et al.*, 1994).

Quanto ao teste de atratividade não houve diferença significativa entre as médias referentes ao primeiro contato dos grânulos em nenhum dos formigueiros avaliados. O tempo médio para o encerramento dos testes foi de 6,47 minutos, e neste período as operárias carregaram praticamente 100% de todos grânulos em todos os testes (Figura 6). A isca confeccionada apenas com trigo por não apresentar atrativos foi a que apresentou menor atratividade, pois foi a que apresentou maior tempo para ser transportada. Durante os testes, as operárias tocaram intensamente com suas antenas nos grânulos de folhas de acalifa, angico vermelho, laranjeira e roseiras.

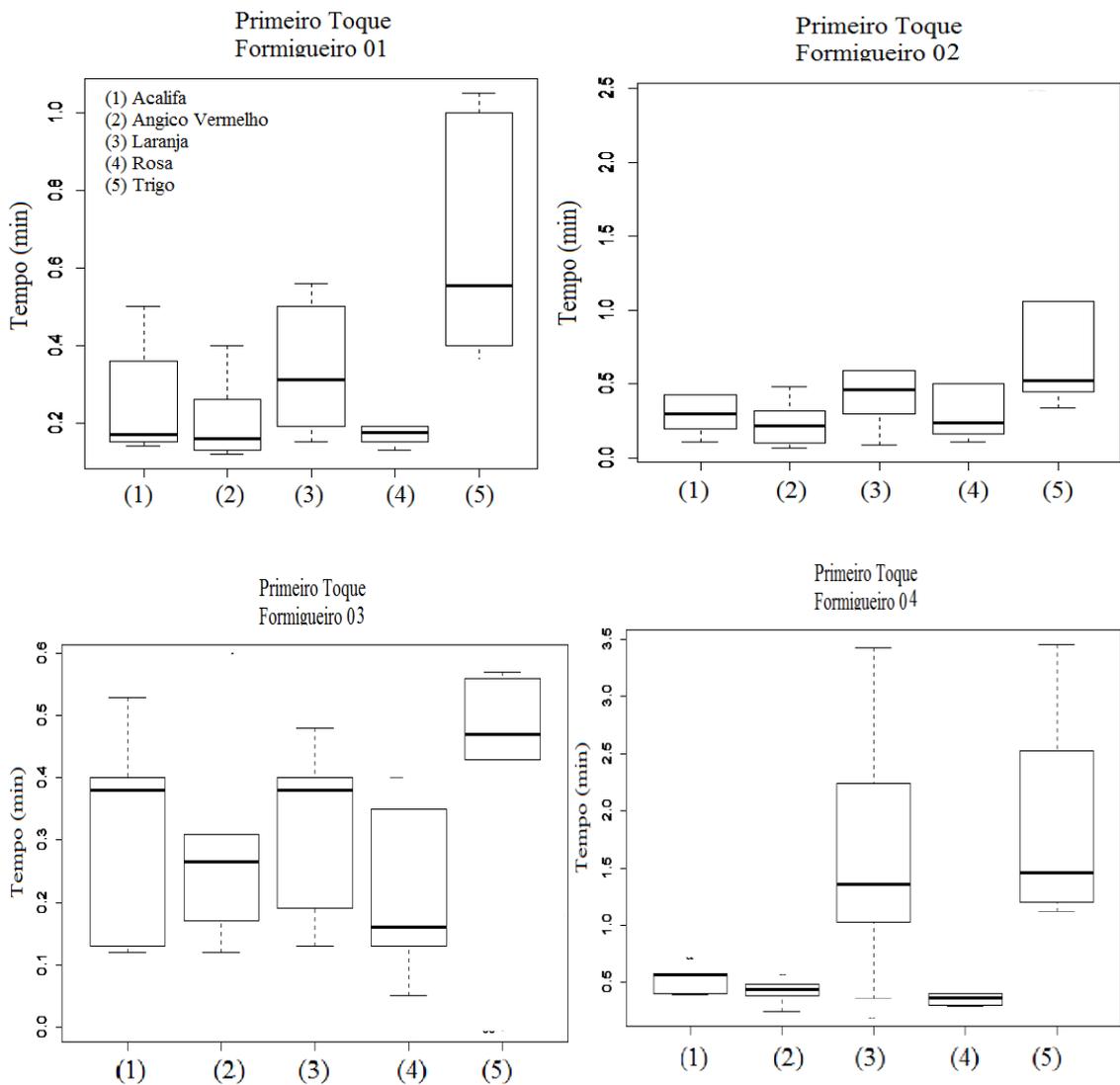


Figura 6. Tempo médio (minutos) para o primeiro toque de antenas de operárias de *Atta laevigata* com seus respectivos EP, Teste Tukey 5% de probabilidade.

O primeiro toque das formigas na isca aconteceu em menos de meio minuto para todos os quatro formigueiros testados. O tempo de carregamento é importante, pois em condições de campo, maior rapidez no carregamento de iscas implica em menor exposição das mesmas às condições climáticas adversas, roedores, aves, insetos benéficos e outros animais presentes na área, podendo aumentar a eficiência de controle e evitar possíveis intoxicações de animais silvestres (LIMA et al., 2003).

As operárias tocaram intensamente com suas antenas sobre os grânulos de iscas de angico-vermelho, apresentando menor tempo para contato e início de carregamento das iscas. De acordo com Hubbell e Wiemer (1983) (*apud* LIMA et al., 2003), as formigas cortadeiras percebem diferenças na qualidade das folhas, e propriedades químicas e físicas estariam associadas na preferência dessas formigas.

Quanto ao carregamento não se detectou diferença significativa a 5% de probabilidade entre as médias do tempo para o primeiro contato das operárias nas iscas (Figura 7). Da mesma forma, não houve diferença significativa a 5% de probabilidade para o carregamento total (Figura 8).

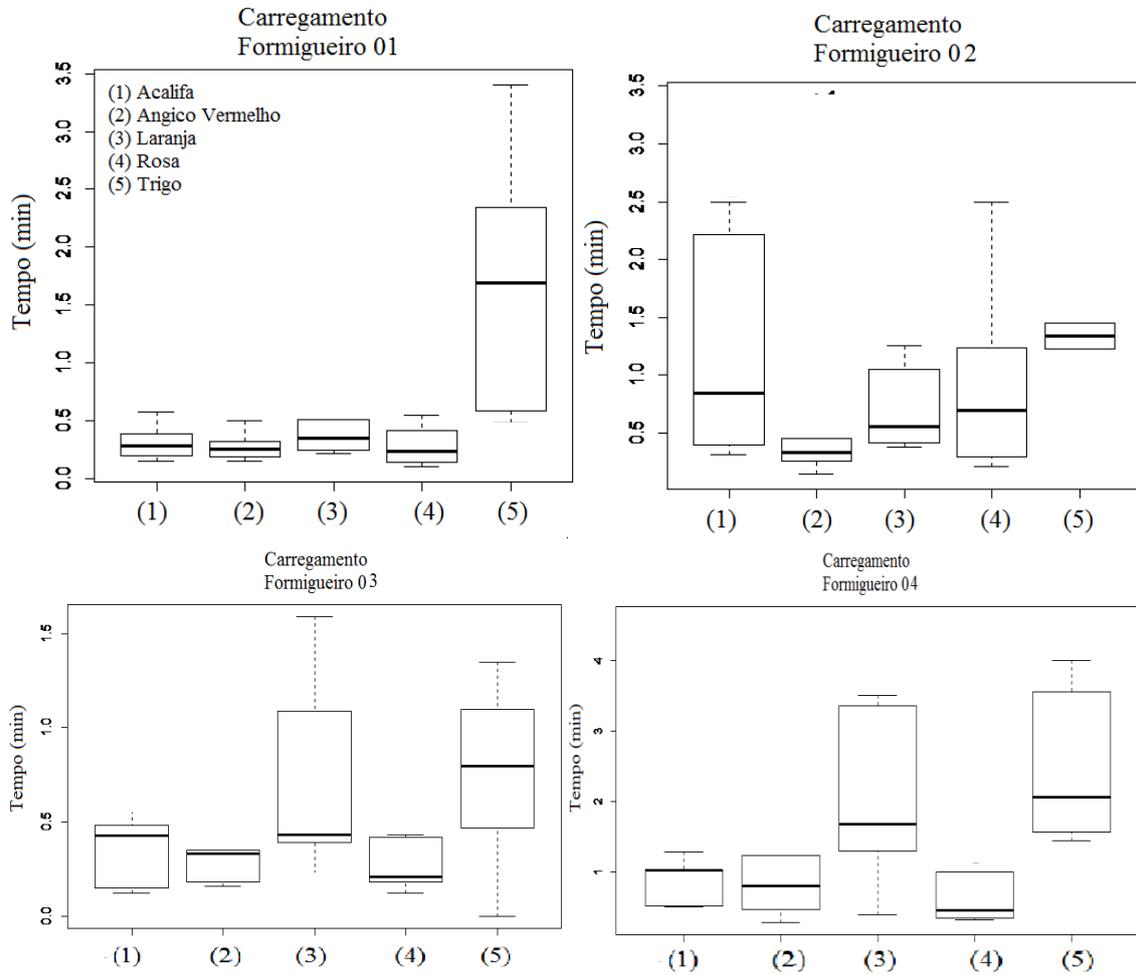


Figura 7. Tempo médio (minutos) para o início do carregamento das iscas artesanais pelas operárias de *A. laevigata* após primeiro toque, com os respectivos valores de EP.

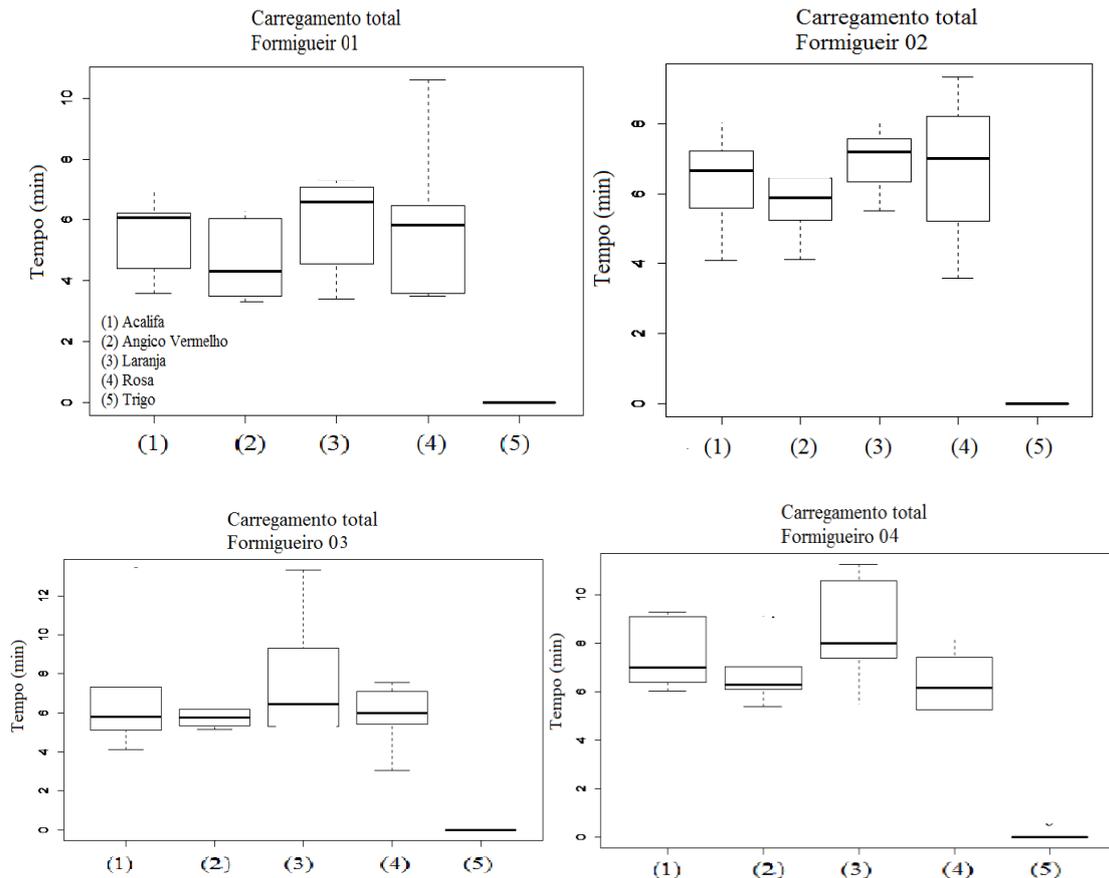


Figura 8. Tempo médio (minutos) para o carregamento total das iscas artesanais pelas operárias de *A. laevigata*, com os respectivos valores de EP. Não houve diferença significativa a 5% de significância.

Lopez e Orduz (2003) também verificaram aceitação e carregamento de iscas formuladas com *M. anisopliae*, *Trichoderma viride* e com a combinação dos dois fungos, por operárias de *A. cephalotes*, em colônias de laboratório. Specht et al. (1994), testando isca formulada com esporos de *B. bassiana* verificaram carregamento para *Acromyrmex crassispinus* e *Acromyrmex striatus*, porém não verificando tal comportamento para *Acromyrmex heyeri*.

De acordo com Delabie et al. (2000), diversos parâmetros devem ser considerados para confecção das iscas como pode ser visto na confecção das iscas, tais como a aparência, o cheiro, a consistência, a cor, a resistência à umidade, o sinergismo com os adjuvantes de fabricação ou o inseticida, o tamanho dos grânulos, sua textura, etc. Estas são as características mais importantes na formulação de iscas para o controle de formigas cortadeiras. As iscas produzidas em laboratório apresentaram boas características qualitativas (cor, textura, consistência) como sugere Delabie et al (2000).

Para Forti et al. (1998, 2003), Nagamoto et al. (2004), e Verza et al. (2006) o incremento do transporte de iscas e a redução no tempo de permanência destas no

campo são importantes pois reduzem as chances de contato do princípio ativo com espécies não-alvo e a perda dessas iscas no campo.

6. CONCLUSÃO

- Isolados dos fungos entomopatogênicos *Aspergillus flavus*, e *Trichoderma harzianum*, nas concentrações de 1×10^7 e 1×10^8 conídios/mL foram patogênicos a operarias de *Atta laevigata* em laboratório.

- Todas as iscas formicidas testadas apresentam igual atratividade a *Atta laevigata*, apresentando o angico-vermelho menor tempo para contato e início de carregamento das iscas.

7. REFERÊNCIAS

ALÍPIO, A. S. **Controle de formigas cortadeiras: normas técnicas da Pains Florestal.** [S.l.: s.n.], 1989. 8 p.

ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A. Controle biológico da cigarrinha-da-raiz da canade- açúcar com o fungo *Metarhizium anisopliae*. **Boletim Técnico do Instituto Biológico**, São Paulo, 19pp., 2006.

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos.** 2. Ed. Piracicaba: Fealq, 1998. 1163p.

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

AMANTE, E. A formiga saúva *Atta capiguara*, praga das pastagens. **O Biológico**, Campinas, v. 33, p. 113-120, 1967.

AMANTE, E. **Influência de alguns fatores microclimáticos sobre a formiga saúva *Atta laevigata* (F. Smith, 1858), *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908, *Atta bisphaerica* Forel, 1908 e *Atta capiguara* Gonçalves, 1944 (Hymenoptera, Formicidae), em formigueiros localizados no estado de São Paulo.** 1972. 175f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de Sao Paulo, Piracicaba, 1972.

ARAÚJO, M. S.; DELLA LUCIA, T. M. C.; SOUZA, D. J. Estratégias Alternativas de Controle. **Bahia Agrícola**, Salvador, v.6, n. 1, p.71-73, 2003.

ARAÚJO, G. D. F. T. **Incremento da eficiência de iscas destinadas ao controle da formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) mediante o uso de extrato de glândula de veneno e farinha foliar de gergelim.** 2011. Dissertação (Mestre Em Produção Vegetal) Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, 2011.

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

BUENO, F.C. **Seleção de ingredientes ativos para o desenvolvimento de iscas tóxicas para o controle de formigas-cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae).** 2013, 74 f. Tese - (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2013.

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

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

CASTILHO, A. M. C.; FRAGA, M. E.; AGUIAR-MENEZES, E. L.; ROSA, C. A. R. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* patogênicos a soldados de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa* em condições de laboratório. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 6, p. 1243-1249, 2010.

COMISSÃO de Revisão dos Poluentes Orgânicos Persistentes. Perfluorooctane sulfonate: risk profile. In: ENCONTRO DA COMISSÃO DE REVISÃO DOS POLUENTES ORGÂNICOS PERSISTENTES, n. 2., 2006, Geneva. UNEP/POPS/POPRC.2/17/Add.5. Disponível em: <<http://chm.pops.int/Convention/POPsReviewCommittee/Reviewedchemicals/tabid/781/Default.aspx>> Acesso em: 11 dez. 2015.

CONFERÊNCIA das Partes. COP4-SC4/17. In: ENCONTRO DA CONFERÊNCIA DAS PARTES PARA A CONVENÇÃO DE ESTOCOLMO SOBRE POLUENTES ORGÂNICOS PERSISTENTES, n. 4., 2009, Geneva. Disponível em: <<http://chm.pops.int/Convention/COP/COPDecisions/tabid/208/Default.aspx>>. Acesso em: 11 dez. 2016.

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

CURRIE, C. R. A community of ants, fungi, and bacteria: a multilateral approach to studying symbiosis. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v. 55, p. 357-380, 2001.

DELABIE, J. H. C.; DELLA LUCIA, T. M. C.; PASTRE, L. Protocolo de Experimentação para Avaliar a Atratividade de Novas Formulações de Iscas Granuladas Utilizadas no Controle das Formigas Cortadeiras *Acromyrmex* spp. e *Atta* spp. (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini) no Campo. **Anais Sociedade Entomológica do Brasil**, 29 (4), 2000.

DELLA LUCIA, T, M. C. **As Formigas Cortadeiras**. Viçosa MG. : UFV 1993. 262p.

DIEHL-FLEIG, E.; VALIM-LABRES, M. E. Fungi isolated from leaf-cutting ants *Atta sexdens piriventris* and *Acromyrmex heyeri*(Hymenoptera-Formicidae): *Mucor* spp. effects on *Beauveria bassiana* entomopathogen. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v. 45, p. 142-144, 1993.

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

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical. Levantamento detalhado dos solos do Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das

Almas, Bahia. Rio de Janeiro, 1993. 126p. (EMBRAPA.CNPMPF. Boletim de Pesquisa, 7)

FORTI, L. C. et al. Dispersal of the delayed action insecticide sulfluramid in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera, Formicidae). **Sociobiology**, Chico, v. 50, n. 3, p. 1-15, 2007.

FORTI, L. C.; NAGAMOTO, N. S.; PRETTO, D. R. Controle de formigas cortadeiras com isca granulada. In: SIMPÓSIO SOBRE FORMIGAS CORTADEIRAS DOS PAÍSES DO MERCOSUL, 1998, Piracicaba. **Anais**. Piracicaba: FEALQ, 1998, p. 113-132.

FOWLER, H. G.; STILES, E. W. Conservative resource management by leaf-cutting ants? The role of foraging territories and trails and environmental patchiness. **Sociobiology**, Chico, v. 5, p. 24-41, 1980.

GONÇALVES, C. R. Distribuição, biologia e ecologia das saúvas. **Divulg. Agrôn.**, Rio de Janeiro 1: 2-10, 1960

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

HÖLLDOBLER, B.; & E.O. Wilson. 1990. **The ants**. Cambridge, Harvard University Press, 732p.

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

HUMBER, R. A. Entomopathogenic Fungal Identification. **Entomological Society of America**. Las Vegas, Nevada, 1998

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

JUSTI JUNIOR, J.; IMENES, S.L.; BERGMANN, E.C.; CAMPOS-FARINHA, A.E.C.; ZORZENON, F.J. Formigas Cortadeiras. **Boletim técnico do Instituto Biológico**, São Paulo, n.4, 1996.

LARANJEIRO, A. J.; ZANUNCIO, J. C. Avaliação da isca à base de sulfluramida no controle de *Atta sexdens rubropilosa* pelo processo de dosagem única de aplicação. **Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais**, Piracicaba, n. 48-49, p. 144-152, 1995.

LIMA, C. A.; DELLA LUCIA, T. M. C; GUEDES, R. N. C.; Veiga, C. E. Desenvolvimento de iscas granuladas com atraentes alternativos para *Atta bisphaerica* Forel (Hymenoptera: Formicidae) e sua aceitação pelas operárias. **Neotrop. entomol**, v. 32, n. 3, p. 497-501, 2003.

LUEDERWALDT, H. Observações biológicas sôbre formigas brasileiras, especialmente do Estado de São Paulo. **Revista Museu Paulista**. 14: 185-304, 1926.

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

LOUREIRO, E. S.; MONTEIRO, A. C. Patogenicidade de isolados de três fungos entomopatogênicos a soldados de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758)(Hymenoptera: Formicidae). **Revista Árvore**, v. 29, n. 4, p. 553-561, 2005.

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

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

MICHEL, K.; CROMME, N.; GLATZLE, A.; SCHULTZE-KRAFT, R. Biological control of leaf-cutting ants using forage grasses: nest characteristics and fungus growth. **Journal Agronomy and Crop Science**, Berlin, v. 187, p. 259-267, 2001.

MOREIRA, A.A.; FORTI, L.C.; BOARETTO, M.A.C.; ANDRADE, A.P.P.; LOPES, J.F.S.; RAMOS, V.M. External and internal structure of *Atta bisphaerica* Forel (Hymenoptera, Formicidae) nests. **Journal of Applied Entomology**, v.128, n.1, p.200-203, 2004.

MUELLER, U. G. Ant versus fungus versus mutualism: Ant-cultivar conflict and the deconstruction of the attine ant-fungus symbiosis. **American Naturalist**, Chicago, v. 160. p. 67-98, 2002.

NAGAMOTO, N. S. FORTI, L. C.; ANDRADE, A. P. P.; BOARETTO, M. A. C.; WILCKEN, C. F. Method for the evaluation of insecticidal activity over time in *Atta sexdens rubropilosa* workers (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, Chico, v. 44, n. 2, p. 413-432, 2004.

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

NAKANO, O. Novos produtos visando o controle das saúvas. In: CURSO DE ATUALIZAÇÃO NO CONTROLE DE FORMIGAS CORTADEIRAS, 3., 1994, Botucatu. **Anais...** Botucatu: IPEF, 1994, p. 24-27.

OECD. Cooperation on existing chemicals hazard assessment of perfluorooctane sulfonate (pfos) and its salts. IN: Environment Directorate, Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology, 2002, Paris. ENV/JM/RD(2002)17/FINAL. Disponível em: <<http://www.oecd.org/dataoecd/23/18/2382880.pdf>> Acesso em 02 dez. 2015

OI, D.H.; PEREIRA, R.M.; STIMAC, J.L.; WOOD, L.A. Field applications of *Beauveria bassiana* for control of the red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae). **Biological and Microbial Control.**, v.87, n.03, p.623-630, 1994.

OLIVEIRA, M.A.; ARAÚJO, M.S.; MARINHO, C.G.S.; RIBEIRO, M.M.R.; DELLA LUCIA, T.M.C. Manejo de formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T.M.C. (Ed.). **Formigas-cortadeiras: da biologia ao manejo.** Viçosa: UFV, 2011. p. 400-419.

OTTATI-DE-LIMA, E. L.; BATISTA FILHO, A. **Produção de *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK. e *Beauveria bassiana* (BALS.) VUILL. em diferentes substratos e efeito da radiação ultravioleta e da temperatura sobre estruturas infectivas desses entomopatógenos.** 2007.

PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; VILLA NOVA, N. A. Determinação de temperatura e umidade relativa no interior de colônias de insetos sociais para estudos bioecológicos. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.3, p.20-33, 1974.

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

QUIROZ, L. J. V. Factores de mortalidad natural de reinas de *Atta mexicana* (Fr. Smith) en el Estado de Morelos, Mexico. In: Congresso Latinoamericano de Entomologia, 6, Mérida, Yucatán. Memórias. Mérida: **Sociedad Mexicana de Entomologia**, 56p., 1996.

REIS FILHO, W. et al. **Reconhecimento dos danos causados por formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* em plantios iniciais de *Pinus taeda* no sul do Brasil.** Colombo: Embrapa Florestas, 2007. 4 p. (Comunicado Técnico 189).

REZENDE, J. L. P.; PEREIRA, A. R.; OLIVEIRA, A. D. Espaçamento ótimo para a produção de madeira. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 7, n. 1, p. 30-43, jan./jun. 1983.

RIFAI, M.A. A revision of the genus *Trichoderma*. **Mycological Papers**, Wallingford, v.1 16, p.1-56, 1969.

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

RODRIGUES, A. **Ocorrência de fungos filamentosos em ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) submetidos a tratamentos com iscas tóxicas.** 2004. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2004.

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

RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F.C.; BACCI, M.; HEBLING, M.J.A.; BUENO, O.C.; PFENNING, L. H. Variability of non-mutualistic filamentous fungi associated with *Atta sexdens rubropilosa* nests. **Folia Microbiologica**, v.50, p. 421-425, 2005.

SANTOS, A. V.; OLIVEIRA, B. L.; SAMUELS, R. I. Selection of entomopathogenic fungi for use in combination with sub-lethal doses of imidacloprid: perspectives for the control of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 163, p. 233-240, 2007.

SILVA, E. A. R. **Seleção de isolados de fungos entomopatogênicos para o controle de *Leptopharsa heveae* Drake & Poor (Hemíptera: Heteroptera, Tingidae)**. 2007. 60 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

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

VILELA, E.F. Status of leaf-cutting control in forest plantations in Brazil. In: LOFGREN, C.S., VANDERMEER, R.K. (Eds) **Fire ants and ants: leaf-cutting ants: biology and management**. Boulder: Westview Press, 1986. P.399-408.

WORLD WIDE FUND - WWF. Disponível em <<http://www.wwf.org.br/>> Acessado em 2 de janeiro de 2016.

ZANETTI, R.; CARVALHO, G. A.; SANTOS, A.; SOUZA-SILVA, A.; GODOY M. S. Manejo integrado de formigas cortadeiras. **Lavras: UFLA**, p. 16, 2002.

ZANETTI R.; ZANUNCIO, J.C.; SOUZA-SILVA, A.; ABREU L.G. de.. Eficiência de isca formicida aplicada sobre o monte de terra solta de ninho de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 3, p. 407-410, 2003.