



**Universidade Federal do Tocantins**  
***Campus* Universitário de Gurupi**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais e Ambientais**

DANIELLA GONÇALVES DA SILVA

**EFEITO DO FUNGO *Trichoderma harzianum* E DO ZINCO EM  
COLÔNIAS DE *Atta sexdens***

**GURUPI- TO**  
**2016**



**Universidade Federal do Tocantins  
Campus Universitário de Gurupi  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais e Ambientais**

**DANIELLA GONÇALVES DA SILVA**

**EFEITO DO FUNGO *Trichoderma harzianum* E DO ZINCO EM  
COLÔNIAS DE *Atta sexdens***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Florestais e Ambientais da Universidade Federal do Tocantins como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Florestais e Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Renato de Almeida Sarmiento

Co-orientador: Prof. Dr. Danival José de Souza

**GURUPI – TO  
2016**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Biblioteca da Universidade Federal do Tocantins**  
**Campus Universitário de Gurupi**

---

Gonçalves da Silva, Daniella.  
Título: Efeito do fungo *Trichoderma harzianum* e do zinco em colônias de *Atta sexdens* / Daniella Gonçalves da Silva. - Gurupi, 2016.  
xxf. (67 folhas)

Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Tocantins,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais e Ambientais, 2016.  
Linha de pesquisa: Manejo, silvicultura e tecnologia florestal.  
Orientador: Prof. Dr. Renato de Almeida Sarmento.

1. Encapsulados. 2. Sulfato de zinco. 3. Hemócitos. Da Silva  
Gonçalves, Daniella. Renato de Almeida Sarmento II. Universidade  
Federal do Tocantins. III Título

**CDD 635**

---

**Bibliotecária: Emanuele Santos**  
**CRB-2 / 1309**

**TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.**

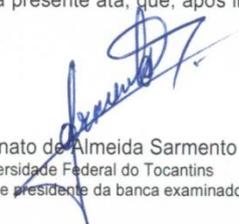


**Defesa nº 024/2016**

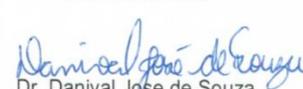
**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE DANIELLA GONÇALVES DA SILVA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS E AMBIENTAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS.**

Aos 11 dias do mês de agosto do ano de 2016, às 14:00 horas, na sala 02, do edifício Parfor, do Campus de Gurupi, da Universidade Federal do Tocantins - UFT, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Orientador Dr. RENATO DE ALMEIDA SARMENTO da Universidade Federal do Tocantins, Prof Dr MARÇAL PEDRO NETO da Universidade Federal do Tocantins e Prof Dr DANIVAL JOSE DE SOUZA da Universidade Federal do Tocantins, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de DANIELLA GONÇALVES DA SILVA, intitulada "**Efeito do fungo *Trichoderma harzianum* Rifai e do zinco em colônias de *Atta sexdens***". Após a exposição, o(a) discente foi arguido(a) oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo parecer favorável à aprovação, com as devidas ressalvas e correções apontadas pela banca examinadora, habilitando-o(a) ao título de Mestre em Ciências Florestais e Ambientais.

Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

  
Dr. Renato de Almeida Sarmento  
Universidade Federal do Tocantins  
Orientador e presidente da banca examinadora

  
Dr. Marçal Pedro Neto  
Universidade Federal do Tocantins  
Primeiro examinador

  
Dr. Danival José de Souza  
Universidade Federal do Tocantins  
Segundo examinador

Gurupi, 11 de agosto de 2016.

  
Dr. Marcos Giongo  
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Ciências Florestais e Ambientais

## DEDICATÓRIA E AGRADECIMENTO

A Cristo, meu Senhor e Salvador. “E eu estarei sempre com vocês, até o fim dos tempos.” Mateus: 28: 20.

Aos meus amados pais Ilton Gonçalves da Silva e Olinda Pereira da Silva Gonçalves pelo apoio, dedicação, confiança e amor constante.

A minha irmã Lôany Gonçalves da Silva que sempre esteve ao meu lado e acreditou na minha capacidade, dando muita força para conquistar os meus objetivos.

Aos amigos (as) pelo os momentos de alegria, compreensão e apoio.

Ao meu orientador Dr. Renato de Almeida Sarmiento, pela orientação, o apoio e incentivo, por tornar possível a realização desse trabalho, pela dedicação durante o tempo de convivência, pela amizade e pelo exemplo de profissionalismo e ética.

Ao meu co-orientador Dr. Danival José de Souza, por quem tenho grande respeito e admiração. Agradeço pela imensa ajuda nos ensinamentos, por ter se dedicado na intensa tarefa de me ajudar em todo momento da dissertação.

Aos colegas de pesquisa do Laboratório de Controle Microbiano de Insetos e de Ecologia Funcional Aplicada: Aldemir Lucena, Ms. Mariela Otoni, Ms. Aline Silvestre Pereira, Dr. Marçal Pedro Neto, Ms. Carlos Henrique e Cléia Almeida.

Aos colegas do Casadinho – UFT, que muito colaboraram com os momentos de descontração, fornecendo palavras amigas e motivadoras. Em especial a Dona Fátima e Dona Tereza da empresa Fênix.

À Universidade Federal do Tocantins pela minha formação acadêmica e pela oportunidade de realização do curso de Mestrado e a todos os professores, pelos ensinamentos.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Florestais e Ambientais e ao CNPq, pela oportunidade e suporte financeiro, possibilitando a realização deste estudo.

Meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

As formigas-cortadeiras do gênero *Atta* são apontadas como os principais herbívoros da região Neotropical, sendo capazes de causar grandes danos à agricultura, às pastagens e à silvicultura em especial. No controle químico dessa praga, a tática mais usual e efetiva tem sido o uso de iscas granuladas tóxicas. Todavia, têm-se procurado métodos alternativos para o controle de cortadeiras, sobretudo por pressão de agências certificadoras de manejo florestal como o FSC (Forest Standarship Council). Recentemente, isolados de *Trichoderma* spp. começaram a ser testados no controle de formigas-cortadeiras em razão das suas propriedades antagonísticas ao fungo simbiote por elas cultivados. Além disso, destacam-se substâncias que têm o potencial de inibir a resposta imune inata dos insetos. Por exemplo, alguns elementos químicos como, cádmio e zinco. O presente trabalho objetivou o preparo de uma formulação com iscas granuladas e encapsuladas do fungo *Trichoderma harzianum*. Para encapsulação do fungo, utilizou-se uma mistura de alginato de sódio, farelo de trigo, suco concentrado de laranja e micélio triturado do antagonista. Esta mistura foi gotejada em solução (0,25 M) de  $\text{CaCl}_2$ , o que permitiu a formação de grânulos esféricos de diâmetro regular. Paralelamente testou-se iscas contendo sulfato de zinco  $\text{ZnSO}_4$  (0,25 g/L), produzidas a partir da mistura de alginato, farelo de trigo e suco concentrado de laranja. Após o fornecimento das iscas fez-se a contagem total de hemócitos das operárias a fim de verificar alterações da sua resposta imune. Não ocorreu declínio na quantidade de hemócitos. Apesar das iscas não terem promovido a morte das colônias, elas apresentaram boa aceitação pelas operárias e promoveram a redução do volume do fungo simbiote. O cloreto e o sulfato de zinco foram empregados nas concentrações de 0,15; 0,25; 0,5; 1,5; 2,5 e 5,0 g/L em placas de Petri em meio BDA para o teste de desenvolvimento dos fungos simbiote e antagonista, e os resultados mostraram inibição no crescimento nas doses máximas tanto em *Leucoagaricus gongylophorus* como em *Trichoderma harzianum*. As operárias foram imersas em soluções de sulfato de zinco com as mesmas concentrações daquelas empregadas no teste de inibição dos fungos. Após o tempo de 24 e 48 horas fez-se a contagem total de hemócitos e verificou-se um decréscimo dos mesmos em altas concentrações. Conclui-se que as iscas contendo *T. harzianum* e sulfato de zinco apresentaram boa aceitação por parte das colônias, elas não promoveram a morte das colônias, no entanto, reduziram o volume do fungo simbiote. Altas doses de cloreto e sulfato de zinco inibem o desenvolvimento do fungo antagonista e do fungo simbiote e elevadas concentrações zinco e o maior tempo de exposição das operárias ao mesmo afetam o seu sistema imune.

Palavras-chave: encapsulados; sulfato de zinco; hemócitos; sistema imune.

## ABSTRACT

The leaf-cutting ants of the genus *Atta* are cited as the main herbivores of the Neotropical region, being capable of causing major damage to agriculture, pasture and forestry in particular. In the chemical control of this plague, the most common and effective tactic has been the use of toxic granular baits. However, there have been alternative methods for control of cutting, especially by pressure certifying agencies forest management as the FSC (Forest Standarship Council). Recently, *Trichoderma spp.* They began to be tested in the control of leaf-cutting ants because of their antagonistic properties to the symbiotic fungus cultivated by them. Furthermore, they highlight substances that have the potential of inhibiting the innate immune response of the insects. For example, some chemical elements such as cadmium and zinc. This study aimed to the preparation of a formulation with granulated baits and encapsulated fungus *Trichoderma harzianum*. For encapsulation fungus, a mixture of sodium alginate was used wheat bran, concentrated orange juice and triturated antagonist mycelium. This mixture was dripped into solution (0,25 M)  $\text{CaCl}_2$ , which allowed the formation of spherical granules of regular diameter. Parallel tested for baits containing zinc sulfate  $\text{ZnSO}_4$  (0,25 g/L) produced from the mixture of alginate, wheat bran and concentrated orange juice. After the supply of baits made up the total count of hemocytes of the workers in order to verify changes in their immune response. There was no decline in the amount of hemocytes. Despite the baits have not promoted the death of the colonies, they had good acceptance by workers and promoted the reduction of the symbiont fungus volume. Chloride and zinc sulfate were used in concentrations of 0.15; 0.25; 0.5; 1.5; 2, 5 and 5; 0 g /L in Petri dishes on PDA medium for the development and test of antagonist symbiont fungi, and the results showed growth inhibition in both maximal doses *Leucoagaricus gongylophorus* as *Trichoderma harzianum*. The ants were dipped in zinc sulfate solutions with the same concentrations of those employed in the fungal inhibition assay. After time 24 and 48 hours we made the total hemocytes count and there was a decrease in high concentrations thereof. We conclude that the baits containing *T. harzianum* and zinc sulfate showed good acceptance by the colonies, they did not promote the death of the colonies, however, reduced the volume of the symbiont fungus. High doses of zinc chloride and sulfate inhibit the development of the antagonist fungus and symbiont fungus and high concentrations of zinc and the longer exposure time of workers at the same affect your immune system.

Keywords: encapsulated; zinc sulfate; hemocytes; Imune system.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
3.1	Desenvolvimento inicial das colônias de <i>Atta sexdens</i> .....	19
3.2	Isolamento do fungo <i>Trichoderma harzianum</i> .....	19
3.3	Produção do antagonista .....	19
3.4	Produção da formulação do tipo granulada .....	20
3.5	Teste de aceitação de iscas com <i>Trichoderma harzianum</i> .....	21
3.6	Isolamento de <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> .....	21
3.7	Avaliação dos efeitos do sulfato de zinco (ZnSO <sub>4</sub> ) e cloreto de zinco (ZnCl <sub>2</sub> ) no desenvolvimento in vitro do fungo simbiote e de um fungo antagonista .....	22
3.8	Produção da formulação do tipo granulada (GR) com sulfato de zinco .....	23
3.9	Teste de aceitação de iscas com sulfato de zinco e <i>Trichoderma harzianum</i> .....	24
3.10	Contagem total de hemócitos.....	24
3.11	Imersão de formigas em solução de sulfato de zinco .....	25
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
4.1	Teste de aceitação de iscas com <i>Trichoderma harzianum</i> .....	26
4.2	Avaliação dos efeitos do sulfato de zinco (ZnSO <sub>4</sub> ) e cloreto de zinco (ZnCl <sub>2</sub> ) no desenvolvimento in vitro do fungo simbiote e de um fungo antagonista .....	27
4.3	Teste de aceitação de iscas com sulfato de zinco e <i>Trichoderma harzianum</i> .....	32
4.4	Contagem total de hemócitos.....	34
4.5	Imersão de formigas em solução de sulfato de zinco .....	35
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>37</b>
5.1	Teste de aceitação de iscas com sulfato de zinco e <i>Trichoderma harzianum</i> .....	37
5.2	Contagem total de hemócitos.....	39
5.3	Avaliação dos efeitos do sulfato de zinco (ZnSO <sub>4</sub> ) e cloreto de zinco (ZnCl <sub>2</sub> ) no desenvolvimento in vitro do fungo simbiote e de um fungo antagonista .....	40
5.4	Imersão de formigas em solução de sulfato de zinco .....	42
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>46</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantidade média $\pm$ desvio padrão de iscas transportadas em cada tratamento (n = 4 colônias) e tempo médio (TM) em minutos para transporte do primeiro grânulo de isca.....	26
Tabela 2 – Média $\pm$ desvio padrão de mortalidade das operárias e rejeitos (lixo) (n= 4 colônias).....	27
Tabela 3 – Quantidade média $\pm$ desvio padrão de iscas transportadas em cada tratamento (n = 8 colônias) e tempo médio (TM) em minutos para transporte do primeiro grânulo de isca.....	32
Tabela 4 – Média $\pm$ desvio padrão de mortalidade das operárias e rejeitos (lixo) (n= 4 colônias).....	33

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fases de fundação do ninho de formigas-cortadeiras <i>Atta sexdens</i> .....	10
Figura 2 – Eficiência relativa do crescimento do fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> em diferentes concentrações de sulfato de zinco ( $ZnSO_4$ ) g/l e grupo controle.....	28
Figura 3 – Eficiência relativa do crescimento do fungo <i>Trichoderma harzianum</i> em diferentes concentrações de sulfato de zinco ( $ZnSO_4$ ) g/l e grupo controle.....	29
Figura 4 – Eficiência relativa do crescimento do fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> em diferentes concentrações de cloreto de zinco ( $ZnCl_2$ ) g/l e grupo controle.....	30
Figura 5 – Eficiência relativa do crescimento do fungo <i>Trichoderma harzianum</i> em diferentes concentrações de cloreto de zinco ( $ZnCl_2$ ) g/l.....	31
Figura 6 – Contagem total de hemócitos de operárias de <i>A.sexdens</i> após tratamento com diferentes tipos de iscas.....	34
Figura 7 – Contagem total de hemócitos após imersão de formigas em diferentes concentrações de sulfato de zinco em acondicionamento de vinte quatro horas e grupos controle.....	35
Figura 8 – Contagem total de hemócitos após imersão de formigas em diferentes concentrações de sulfato de zinco em acondicionamento de quarenta e oito horas e grupos controle.....	36

## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As formigas-cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae), representadas pelos gêneros *Atta* Fabricius (saúvas) e *Acromyrmex* Mayr (quenquéns) atuam como umas das pragas mais importantes para o setor florestal brasileiro. Conforme (ZANETTI; ZANUNCIO & SOUZA-SILVA, 2002), o ataque executado por essas formigas é de maneira intensa e constante, podendo ocorrer danos em qualquer fase do desenvolvimento da planta, ocasionados por cortes de folhas, brotos, ramos finos e flores, os quais são carregados para o interior de ninhos subterrâneos, no qual as formigas cultivam o seu fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* (Basidiomycota: Agaricales).

Alguns autores usam o termo simbiose para designar casos de mutualismo obrigatório. Porém, vamos aplicar o termo simbiose a qualquer tipo de relação entre seres vivos de espécies diferentes em que se verifica estreita associação entre os seres envolvidos. Nessa visão, relações como o parasitismo e o mutualismo são também consideradas exemplos de simbiose (BEGON; TOWNSEND & HARPER, 2007).

O mutualismo é do tipo obrigatório quando as formas de interdependência fisiológica que se estabelecem são de tal maneira intensas que a separação das espécies envolvidas acarreta, para elas, um sério desequilíbrio metabólico, podendo, inclusive, levá-las à morte (RICLEFS, 2003).

Mesmo que as formigas-cortadeiras sejam consideradas pragas de diversas espécies vegetais, estas podem trazer benefícios ao ambiente, desempenhando um importante papel a nível ecossistêmico (COUTINHO, 1984; GARRETSON *et al.*, 1998), pois, principalmente as formigas do gênero *Atta*, auxiliam no desenvolvimento do solo, promovendo a ciclagem de nutrientes, devido às lixeiras das colônias e a transferência de nutrientes para as camadas mais superficiais durante a construção e relocação dos ninhos, assim possuem impactos positivos sobre a estrutura química e física do solo (HAINES, 1975; HERZ *et al.*, 1998; FARJI-BRENER & GHERMANDI, 2008).

Todas as formigas cultivadoras de fungo pertencem à tribo Attini, um clado que, mais recentemente, passou a incluir gêneros de formigas com outros hábitos alimentares (WARD *et al.*, 2015). As formigas-cortadeiras constituem um subgrupo dentro das cultivadoras de fungo e se diferenciam das outras espécies pelo hábito de utilizar, principalmente, partes verdes de plantas no cultivo do fungo simbiote, enquanto as demais usam partes mortas de plantas e fezes de insetos e outros animais.

Nessa simbiose, o fungo produz enzimas despolimerases (BACCI *et al.*, 1995; SIQUEIRA *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2006a) capazes de degradar os polissacarídeos do material vegetal presentes no jardim de fungo. O início de adaptações que permitiram o desenvolvimento e manutenção desta relação deve-se a origem do hábito micófago pelas formigas, segundo a hipótese mais aceita atualmente. Pesquisas, análises filogenéticas e moleculares confirmaram que o hábito micófago teve origem há aproximadamente 50 milhões de anos atrás, na América do Sul (SCHULTZ; BRADY 2008).

Tanto o fungo quanto as formigas são favorecidos com a relação simbiótica: o fungo é usado na dieta das formigas, que em recompensa proveem substrato para o desenvolvimento do mesmo, proteção contra parasitas ou competidores e asseguram a sua reprodução ao ser transferido verticalmente pelas rainhas de seus ninhos de origem para os ninhos descendentes, isto é, as rainhas carregam em sua cavidade infra-bucal porções do fungo, do ninho de origem, durante o voo nupcial (WEBER, 1972; MUELLER, 2002).

*Leucoagaricus gongylophorus* produz estruturas específicas para a alimentação das larvas, chamadas de gongilídeos. Essas estruturas estão por todo o jardim de fungo e, observadas em microscópio, exibem as extremidades das hifas infladas, de forma arredondada e ocorre em grupamentos denominados de estáfilas, parte rica em gongilídeos. É o principal alimento das larvas, que, apesar de estarem em contato constante com o fungo, não são capazes de se alimentar sozinhas, sendo totalmente dependentes das operárias (BUENO *et al.*, 2008).

Entre as formigas da tribo Attini, apenas as espécies dos dois gêneros de formigas-cortadeiras, são caracterizadas pelo alto polimorfismo de sua casta operária, em especial o gênero *Atta*, apresentando diferenças no tamanho e na proporção anatômica. Este polimorfismo está associado com uma complexa divisão de trabalho dentro das colônias (WILSON, 1980).

Em *A. sexdens*, pode-se encontrar nitidamente duas castas permanentes: a casta reprodutiva (a rainha) e a casta de operárias. Pelo menos quatro subcastas de operárias são encontradas: 1) jardineiras: cuja largura da cápsula cefálica é de 0,8-1,0 mm, tem a função de cuidar do jardim de fungo, da prole e da rainha; 2) generalistas: a largura da cápsula cefálica é de 1,4 mm, executam diversas atividades, como degradação do material vegetal antes da incorporação no fungo, transporte de operárias, auxílio à prole durante a ecdise, cuidados com a rainha e rejeite de lixo; 3) forrageadoras e escavadoras: cuja largura da cápsula cefálica é de 2,0-2,2 mm. São as operárias que cortam e carregam o material vegetal e cavam as câmaras e canais do ninho; 4) soldados: a largura da cápsula cefálica é de 3,0 mm, exercem a função de proteger a colônia e podem ajudar no corte de plantas (WILSON, 1980).

A fundação de um novo formigueiro tem início com o voo nupcial, ocasião em que as fêmeas aladas saem do ninho de origem e são inseminadas em pleno ar por um ou mais machos, os quais morrem posteriormente (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990). A percentagem de sobrevivência das rainhas do gênero *Atta* nos primeiros 15 meses em seguida ao voo nupcial é de apenas 0,05%. Dentre os fatores responsáveis por essa elevada mortalidade, sobressaem a predação por tamanduás, aves, sapos, lagartos, tatus, besouros, inibição no crescimento do fungo, chuvas fortes que podem inundar a colônia e assim afogar a rainha, e o ataque de entomopatógenos ou antagonistas ao fungo simbiote e às rainhas (AUTUORI, 1950; FOWLER, 1992).

As operárias têm uma longevidade de 2 a 3 meses (AUTUORI, 1942; HÖLLDOBLER & WILSON, 1990). O tempo de vida médio das rainhas de *Atta* é de 8,5 anos (BOER *et al.*, 2009), podendo chegar a 20 anos, em condições de laboratório (AUTUORI, 1950; DELLA LUCIA, 2011). As formigas possuem metamorfose completa passando pelos estágios de ovo, larva, pupa e adulto. As fases de fundação do ninho de *Atta sexdens* estão resumidas na Figura 1.

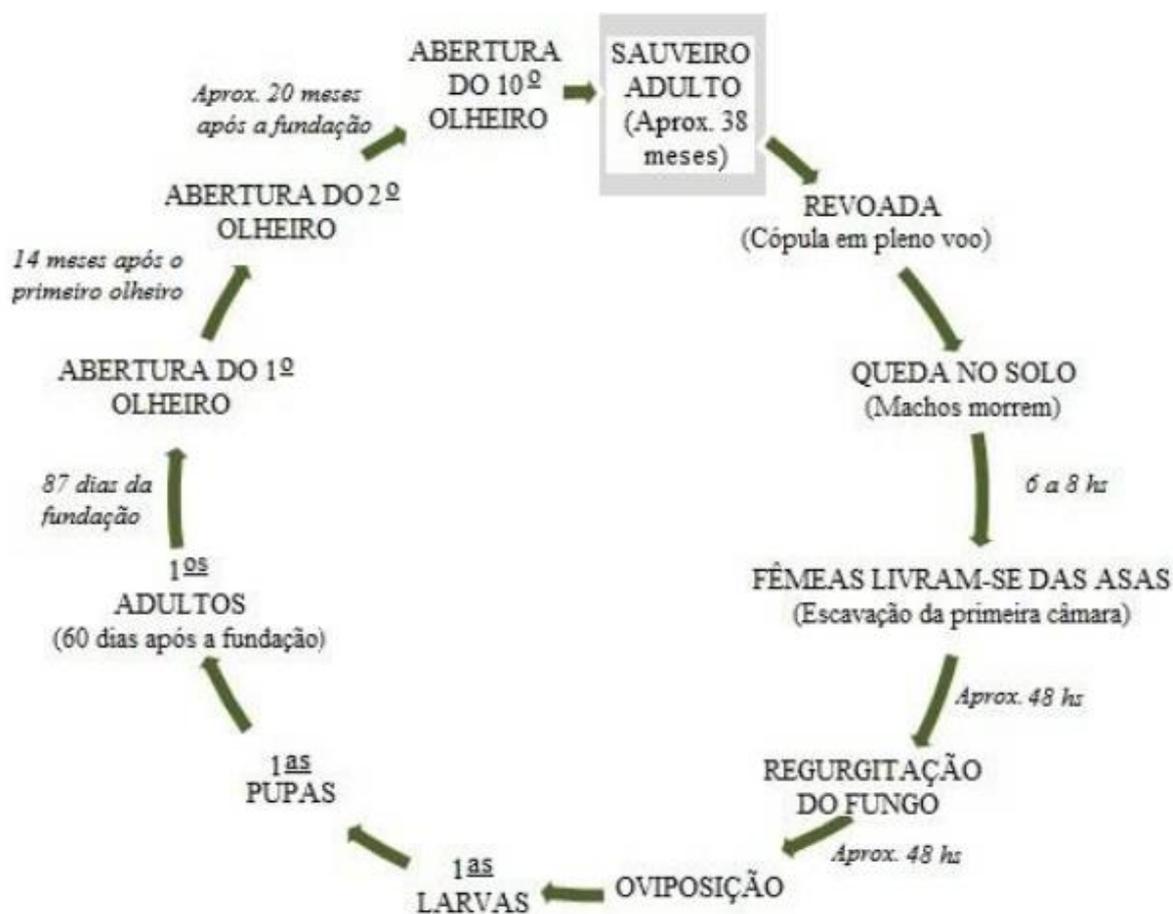


Figura 1 – Fases da fundação do ninho de formigas-cortadeiras *Atta sexdens* (adaptado de DELLA LUCIA, 2011).

Os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* apresentam características biológicas e comportamentais complexas que dificultam o seu controle, tais como arquitetura, tamanho e localização dos ninhos, sistema de proteção à rainha e estratégias de defesa. Nesse último ponto, por exemplo, quando um patógeno entra em contato com o inseto, o primeiro obstáculo encontrado é o exoesqueleto; em caso de ingestão do parasita, a membrana peritrófica que reveste o intestino médio servirá como barreira (KLOWDEN, 2007). Quando esses bloqueios são ultrapassados, as defesas imunológicas são ativadas. Dois tipos fundamentais de respostas podem ocorrer: as humorais e as celulares.

As primeiras são mediadas por moléculas, enquanto as últimas dizem respeito às mediadas por células da hemolinfa (STRAND, 2008). As principais respostas celulares que ocorrem são a fagocitose e a encapsulação, enquanto

respostas humorais incluem a ação de peptídeos e proteínas antimicrobianos (GILLESPIE; KANOST & TRENCZEK, 1997). Além do mais, a produção de substâncias antimicrobianas, pela glândula metapleural que fluem para a superfície corporal e são utilizadas para proteger as formigas e o jardim de fungo contra parasitas (HUGHES; EILENBERG & BOOMSMA, 2002).

A glândula metapleural é uma característica específica da família Formicidae e estão localizadas na porção póstero-lateral do mesossoma (BOT *et al.*, 2002). Por fim, uma estratégia comportamental bastante utilizada pelas formigas-cortadeiras é o “grooming”, ou lambedura, que corresponde à remoção de partículas da superfície do próprio corpo ou do corpo de um companheiro de ninho (MARINHO; DELLA LUCIA & PIKANÇO, 2006). Este comportamento é bastante importante na proteção do jardim de fungo contra eventuais parasitas ou competidores e na proteção das formigas contra patógenos (NORTH; JACKSON & HOWSE, 1997).

As formigas-cortadeiras são controladas principalmente pelo uso de iscas granuladas, que são espalhadas de maneira sistemática (de 2 a 4 kg ha<sup>-1</sup>) ou de maneira localizada, onde a isca é distribuída somente se os ninhos forem localizados. Essas iscas incorporam um substrato atrativo à base de polpa de laranja em mistura com um princípio ativo sintético, em pellets (BOARETTO & FORTI, 1997). Os inseticidas mais usados no controle de formigas são o fipronil, a deltametrina e a sulfluramida.

Esses inseticidas não são específicos e podem causar efeitos tóxicos indesejáveis para espécies não alvo. Além do mais, podem poluir o solo e as fontes de água (YING & KOOKANA, 2006). Não obstante, esses produtos além de serem caros, normalmente não são efetivos, pois levam ao breve extermínio da colônia de formigas ou a mudança de seu saueiro, e conduzem à seleção de populações cada vez mais resistentes, e causam graves danos ao ambiente e à saúde humana, por serem produtos altamente tóxicos (DIEHL-FLEIG; SILVA & PACHECO, 1988).

Há muitas técnicas de controle disponíveis para o manejo integrado de populações de formigas-cortadeiras. Uma dessas técnicas é o controle biológico. Esse método visa à redução da população de uma praga a um nível em que esta não cause prejuízos econômicos e ambientais, permitindo a manutenção dos organismos, ocasionando assim um equilíbrio entre os mesmos (DELLA LUCIA *et al.*, 1993).

Estudos têm sido conduzidos sobre a possibilidade de utilização de fungos para o controle de formigas-cortadeiras. Nos bioensaios em laboratório, fungos entomopatogênicos como *Beauveria*, *Metharhizium* e antagonistas do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* como *Trichoderma spp.* mostram-se eficientes (SILVA *et al.*, 2006b). Os fungos *Metharhizium anisopliae* (Metsch.) e *Trichoderma viride* (Pers.) foram efetivos no controle de colônias de *A. cephalotes* em condições de laboratório (LOPEZ & ORDUZ, 2003). Apesar de apresentar alguns resultados promissores em relação ao controle microbiano de formigas-cortadeiras em laboratório, esse método não é expressivo em experimentos de campo.

Além de pesquisas com emprego de fungos no combate à formigas-cortadeiras, existem algumas substâncias químicas que afetam negativamente o sistema imune de insetos, exercendo ação imunossupressora como azadiractina e a ciclosporina A (KAAYA; FLYG & BOMAN, 1987; AZAMBUJA & GARCIA, 1992; JAROSZ 1993).

Experimentos com o imunossupressor ciclosporina A demonstraram que esta substância foi capaz de diminuir a resistência de larvas do lepidoptero *Galleria mellonella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Pyralidae) a uma bactéria patogênica (FIOLKA, 2008). Ciclosporinas são peptídeos cíclicos, hidrofóbicos, produzidos por diversas espécies de fungos dos gêneros *Beauveria* (Bals.) Vuill., *Verticillium* Nees e *Tolytlocadium* W. Gams.

O nim indiano, que produz a substância azadiractina, tem sido apontado por sua eficácia no controle de muitos insetos (ISMAN, 2015). Os extratos hexânicos da pasta de nim foram tóxicos por ingestão às operárias de *Atta sexdens* (SANTOS; OLIVEIRA & SAMUELS, 2007) e *Acromyrmex rugosus* (BRUGGER *et al.*, 2008).

Operárias de colônias de *A. sexdens*, que receberam somente folhas de nim durante uma semana, teve maior taxa de encapsulação, uma medida da resposta imune inata. Esse aumento se manteve durante todo o período em que as colônias receberam folhas de nim (AMARAL; SEIDE & DELLA LUCIA, 2013).

Inseticidas podem agir no sistema imune dos insetos e seus efeitos são variáveis, aumentando a capacidade de desencadear uma resposta imune, ou diminuindo-a (DESNEUX; DECOURTYE & DELPUECH, 2007).

Essa variação da resposta imune dos insetos ilustra a sua complexidade e a necessidade de maiores estudos para compreendê-la. Doses subletais de imidacloprida aumentaram a susceptibilidade de operárias de *A. sexdens* ao fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin (SANTOS; OLIVEIRA; SAMUELS, 2007).

Como o sistema imune é regulado por múltiplos fatores, ele pode ser inibido de várias formas. Alguns elementos químicos podem interferir na resposta imune de insetos. Por exemplo, os metais pesados podem ter efeitos variáveis nos sistemas imunitários de animais (LAWRENCE & MCCABE, 2002). Doses baixas de alguns metais pesados, tais como Cd, Hg, Pb e Zn podem melhorar a função do sistema imune, enquanto que doses mais elevadas são supressivas (CABASSI, 2007).

## 2 INTRODUÇÃO

As saúvas, formigas-cortadeiras do gênero *Atta* (Hymenoptera: Formicidae), cortam fragmentos de vegetais e levam este material até as câmaras do fungo que servirão de substrato para o crescimento do mesmo (LIMA; DELLA LUCIA & OZORIO, 2002). O efeito desse desfolhamento ocasionado por *Atta sexdens* foi avaliado em *Eucalyptus grandis* (3 anos de idade) onde árvores com 100% da copa destruída deixaram de produzir cerca de 40% da madeira que deveria produzir durante o ano seguinte (De GASPERI, 1975; MAYHE-NUNES & DIEHL-FLEIG, 1994).

A quantidade de folhas cortadas por saúvas pode variar entre 12 e 17% da produção de folhas em florestas tropicais naturais. Com base na quantidade de folhas cortadas, já se deduziu que um sauveiro adulto pode matar cerca de 5% das árvores em cultura de *Eucalyptus urophylla* (ZANETTI; ZANUNCIO & SOUZA-SILVA, 2002).

Densidades acima de 30 formigueiros/ha de *Atta laevigata* podem reduzir a produção de madeira/ha em mais de 50% em plantios de *Pinus caribaea* com menos de 10 anos de idade (HERNÁNDEZ; JAFFÉ, 1995). Densidades acima de 80 sauveiros/ha, com área média de 2,76 m<sup>2</sup> de terra solta, podem reduzir em mais de 50% a produção de madeira de espécies de *Eucalyptus* (ZANETTI, 1998; ZANETTI *et al.*, 2003).

Essas formigas cultivam em câmaras subterrâneas o seu fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* (Basidiomycota: Agaricales) (CHAPELA *et al.*, 1994). As formigas cortam o substrato vegetal e levam para o ninho, onde cultivam o fungo, que degrada os polissacarídeos foliares e os reverte em nutrientes solúveis e assimiláveis. *L. gongylophorus* transforma esse material vegetal em glicogênio que é armazenado em estruturas de reservas denominadas gongilídeos (BACCI *et al.*, 1995; SIQUEIRA *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2006a). Gongilídeos são hifas especiais, com extremidades intumescidas e agrupadas em cachos (chamados estáfilas) e que armazenam carboidratos, provavelmente utilizados como fonte de energia dentro do ninho (BELT, 1984).

O controle mais empregado no combate de formigas-cortadeiras são as iscas compostas de atrativos de alimentação e formicidas químicos. A aplicação de iscas no combate as formigas-cortadeiras é considerada a técnica mais prática, eficiente e econômica entre as usadas atualmente. Ela pode ser usada na fase de preparação do terreno, de monitoramento, contudo, sua constituição á base de certos princípios formicidas podem contaminar a água, alimentos e animais silvestres, inclusive inimigos naturais das formigas-cortadeiras (ZANETTI *et al.*, 2003).

Tem sido executados estudos de controle biológico dessas formigas, sejam fungos (DIEHL-FLEIG & VALIM-LABRES, 1993; FOLGARAIT *et al.* 2011). Por exemplo, *Fusarium solani*, *Trichoderma harzianum* e *Syncephalastrum racemosum* são fungos considerados oportunistas dos ninhos (PAGNOCCA; MASIULIONIS & RODRIGUES, 2012), que possivelmente podem ocasionar um impacto negativo nas colônias, bactérias como *Bacillus thuringiensis* (PINTO *et al.*, 2003) ou parasitoides como *Neodohrniphora spp* (BRAGANCA *et al.*,1998).

Dentre os diversos benefícios oferecidos por tais técnicas em comparação ao controle químico, podemos indicar: eles são menos tóxicos; afetam geralmente apenas a espécie-alvo, em contraste com substâncias de amplo-espectro que podem prejudicar pássaros e mamíferos, por exemplo, eles são efetivos em pequenas quantidades e, normalmente, se decompõe rapidamente, resultando em menor exposição.

Dos fungos com potencial de antagonismo, o *Trichoderma* é um dos mais pesquisados, é um microrganismo encontrado naturalmente no solo, e participa da decomposição e mineralização dos resíduos vegetais e auxilia na disponibilização de nutrientes para as plantas (MENEZES *et al.*, 2010). A característica morfológica do fungo *Trichoderma spp.* é a presença de micélio, inicialmente de coloração branca e de crescimento rápido, com o desenvolvimento torna-se cotonoso com tufo verdes (DOMSH; GAMS; ANDERSON, 1980).

Em estudos (RODRIGUES *et al.* 2005) determinaram que a maioria dos fungos encontrados nos jardins de *A. sexdens rubropilosa* e de formigas do gênero *Acromyrmex*, pertence a gêneros comumente encontrados no solo, no qual *Trichoderma harzianum*, foi isolado de ninhos de campo, com elevada frequência em torno de 38%.

Algumas espécies de *Trichoderma* são consideradas parasitas necrotróficos, ou seja, aqueles que matam o hospedeiro e depois digerem a biomassa remanescente (ORTIZ; ORDUZ, 2000; REYNOLDS; CURRIE, 2004; HAIFIG, 2014).

Esse fungo produz compostos com vasta atividade antimicrobiana, que impedem a colonização por outros microrganismos. Uma vez em contato, *Trichoderma spp.* ataca o fungo antagonizado podendo se enrolar em torno de suas hifas, e através da formação de apressórios e, portanto, da produção de diferentes enzimas de degradação de parede celular e de antibióticos, penetra no interior das hifas por meio da combinação da ação desses compostos, resultando no micopredatismo e consequente dissolução das paredes e do conteúdo celular, os quais são absorvidos pelo fungo (CHET; INBAR; HADAR, 1997)

Os modelos de aplicação de fungos entomopatogênicos e antagonistas em colônias de formigas-cortadeiras, sob condições experimentais, têm sido através do oferecimento do patógeno sozinho ou em iscas de polpa cítrica (JACCOUD; HUGHES; JACKSON 1999), em iscas formuladas à base de farelo de trigo e com suco de laranja como atrativo (LOPEZ; ORDUZ, 2003).

Apesar dos bons resultados obtidos em condições experimentais, contudo, existem fatores difíceis de serem controlados para o desenvolvimento da aplicação de um entomopatógeno no campo como: temperatura, umidade, chuva, radiação ultravioleta e tipo de solo. A criação de formulações é fundamental para que se tenham bons resultados. Formulação refere-se à mistura do ingrediente ativo, no caso o propágulo vivo do fungo, com adjuvantes que visem à estabilização do agente biológico e a sua proteção contra fatores ambientais adversos (UV, baixa umidade, temperaturas elevadas) aumentando sua resistência no ambiente (MICHEREFFF FILHO *et al.*, 2009). Assim, no desenvolvimento de uma isca micoinseticida para formigas-cortadeiras, é preciso que a isca seja muito atrativa, e os esporos sejam preservados da ação ultravioleta e da umidade.

As diversas formas de defesa das cortadeiras também dificultam a utilização de fungos como agentes biológicos de controle. Em formigas cultivadoras de fungo, a retirada de contaminantes pelas operárias pode ocorrer quando esporos de outros fungos são deslocados para o ninho juntamente com o material vegetal (QUINLAN; CHERRETT, 1977; PAGNOCCA; RODRIGUES; BACCI JR, 2011).

Em torno de 30% das operárias que vivem na superfície do jardim de fungo ficam lambendo-o continuamente (QUINLAN; CHERRETT 1979) e esse comportamento pode ser apontado como um mecanismo de descontaminação por meio da remoção de esporos estranhos (VANBAEL *et al.*, 2009; DINIZ; BUENO, 2010).

Evento similar foi constatado por (BASS & CHERRETT, 1994) em que as operárias de *Atta sexdens* controlaram o crescimento de contaminantes do jardim de fungo através do comportamento de “lambadura”. Além do que, a retirada de patógenos pode-se dar através da retirada de pedaços de jardim de fungo infectado, os quais são levados para o lixo da colônia (CURRIE; STUART, 2001). E o uso de secreções glandulares que contêm compostos antimicrobianos (MARSARO-JÚNIOR *et al.*, 2001; FERNÁNDEZ-MARÍN *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2008).

Para diminuir este problema, algumas linhas de pesquisas têm sido sugeridas: utilização de antibióticos que eliminem bactérias mutualistas das formigas-cortadeiras, que as protegem contra fungos entomopatogênicos e antagonistas do jardim de fungo (MATTOSO; MOREIRA; SAMUELS, 2012). Agregação de fungos entomopatogênicos e baixas doses de inseticidas, o uso de substâncias imunossupressoras sobre o sistema imune de formigas-cortadeiras para verificar se sua administração aumenta a vulnerabilidade dessas formigas a fungos entomopatogênicos (SANTOS; DE OLIVEIRA & SAMUELS, 2007).

Em comparação com os vertebrados, o sistema imune dos insetos é simples porque não é baseado em anticorpos e não possui memória imunológica (ROLFF & SIVA-JOTHY, 2003). Apesar disso, os insetos são aptos em responder de maneira eficiente a invasores estranhos como parasitas e patógenos, utilizando o seu sistema imune inato, compreendendo respostas celulares e humorais.

A resposta humoral resulta principalmente da ação de proteínas que estão presentes ou são produzidas, sendo em geral associadas à infecção de microrganismos. Entre as moléculas mais importantes do sistema humoral, estão os peptídeos antimicrobianos, produzidos por diversos tecidos e normalmente detectados na hemolinfa algumas horas após a infecção. Os insetos também liberam oxigênio citotóxico e reativo, assim como várias outras moléculas de defesa, como lisozimas (HOFFMAN 2003; GARCIA *et al.*, 2004; BÜYÜKGÜZEL *et al.*, 2007; LOPES, 2008).

As reações celulares ocorrem na hemolinfa quando os hemócitos circulantes entram em contato com o corpo estranho desencadeando o processo de fagocitose, agregação, nodulação ou encapsulação (GILLESPIE *et al.*, 1997; LAVINE & STRAND, 2002). Elas ocorrem em combinação com as defesas humorais (DUNN, 1986).

Na hemocele existem vários tipos de hemócitos, mas os granulócitos, os plasmócitos e os coagulócitos são os que participam das defesas celulares e humorais na maioria dos insetos. Os hemócitos também participam da eliminação de toxinas e de tecidos anormais ou mortos (LAVINE & STRAND, 2002).

Existem vários fatores que atuam na resposta imune do inseto como sexo, idade, disponibilidade de recursos e interferência de parasitas (SCHMID-HEMPEL, 2003). Do mesmo modo, alguns elementos químicos podem intervir na sua resposta imune. Trabalhos recentes revelaram os efeitos negativos e positivos de poluentes de metais pesados sobre a resposta de defesa de insetos (SORVARI *et al.*, 2007; VAN OOIK; PAUSIO & RANTALA, 2008).

O zinco, em sua forma metálica, tem limitada biodisponibilidade e não apresenta nenhum risco ecológico. Contudo, pode reagir com outras substâncias químicas, como ácidos e oxigênio, para formar compostos que podem se tornar potencialmente tóxicos (RADHIKA; SUBRAMANIAN; NATARAJAN, 2006). É um metal encontrado em águas residuárias industriais, principalmente de atividades de mineração e de galvanoplastia (KING *et al.*, 2008). Dependendo da concentração, este metal pode limitar o crescimento de fungos filamentosos e ser tóxico para alguns microrganismos, como bactérias e microalgas (ARUNAKUMARA; XUECHENG, 2008; VALIX; LOON, 2003; HEINLAAN *et al.*, 2008).

Este trabalho teve por objetivo avaliar em laboratório a aceitação de iscas a base de farelo de trigo com propágulo vivo do fungo *T. harzianum* e iscas de sulfato de zinco em colônias de *Atta sexdens*, testar a concentração de sulfato e cloreto de zinco *in vitro* viável para a inibição do fungo simbiote e antagonista, e por fim aferir a resposta imune mediante a contagem de hemócitos das operárias imersas em solução de sulfato de zinco.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Desenvolvimento inicial das colônias de *Atta sexdens*

Foram coletadas 56 fêmeas recém-fecundadas da espécie *Atta sexdens* durante a revoada que ocorreu em sete de novembro de 2013, no Campus Universitário de Gurupi - TO. Essas fêmeas foram armazenadas em recipientes plásticos (11 cm de diâmetro da base x 8 cm de altura), contendo 1 cm de gesso no fundo, a fim de manter umidade, e uma tampa perfurada que o cobria de modo a permitir a ventilação. Em seguida, elas foram acondicionadas em sala climatizada do Laboratório de Ecologia Funcional Aplicada da UFT ( $25 \pm 1$  °C,  $75 \pm 5$  % U.R. escotofase total durante 56 dias. Após a emergência das primeiras operárias, que se deu aos trinta dias, o fotoperíodo foi alterado para 12:12 (Luz: Escuro) e as colônias incipientes passaram a ser alimentadas com folhas de *Mangifera indica* (mangueira), *Anacardium occidentale* (cajuzeiro), *Citrus* sp., bem como aveia em flocos e farelo de trigo. À medida que o jardim de fungo crescia, as colônias eram colocadas em recipientes de plásticos maiores.

#### 3.2 Isolamento do fungo *Trichoderma harzianum*

A partir do produto comercial Trichodermil de formulação líquida contendo  $10^8$  ufc/g ou L, foi isolado o fungo *T. harzianum* cepa IAB-32 que atua inibindo fitopatógenos habitantes de solo, utilizando-se de um ou mais mecanismos que são basicamente a antibiose (antibióticos, toxinas e enzimas que afetam o desenvolvimento de fungos), parasitismo e competição.

Repicagens sucessivas foram feitas até a obtenção do isolado puro. As repicagens eram realizadas em ambiente controlado, utilizando-se capela de fluxo vertical, onde os fungos foram inoculados em placas de Petri contendo o meio de cultura BDA (Batata, Dextrose, Ágar pH = 6,2) as quais permaneceram incubadas à temperatura de  $25 \pm 1$  °C, umidade relativa  $70 \pm 10\%$  e fotofase de 12 horas.

### 3.3 Produção do antagonista

Para a produção de *T.harzianum*, os discos de cultivo em ágar foram repicados para Erlenmeyers de 1.000 ml de capacidade, contendo 400 ml de meio líquido de Batata, Dextrose, Ágar (BDA). Os valores de pH do meio foi ajustado para 6,2 utilizando-se a solução de NaOH 1mol.L<sup>-1</sup>. O fungo permaneceu nesse recipiente durante 10 dias, sob agitação rotativa, a 120 rpm incubado a 28°C no escuro. A massa de micélio foi coletada e lavada três vezes em água destilada esterilizada. Posteriormente era removido o excesso de água, por prensagem em papel de filtro.

### 3.4 Produção da formulação do tipo granulada

Para produzir a formulação do tipo granulada, foi utilizada a metodologia adaptada de (LEWIS & PAPAIVIZAS, 1985), onde foram dissolvidos 5,6 g de alginato de sódio e 5,6 g de suco concentrado em pó sabor de laranja (a fim de aumentar a atratividade das iscas) em 190 mL de água destilada esterilizada, em agitador magnético. Posteriormente, foi preparada uma suspensão contendo 10 g de farelo de trigo, 3,1 g de micélio do antagonista triturado em triturador elétrico em 182 mL de água. A essa suspensão adicionou-se 190 ml da solução de alginato de sódio e concentrado de laranja. Essa mistura foi gotejada com a ajuda de uma pipeta de Pasteur numa solução de CaCl<sub>2</sub> 0,25 M em agitação rotativa. Os grânulos formados eram mantidos pelo tempo de 10 min nesta solução, em seguida eram retirados lavados em água destilada, para remover o excesso de CaCl<sub>2</sub>, e submetidos à secagem em estufa, durante dois dias a 26°C.

Para avaliar a viabilidade do agente biológico e a inexistência de contaminação 10 grânulos foram inoculados para placas de Petri contendo meio de cultura BDA Batata, Dextrose, Ágar e mantidas em sala com temperatura de 25±1°C, umidade relativa 70±10% e fotofase de 12 horas. Esse procedimento foi repetido a cada 15 dias.

### 3.5 Teste de aceitação de iscas com *Trichoderma harzianum*

Foram usadas quatro colônias de *A. sexdens*. Essas colônias eram compostas por um pote de plástico contendo uma esponja fúngica, formada pelo fungo que se desenvolve sobre o substrato vegetal e assim chamada devido ao seu aspecto esponjoso, uma rainha, formas imaturas (larvas e pupas) e operárias de diferentes idades. Todas as colônias possuíam aproximadamente 500 mL de esponja fúngica e 1000 operárias. Essas colônias eram dispostas em bandejas plásticas de 50 cm x 30 cm. Foram estabelecidos por sorteio dois grupos de colônias: o grupo controle, que receberam iscas encapsuladas sem *T. harzianum* e o grupo tratamento que recebeu iscas contendo hifas do antagonista. Foram oferecidos 2 g de iscas em placas de Petri (90 mm) diariamente durante 15 dias. As iscas não incorporadas foram pesadas em balança de precisão e o volume do fungo simbiote foi medido diariamente com régua.

### 3.6 Isolamento de *Leucoagaricus gongylophorus*

O isolamento e os ensaios com o fungo simbiote *L. gongylophorus* foram realizados no laboratório de Controle Microbiano de Insetos da Universidade Federal do Tocantins–UFT, localizado em Gurupi-TO.

O fungo simbiote mutualista foi isolado de uma colônia de *A. sexdens* mantida em laboratório. Partes do topo da esponja fúngica, que possuíam hifas esbranquiçadas, foram inoculadas em meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar pH = 5,4) contendo antibiótico cloranfenicol (250mg/mL). Após 24h, as hifas foram repicadas sob estereomicroscópio, antes que outras espécies de fungos se desenvolvessem. Para o crescimento do fungo as placas foram mantidas em sala com temperatura de  $25 \pm 1^\circ \text{C}$ , umidade relativa  $70 \pm 10\%$  e fotofase de 12 horas. Para comprovar a obtenção de isolados puros do fungo simbiote, foram preparadas lâminas para observação ao microscópio, onde procurou-se observar, principalmente, a presença de gongilídeos.

### 3.7 Avaliação dos efeitos do sulfato de zinco ( $ZnSO_4$ ) e cloreto de zinco ( $ZnCl_2$ ) no desenvolvimento *in vitro* do fungo simbiote e de um fungo antagonista

O meio de cultura utilizado para isolamento dos fungos foi de batata-dextrose-ágar (BDA) Batata, Dextrose, Ágar com valores de pH do meio foi ajustado para 6,2 utilizando-se a solução de NaOH  $1\text{mol.L}^{-1}$ . Os frascos contendo o meio de cultura e a concentração de sulfato de zinco e de cloreto de zinco foram autoclavados a  $120^\circ\text{C}$  e 1,1 atm de pressão, durante 15 minutos. Em uma câmara asséptica de fluxo laminar foram transferidos 15 mL de meio para cada placa de Petri, onde permaneceram até a completa solidificação.

Para os tratamentos, foram recortados discos (5,00 mm) contendo micélio do fungo mutualista e do antagonista, com o auxílio de um vazador, estes foram transferidos para placas de Petri a uma distância de 1,5 cm da borda da placa, com meio de cultura Batata, Dextrose, Ágar. As placas foram divididas em (testemunha), (sulfato de zinco) e (cloreto de zinco). As concentrações de sulfato de zinco e de cloreto de zinco usadas foram: (0,15; 0,25; 0,5; 1,5; 2,5 e 5,0 g/L), em quantidade de 200  $\mu\text{L}$  cada e espalhadas com ajuda da espátula de Drigalsky.

A escolha das dosagens foi feita a partir de trabalhos que utilizaram zinco no controle de bactérias e fungos que causam intemperismo em prédios históricos (LOPES, 2002). Para o crescimento do fungo as placas eram seladas com filme polietileno e em seguida, mantidas em câmara climatizada com temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , umidade relativa  $70 \pm 10\%$  e fotofase de 12 horas. O experimento foi composto por dois grupos: tratamento e controle, com dez repetições cada.

Com as placas de Petri invertidas foram realizadas as medidas do diâmetro (em mm) da colônia do fungo mutualista com ajuda de uma lupa binocular estereoscópica, pois o crescimento *in vitro* de *L. gongylophorus* em laboratório, é de muita dificuldade, uma vez que no ambiente em que o fungo cresce naturalmente, há outros microrganismos (fungos, bactérias e leveduras), o que pode levar ao surgimento de contaminações.

Já em *T. harzianum* as medidas do diâmetro foram feitas (em mm) com ajuda de um paquímetro porque o mesmo cresce depressa sobre diferentes substratos. O diâmetro das colônias do fungo mutualista foram medidas do primeiro ao décimo oitavo dia, já as colônias do fungo antagonista do primeiro ao décimo dia.

A partir dessas medições, foi calculado o diâmetro inicial médio (DI) e o diâmetro final médio (DF) de cada concentração. Com base nesses valores foi estimada a eficiência média do crescimento do fungo mutualista e antagonista (E), conforme a fórmula:  $E = DF/DI$ . A eficiência relativa (ER) do crescimento das colônias de *L. gongylophorus* e *T. harzianum* na presença de diferentes concentrações de sulfato de zinco e cloreto de zinco foi expressa em relação à média do controle, pela fórmula:  $ER = E/EC$ ; sendo EC a eficiência do crescimento do fungo mutualista e antagonista na ausência de concentração (SILVA *et al.*, 2006b). Baseado na eficiência relativa foi estimado o crescimento e a inibição dos fungos.

Diferenças estatísticas entre o crescimento do fungo mutualista e antagonista frente às concentrações de sulfato e cloreto de zinco foram avaliadas através da ANOVA não-paramétrica Kruskal Wallis (a um erro de 5%), utilizando o programa Statistica 7.

### **3.8 Produção da formulação do tipo granulada (GR) com sulfato de zinco**

Adaptando a metodologia de formação de iscas granuladas encapsuladas foi preparada a partir de uma adaptação da metodologia de (LEWIS & PAPAIVAS, 1985). Foram dissolvidos 5,6 g de alginato de sódio e 5,6 g de suco concentrado em pó sabor de laranja em 190 ml de água destilada esterilizada, em agitador magnético juntamente com a concentração de  $ZnSO_4$  que obteve o melhor resultado na inibição *in vitro* de *L. gongylophorus* (0,25 g/L). Preparou-se uma suspensão contendo 10 g de farelo de trigo. A essa suspensão foi adicionada 190 mL da solução de alginato de sódio, suco de laranja e sulfato de zinco. Essa mistura foi gotejada com a ajuda de uma pipeta de Pasteur numa solução de  $CaCl_2$  0,25 M em agitação rotativa. Os grânulos formados foram mantidos pelo tempo de 10 min nesta solução, sendo posteriormente lavados em água destilada esterilizada, a fim de remover o excesso de  $CaCl_2$ , e submetidos à secagem em estufa, durante dois dias a 26°C.

### 3.9 Teste de aceitação de iscas com sulfato de zinco e *Trichoderma harzianum*

Para estes testes, foram usadas oito colônias de *A. sexdens*. As colônias receberam tratamentos distintos: iscas controle; iscas de *T. harzianum*; iscas encapsuladas de sulfato de zinco e iscas de *T. harzianum* juntamente com iscas de sulfato de zinco. As colônias recebiam 2 g de iscas que eram colocadas em placas de Petri (90 mm) diariamente durante 15 dias. As iscas não transportadas eram pesadas em balança de precisão e o volume do fungo simbiote medido diariamente com régua.

### 3.10 Contagem total de hemócitos

Após os tratamentos com a aceitação de iscas, removiam-se 20 operárias de cada colônia cuja largura da capsula cefálica era em torno de 2,0-2,5 mm. Coletou-se a hemolinfa de cada formiga, na quantidade de 0,1 µl por meio de um capilar de 1 mL. O capilar após o uso na remoção da hemolinfa foi posto em um tudo de centrifugação do tipo *Eppendorf* com uma solução tamponada, usada como anticoagulante na proporção de 1:1 para a limpeza. A hemolinfa foi retirada da região occipital da cabeça das operárias. As amostras foram colocadas em tubos em quantidade de 0,4 µl de anticoagulante cada.

Foram realizadas contagens totais de hemócitos (células/mL) imediatamente após a coleta. A contagem total de hemócitos foi determinada, individualmente, em câmara de Neubauer em microscópio óptico. Para relacionar a contagem total de hemócitos nas formigas foi proposto um intervalo de tempo entre as contagens de 5 minutos, para a decantação da amostra. Para se obter o número estimado de hemócitos/ mL fez-se o seguinte cálculo:

$$(\text{n}^\circ \text{ médio de hemócitos contados em c}) \times (2,5 \times 10^5)$$

Diferenças na contagem de hemócitos foram avaliadas através da ANOVA paramétrica seguida pelo teste Tukey (a um erro de 5%), utilizando o programa Statistica 7.

### 3.11 Imersão de formigas em solução de sulfato de zinco

Este experimento foi feito para avaliar se o sulfato de zinco altera o sistema imune das formigas-cortadeiras. Foram utilizadas no total de sete colônias de *A. sexdens*. Vinte operárias com largura da capsula cefálica em torno de 2,0-2,5 mm, foram retiradas de cada colônia e imersas em solução de sulfato de zinco por vinte segundos, as concentrações usadas foram de: (0,15; 0,25; 0,5; 1,5; 2,5 e 5,0 g/L), posteriormente, era retirado o excesso da solução com papel filtro e as operárias colocadas em tubos de vidro com algodão umedecido com água destilada esterilizada, e ficaram acondicionadas durante 24 e 48 horas, e estas eram mantidas em sala climatizada com temperatura de  $25 \pm 2$  °C,  $75 \pm 5$  % de umidade relativa.

Foi utilizado o mesmo processo para as operárias do grupo controle, entretanto, as mesmas foram imersas em água destilada e esterilizada. Um grupo de operárias não foram imersas em água e em solução de sulfato de zinco. Em seguida, retirou-se a hemolinfa e foi feita à contagem total de hemócitos.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Teste de aceitação de iscas com *Trichoderma harzianum*

O tempo médio para a aceitação do primeiro grânulo foi de (2,8 min) carregando cerca de 18% da quantidade total de grânulos disponibilizados para o consumo das colônias ao longo de todo o experimento. Estes grânulos possuíam diâmetro médio de 1 milímetro e massa de  $\pm 0,02$  gramas.

O tratamento de iscas de *T. harzianum* foi o que obteve maior preferência, comprovado pela pesagem das iscas restantes na placa, realizada após o tempo de oferecimento (30 min), e foi o tratamento com o menor tempo (Tabela 1).

Tabela 1 – Quantidade média  $\pm$  desvio padrão de iscas transportadas em cada tratamento (n = 4 colônias) e tempo médio (TM) em minutos para transporte do primeiro grânulo de isca. A duração do teste foi de 15 dias para cada colônia.

Tratamento	Total (g)	TM (min)
Controle	15,3 $\pm$ 1,14	3,3 $\pm$ 3,07
<i>T.harzianum</i>	25,0 $\pm$ 0,91	2,3 $\pm$ 1,98
Média	40,3	2,8

O oferecimento de iscas em grande quantidade no último dia de avaliação (saturação) foi importante para verificar se o processo de carregamento destes grânulos para dentro da colônia houve uma mudança de comportamento por parte das mesmas, resultando na rejeição posterior das iscas que haviam sido carregadas para o interior da colônia. Estas iscas não eram carregadas para o local de rejeitos do cultivo do fungo simbiote e indivíduos mortos, mas sim para cima do algodão que estava sobre a tampa do frasco da colônia.

Ao final dos primeiros quinze dias de tratamento, ou seja, o primeiro período de aplicação verificou-se redução média de 30% do fungo simbiote. As colônias submetidas ao tratamento controle, não apresentaram variação no volume de fungo, seus recipientes permaneceram repleto de fungo até a borda, ou seja, 100%.

Relacionado a esse percentual de redução, foi contado o número de formigas mortas e o rejeito (lixo) das colônias foram pesados. O tratamento de iscas de *T. harzianum* obteve maior mortalidade e rejeito em comparação ao controle (Tabela 2).

Tabela 2 – Média  $\pm$  desvio padrão de mortalidade das operárias e rejeitos (lixo) (n= 4 colônias). A duração do teste foi de 15 dias para cada colônia.

Tratamento	Mortalidade	Rejeito(g)
Controle	30,10 $\pm$ 5,48	3,12 $\pm$ 1,76
<i>T.harzianum</i>	71,50 $\pm$ 8,45	7,00 $\pm$ 2,64
Média	50,8	5,06

#### 4.2 Avaliação dos efeitos do sulfato de zinco ( $ZnSO_4$ ) e cloreto de zinco ( $ZnCl_2$ ) no desenvolvimento *in vitro* do fungo simbiote e de um fungo antagonista

O tamanho inicial de todos isolados era de 5,00 mm de diâmetro. Ao final dos 18 dias, *L. gongylophorus* apresentava em média 10,03 mm de diâmetro e começou a crescer a partir do quarto dia de avaliação, enquanto a maioria dos isolados de *T. harzianum* cresceu completando o tamanho da placa de Petri (90 mm) em apenas quatro dias, no grupo controle. Na menor concentração de sulfato de zinco (0,15 g/L) tanto *L. gongylophorus* e *T. harzianum* se desenvolveram normalmente com médias de 10,48 mm e 90 mm respectivamente.

Entretanto, nas demais concentrações de sulfato de zinco (0,25; 0,5; 1,5; 2,5 e 5,0 g/L) *L. gongylophorus* não se desenvolveu, ao passo que *T. harzianum* cresceu a partir do segundo dia de avaliação e no quarto tomou completamente as placas de Petri com as seguintes médias 90 mm; 90 mm; 81,90 mm; 78,70 mm; e 70 mm nesta ordem.

Houve diferença estatística nos valores da eficiência relativa do crescimento de *L. gongylophorus* em diferentes concentrações de sulfato de zinco (ANOVA de Kruskal Wallis,  $X^2 = 34,53$ ; GL= 6;  $P = 0,001$ ) (Figura 2). As concentrações de 0,25; 0,5; 1,5; 2,5 e 5,0 g/L suprimiram o desenvolvimento do fungo simbiote.

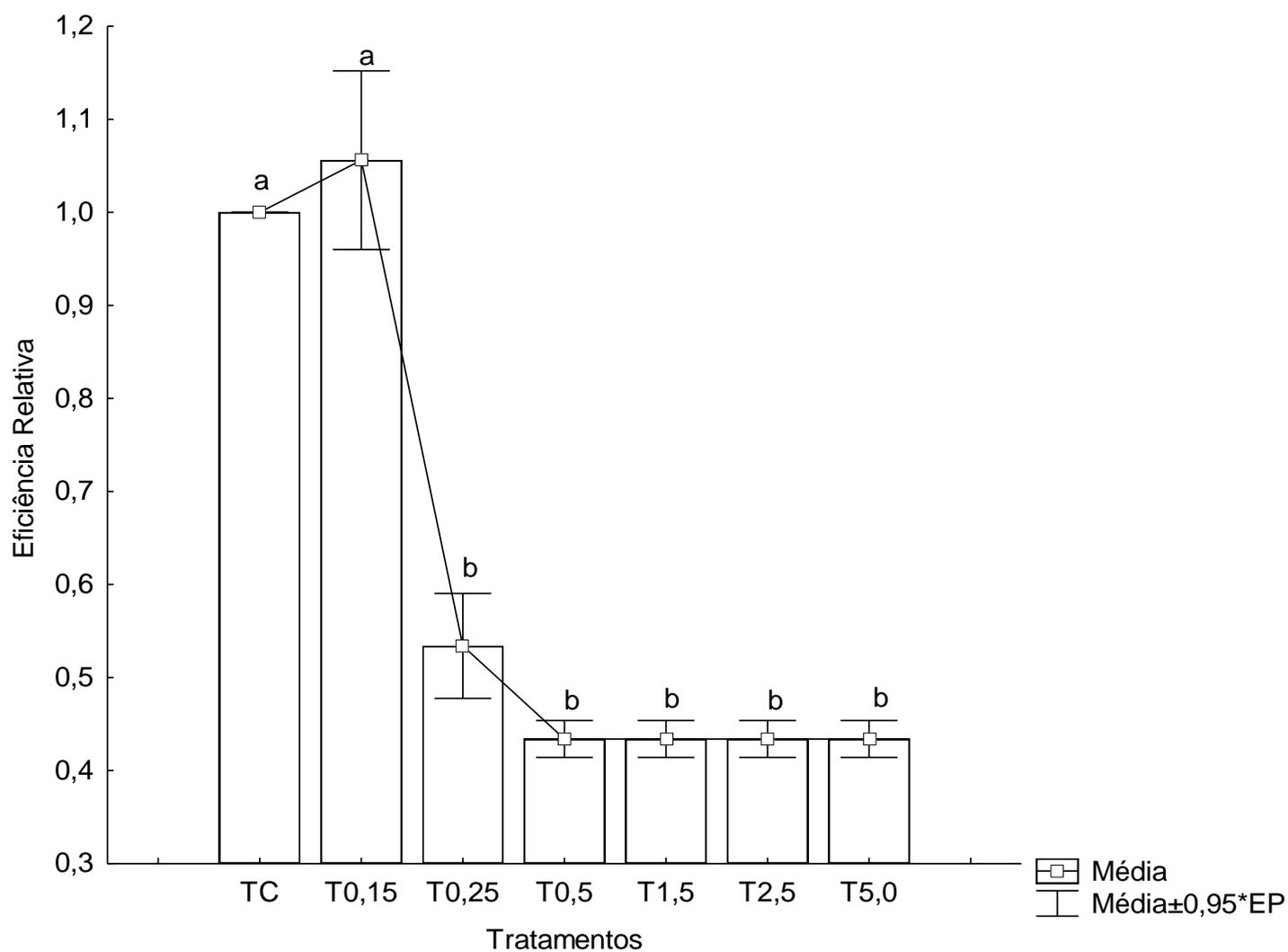


Figura 2– Eficiência relativa do crescimento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* em diferentes concentrações de sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub>) g/L e grupo controle.

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si (ANOVA de Kruskal Wallis,  $P < 0,05$ ).

Em *T. harzianum* a eficiência relativa de crescimento em diferentes concentrações de sulfato de zinco (ANOVA de Kruskal Wallis,  $X^2 = 20,83$ ; GL= 6;  $P = 0,020$ ) (Figura 3) confirmou diferenças significativas entre os tratamentos, e as concentrações de 2,5 e 5,0 g/L diminuíram o crescimento do fungo antagonista.

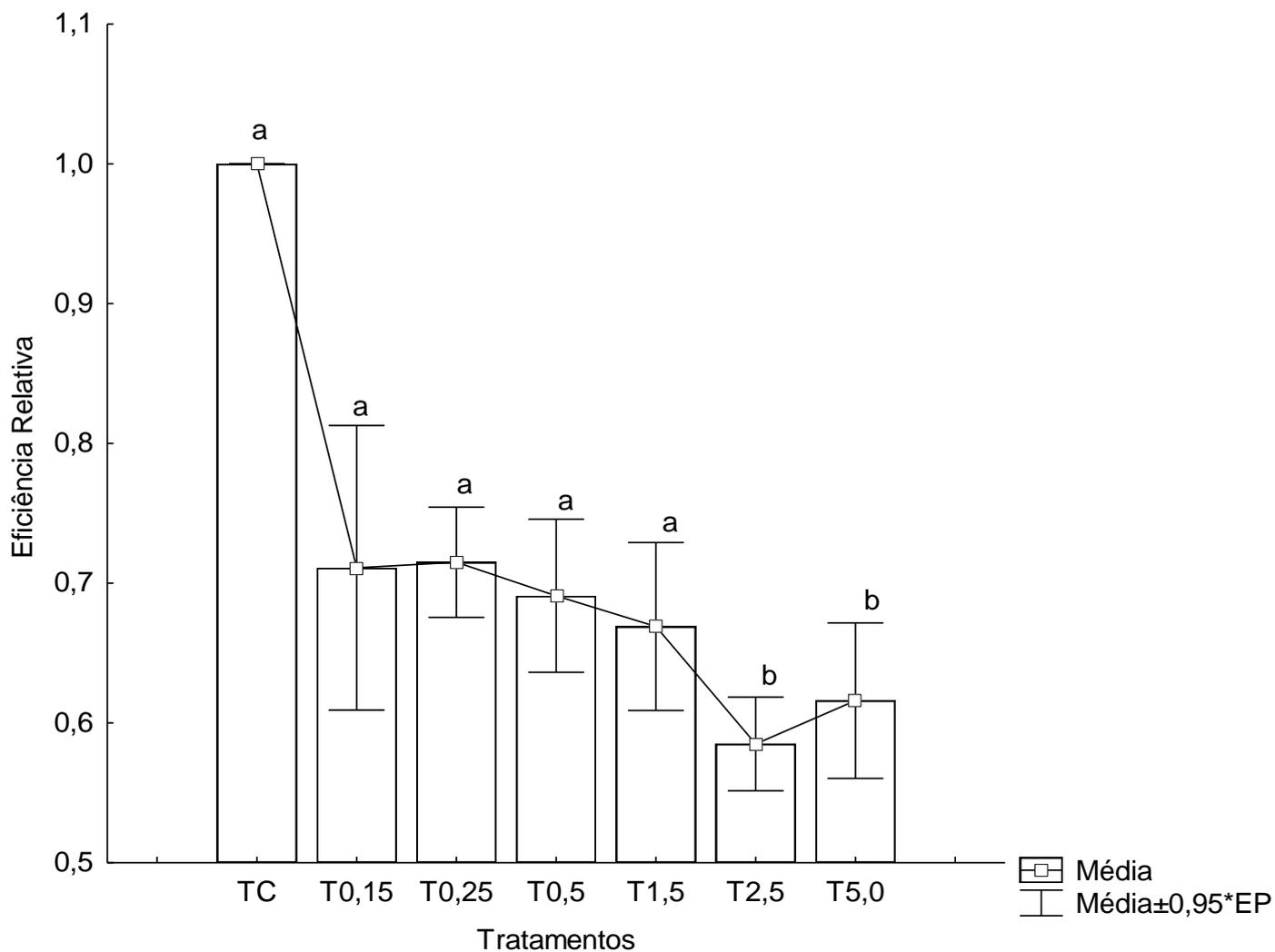


Figura 3– Eficiência relativa do crescimento do fungo *Trichoderma harzianum* em diferentes concentrações de sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub>) g/L e grupo controle.

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si (ANOVA de Kruskal Wallis,  $P < 0,05$ ).

Ao final dos 18 dias, *L. gongylophorus* apresentava em média 11,05 mm de diâmetro e começou a crescer a partir do quarto dia de avaliação, enquanto a maioria dos isolados de *T. harzianum* cresceu completando o tamanho da placa de Petri (90 mm) em apenas quatro dias, no grupo controle.

Os valores de eficiência relativa do crescimento de *L. gongylophorus* em diferentes concentrações de cloreto de zinco (ANOVA de Kruskal Wallis,  $X^2 = 12,35$ ; GL= 6;  $P = 0,545$ ) (Figura 4) evidenciou que não houve diferença significativa entre os tratamentos, pois todas as concentrações suprimiram o desenvolvimento do fungo.

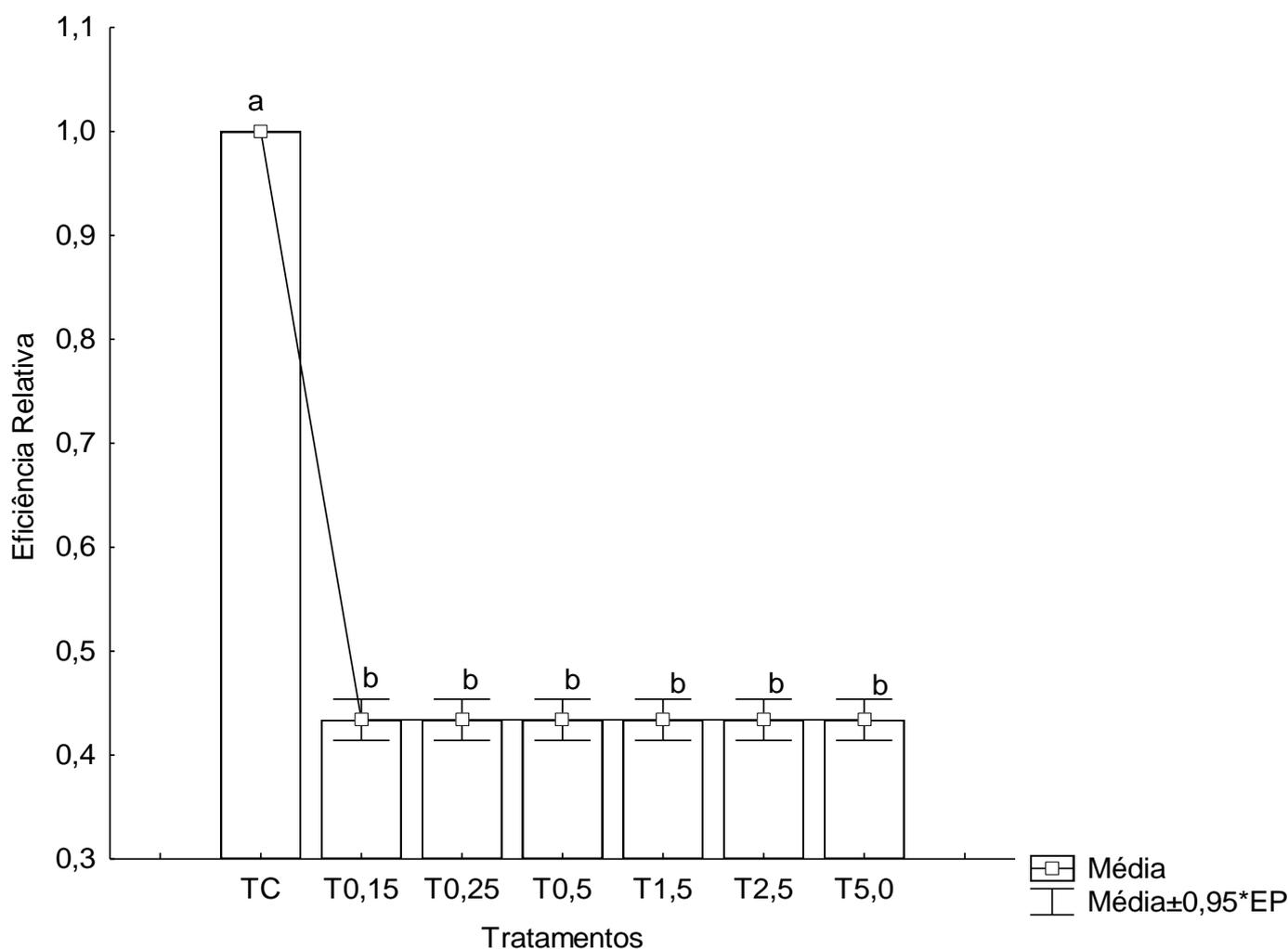


Figura 4 – Eficiência relativa do crescimento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* em diferentes concentrações de cloreto de zinco ( $ZnCl_2$ ) g/L e grupo controle.

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si (ANOVA de Kruskal Wallis,  $P < 0,05$ ).

O fungo *T.harzianum* cresceu a partir do quinto dia de avaliação, nas seguintes concentrações 0,15; 0,25; 0,5 g/L, mas não conseguiu tomar completamente as placas de Petri. As médias de crescimento foram de 14,70 mm; 13,20 mm e 16,30 mm por essa ordem.

A eficiência relativa de crescimento de *T. harzianum* em diferentes concentrações de cloreto de zinco (ANOVA de Kruskal Wallis,  $X^2= 53,60$ ; GL= 6;  $P= 0,000$ ) (Figura 5) verificou diferença significativa entre os tratamentos, no qual as concentrações 1,5; 2,5 e 5,0 g/L suprimiram o desenvolvimento do fungo.

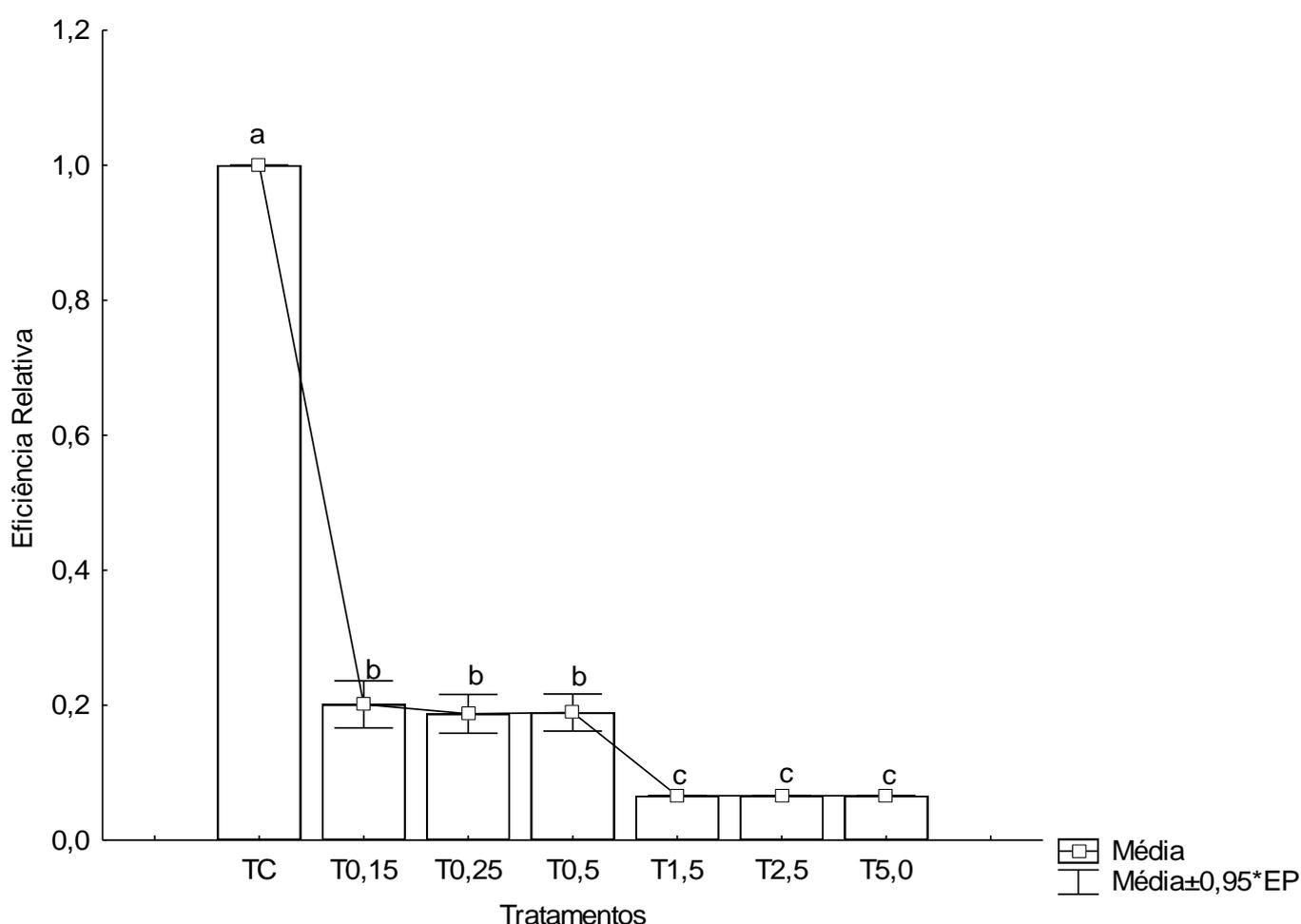


Figura 5 – Eficiência relativa do crescimento do fungo *Trichoderma harzianum* em diferentes concentrações de cloreto de zinco ( $ZnCl_2$ ) g/l e grupo controle.

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si (ANOVA de Kruskal Wallis,  $P < 0,05$ ).

### 4.3 Teste de aceitação de iscas com sulfato de zinco e *Trichoderma harzianum*

O tempo médio para aceitação do primeiro grânulo foi de (4,20 min) carregando em torno de 41% da quantidade total de grânulos disponibilizados para o consumo das colônias ao longo de todo o experimento. Estes grânulos possuíam diâmetro médio de 1 milímetro e massa de  $\pm 0,02$  gramas.

O tratamento de iscas de *T. harzianum* juntamente com iscas de sulfato de zinco foi o que carregou a maior quantidade de iscas, onde a preferência foi maior para os encapsulados contendo o fungo antagonista, comprovado pela pesagem das iscas restantes na placa, realizada após o tempo de oferecimento (30 min), porém foi o tratamento com o segundo maior tempo (Tabela 3). O Tratamento somente com iscas de *T. harzianum*, mesmo não sendo o maior em quantidade de iscas transportadas para o interior da colônia, apresentou atratividade superior ao tratamento com iscas de sulfato de zinco e controle.

Tabela 3 - Quantidade média  $\pm$  desvio padrão de iscas transportadas em cada tratamento (n = 8 colônias) e tempo médio (TM) em minutos para transporte do primeiro grânulo de isca. A duração do teste foi de 15 dias para cada colônia.

Tratamento	Total (g)	TM (min)
Controle	15,3 $\pm$ 1,14	3,3 $\pm$ 3,07
<i>T.harzianum</i>	25,0 $\pm$ 0,91	2,3 $\pm$ 1,98
<i>T.harzianum</i> e ZnSO <sub>4</sub>	32,1 $\pm$ 1,02	5,4 $\pm$ 3,66
ZnSO <sub>4</sub>	20,1 $\pm$ 1,38	5,9 $\pm$ 5,83
Média	92,6	4,2

O oferecimento de iscas em grande quantidade no último dia de avaliação (saturação) foi importante para verificar se o processo de carregamento destes grânulos para dentro da colônia houve uma mudança de comportamento por parte das mesmas, resultando na rejeição posterior das iscas que haviam sido carregadas para o interior da colônia. Estas iscas não eram carregadas para o local de rejeitos do cultivo do fungo simbiote e indivíduos mortos, mas sim para cima do algodão que estava sobre a tampa do frasco da colônia.

Ao final dos primeiros quinze dias de tratamento, ou seja, o primeiro período de aplicação, verificou-se redução média de ~ 22% no volume do fungo simbiote das primeiras três colônias utilizadas no experimento.

O mesmo aconteceu com as três colônias usadas na avaliação posteriormente, entretanto, duas colônias desse grupo receberam aplicação de iscas de forma combinada (iscas de *T. harzianum* e iscas de sulfato de zinco) e, como consequência, observou-se uma redução do fungo simbiote mais atenuada, em comparação com os outros tratamentos com uma média de ~ 38%.

As colônias submetidas ao tratamento controle, não apresentaram variação no volume de fungo, seus recipientes permaneceram repleto de fungo até a borda, ou seja, 100%. Ao final dos experimentos, as colônias recuperaram o volume inicial, mesmo recebendo as iscas com o fungo antagonista e com sulfato de zinco.

Relacionado a esse percentual de redução, foi contado o número de formigas mortas e o rejeito (lixo) das colônias foram pesados. O tratamento de iscas de forma combinada (iscas de *T. harzianum* e iscas de sulfato de zinco) foi o que obteve maior mortalidade de formigas e a quantidade rejeito foi maior em comparação com os outros tratamentos (Tabela 4).

Tabela 4 – Média  $\pm$  desvio padrão de mortalidade das operárias e rejeitos (lixo) (n= 8 colônias). A duração do teste foi de 15 dias para cada colônia.

Tratamento	Mortalidade	Rejeito(g)
Controle	35,00 $\pm$ 5,91	5,88 $\pm$ 2,42
<i>T.harzianum</i>	85,00 $\pm$ 9,21	10,05 $\pm$ 3,17
<i>T.harzianum</i> e ZnSO <sub>4</sub>	120,00 $\pm$ 10,95	15,00 $\pm$ 3,87
ZnSO <sub>4</sub>	92,00 $\pm$ 9,60	11,67 $\pm$ 3,41
Média	83,00	10,65

#### 4.4 Contagem total de hemócitos

Não houve diferença significativa entre os tratamentos na contagem total de hemócitos, após a conclusão do teste de aceitação de iscas (ANOVA seguida pelo teste Tukey  $F(3, 76) = 1,3387$ ;  $P = 0,2681$ ) (Figura 6).

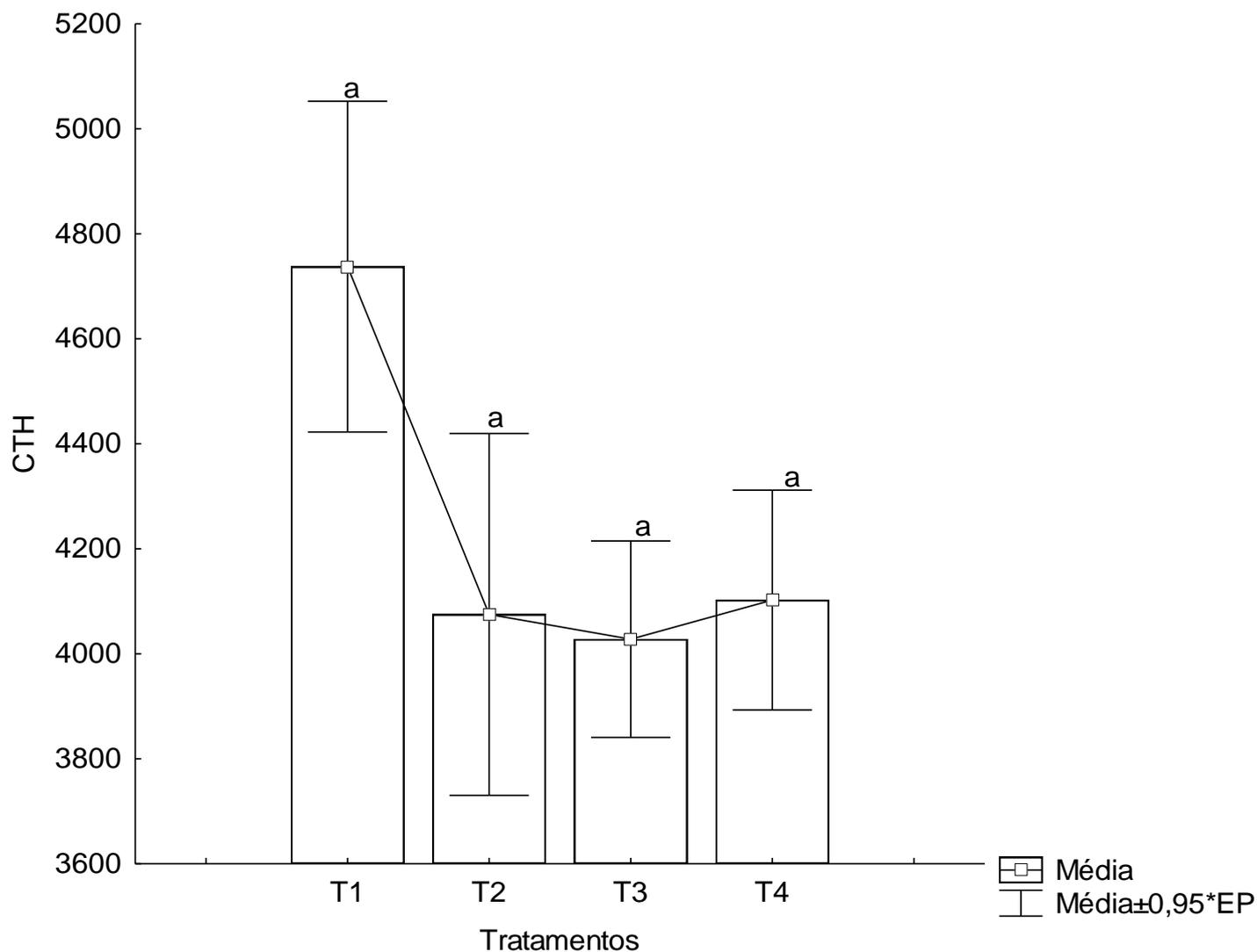


Figura 6 – Contagem total de hemócitos de operárias de *A. sexdens* após tratamento com diferentes tipos de iscas. T1: iscas controle; T2: iscas com *T. harzianum*; T3: Combinação entre iscas de *T. harzianum* e sulfato de zinco; T4: iscas de sulfato de zinco.

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si (ANOVA seguida pelo teste Tukey,  $P < 0,05$ ).

#### 4.5 Imersão de formigas em solução de sulfato de zinco

As análises de dados confirmaram diferenças significativas na contagem total de hemócitos entre os tratamentos no período de acondicionamento de vinte quatro horas das operárias após imersão em diferentes concentrações de sulfato de zinco (ANOVA seguida pelo teste Tukey  $F(7, 72) = 3,5873$ ;  $P = 0,0022$ ) (Figura 7).

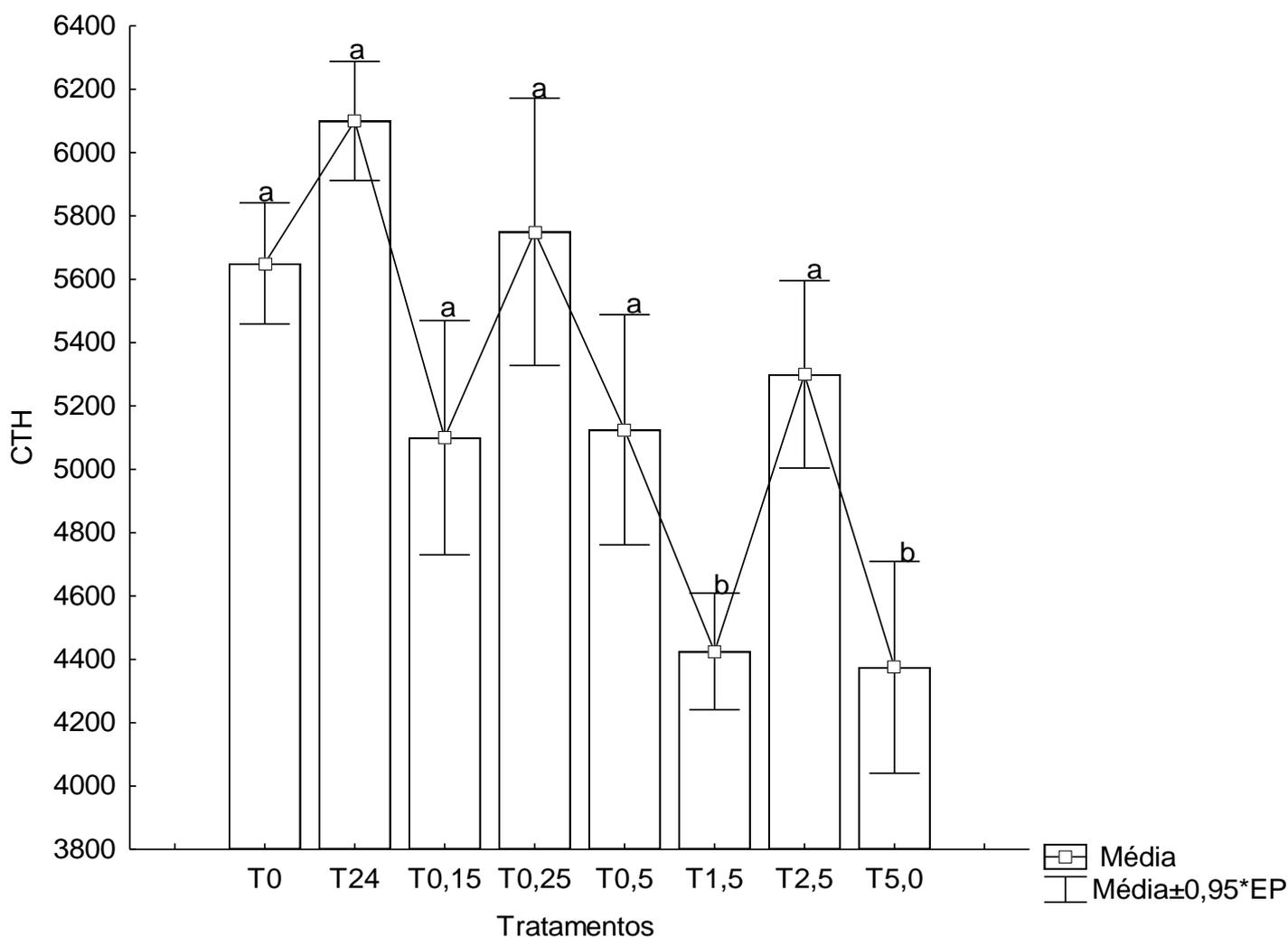


Figura 7 – Contagem total de hemócitos após imersão de formigas em diferentes concentrações de sulfato de zinco em acondicionamento de 24 horas e grupos controle. T0: Grupo de formigas que não foram imersas em sulfato de zinco e água; T24: Grupo de formigas que foram imersas em água destilada e esterilizada e acondicionadas por um período de 24 horas.

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si (ANOVA seguida pelo teste Tukey,  $P < 0,05$ ).

Em operárias imersas em diferentes concentrações de sulfato de zinco, após intervalo de quarenta e oito horas, as análises de dados da contagem total de hemócitos também demonstraram diferenças significativas entre os tratamentos (ANOVA seguida pelo teste Tukey  $F(7, 72) = 10,187$ ;  $P = 0,0000$ ) (Figura 8).

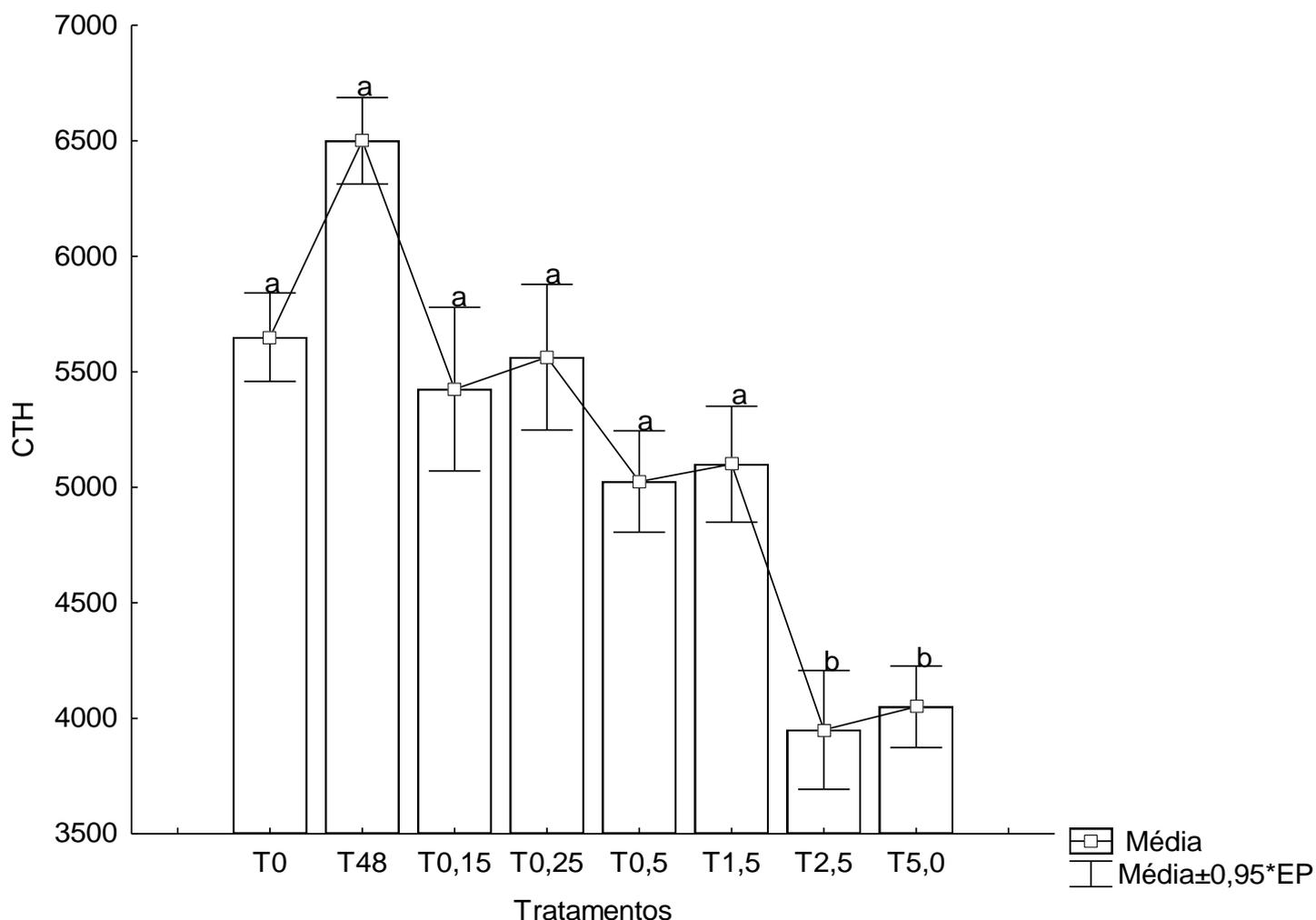


Figura 8 – Contagem total de hemócitos após imersão de formigas em diferentes concentrações de sulfato de zinco em acondicionamento de 48 horas e grupos controle. T0: Grupo de formigas que não foram imersas em sulfato de zinco e água; T48: Grupo de formigas que foram imersas em água destilada e esterilizada e acondicionadas por um período de 48 horas.

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si (ANOVA seguida pelo teste Tukey,  $P < 0,05$ ).

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Teste de aceitação de iscas com sulfato de zinco e *Trichoderma harzianum*

Relacionando ao percentual de redução do fungo simbionte e o número de indivíduos mortos nas colônias, estes foram superiores no tratamento em conjunto de iscas de *T. harzianum* e sulfato de zinco, no entanto, essa análise de mortalidade necessita de maior número de observações, devido à ocorrência de variações em quantidade de alimento (fungo simbionte) entre colônias.

O fungo *T. harzianum* apresenta características antagonísticas como antibiose, hiperparasitismo e competição (GRIGOLETTI, 2000), sobretudo, a competição, que pode resultar em limitação para o fungo simbionte de nutrientes e água, ou de sítios onde esses fatores nutricionais são mais abundantes (PERELLÓ *et al.*, 2003).

A redução do volume fúngico pode ser devido à produção de compostos tóxicos voláteis e não voláteis, com vasta atividade antimicrobiana, que impedem a colonização por outros microrganismos. Entre esses metabólitos estão os compostos de baixo peso molecular e antibióticos. Nessa interação química, conhecida como antibiose, a combinação de enzimas e antibióticos resulta num grau maior de antagonismo (HJELJORD; STENSVAND & TRONSMO, 2001).

O fungo *Trichoderma* sp em contato com o fungo antagonizado, se enrola em torno de suas hifas, e através da formação de apressórios e, portanto, da produção de diferentes enzimas de degradação de parede celular (CHET; BENHAMOU & HARAN, 1998) e de antibióticos (HARMAN *et al.*, 2004), penetra no interior das hifas por meio da combinação da ação desses compostos, resultando no micopredatismo e conseqüente dissolução das paredes e do conteúdo celular, os quais são absorvidos por *Trichoderma*. Também a competição por espaço ou sítios de infecção poderá ocorrer concomitantemente, contribuindo para a atividade de biocontrole (BENÍTEZ *et al.*, 2004; VINALE *et al.*, 2008).

Cerca de um mês após o término dos experimentos, as colônias submetidas aos tratamentos recuperaram o volume inicial, o que indica mecanismos de resiliência das colônias, nos seus ninhos é grande o número de interações e diversidade de microrganismos com as formigas e o fungo mutualista, sabe-se que muitos metabólitos podem mediar essa interação.

Por exemplo, CURRIE & STUART (2001) verificaram que em ninhos de *Atta colombica* intencionalmente contaminados por fungos filamentosos, tais como *Escovopsis* sp. e *Trichoderma* sp., as operárias realizaram dois comportamentos principais de remoção física desses patógenos: em um deles os esporos presentes no jardim de fungo são removidos pelas operárias com a boca (processo denominado “grooming”), enquanto que o outro consiste na remoção anormal (excessiva) de material vegetal recém-colocado no jardim com o fungo simbiote (denominado “weeding”).

Massa e tempo são fatores relacionados à aceitação dos grânulos, além de atrair as formigas, as iscas devem possuir características físicas que facilitem a sua captura e carregamento (LIMA *et al.*, 2003). Esses mesmos autores avaliaram a atratividade de iscas artesanais para a espécie *Atta bisphaerica*, confeccionadas com farelo de trigo, contabilizaram um tempo médio para início de carregamento de 3,5 min, transportando  $1,4 \pm 0,35$  grânulos.

*Trichoderma* sp. proliferam abundantemente, especialmente quando aplicado como micélio jovem veiculado em farelo de trigo (LEWIS & PAPAIVIZAS, 1985). Os encapsulados à base de farelo de trigo apresentaram-se uniformes quanto ao aspecto morfológico do grânulo seco, mantendo a estabilidade e viabilidade. Segundo HADAR (1979), esta fonte nutricional foi considerada como o melhor meio para o crescimento e esporulação de *T. harzianum*. Os testes de viabilidade das iscas micoinseticidas, mostraram que elas permaneceram viáveis por, pelo menos, quatro meses a 26°C após sua fabricação, podendo inclusive, serem usadas como meio de conservação para espécies de fungos do gênero *Trichoderma*.

## 5.2 Contagem total de hemócitos

O número médio de hemócitos nas operárias de colônias que receberam alguma dose de *Trichoderma* e/ou zinco não sofreu déficit em comparação com as operárias do grupo controle. Entretanto, o volume do fungo simbiote/mutualista foi reduzido. Isso sugere que, embora o zinco seja um metal essencial para o metabolismo celular, níveis elevados podem acarretar efeitos tóxicos, os quais, por sua vez, podem culminar, em diminuição do crescimento do animal, conforme verificado em crustáceos (VIRGA; GERALDO & SANTOS, 2007).

Metabolicamente, a redução do crescimento celular resulta do fato de que as células reduzem os gastos energéticos para o crescimento, ativando processos direcionados para a sobrevivência em um ambiente com condições diferenciadas, como exposição à xenobióticos, que são compostos químicos estranhos ao organismo. Eles são produzidos pela indústria ou pela natureza, através de vegetais e fungos. Podem ser enquadrados em diversas categorias, como por exemplo, pesticidas agrícolas, inseticidas, plásticos, produtos de limpeza e fármacos. (GADD; RAVEN, 2010).

Assim, variações no padrão de crescimento celular de eucariotos e procariotos são citadas como efeitos induzidos pelo contato com metais. A intensidade das respostas está associada ao tempo de contato e a concentração do metal. Tais modificações podem estar relacionadas a alterações na estrutura da permeabilidade da membrana citoplasmática, produzindo progressiva alteração de forma e perda de atividade metabólica, resultando na redução e inibição do crescimento (KUMAR; PRASAD, 2004; MALIK, 2004).

A associação mutualística entre a formiga-cortadeira e o fungo *L. gongylophorus* é muito forte e existe uma total dependência entre ambos. O gênero *Atta* (saúva) utiliza a cultura do fungo como a mais importante fonte de alimento, pois assim evitam a ingestão de componentes químicos tóxicos presentes nos vegetais (DELLA LUCIA & FOWLER, 1993; FERNANDES *et al.*, 2002; TEREZAN *et al.*, 2003).

### 5.3 Avaliação dos efeitos do sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub>) e cloreto de zinco (ZnCl<sub>2</sub>) no desenvolvimento *in vitro* do fungo simbiote e de um fungo antagonista

O zinco é um elemento fundamental para o metabolismo do fungo (ANSARI; MARR; TARIQ, 2004). Já que o mesmo auxilia a manter a integridade de ribossomos, membranas biológicas e é também demandado para o crescimento de microrganismos. Apesar disso, concentrações elevadas desse metal podem ser inibitórias ou tóxicas para as atividades celulares e de crescimento, além de causar inibição da respiração e da germinação dos esporos (BABICH; STORTZKY, 1978).

Nas doses mais baixas, este metal deve ter sido utilizado para atividades de crescimento, o que pode ter beneficiado o maior desenvolvimento do fungo na fase inicial. Contudo, no decorrer do experimento, foi verificado que o crescimento tornou-se lento para *T. harzianum* nas maiores concentração de sulfato, porém sem interromper o desenvolvimento completo na placa, o mesmo foi totalmente inibido nas maiores dosagens de cloreto de zinco. O fungo *L. gongylophorus* foi totalmente suprimido tanto em cloreto como em sulfato de zinco. Resultados semelhantes foram obtidos por GADD *et al.*, (2001) que averiguaram a diminuição no desenvolvimento dos fungos *Trichoderma viride* e *Rizhopus arrhizus* em presença de zinco e outros metais.

EZZOUHRI *et al.*, 2009 testaram a tolerância de fungos filamentosos do gênero *Alternaria* aos metais Zn, Cr, Cu e Cd, constataram que esse fungo tem capacidade de resistir à toxicidade por metais é devido à presença de diferentes processos de tolerância ou mecanismos de resistência desenvolvidos pelos microrganismos. LÓPEZ & VÁZQUEZ (2003) verificaram que o fungo *Trichoderma atroviride* obtido de uma usina de tratamento de água situado em Madrid (Espanha) era capaz de sobreviver em altas concentrações de metais pesados, tais como: cobre, zinco e cádmio, aparentemente, como resultado da seleção natural de células resistentes. MENDONÇA *et al.*, (2009) averiguaram que o fungo *Aspergillus nidulans* apresentam capacidade de sobrevivência em meios contendo altas concentrações de Cu, Fe e Zn. VALE *et al.*, (2011) constataram que linhagem de *Aspergillus niger* foi mais resistente ao Zn do que ao Cr, entretanto o fungo foi completamente inibido em elevadas concentrações.

Os fungos filamentosos têm se destacado, por apresentar maior resistência a metais pesados, o que proporciona seu crescimento e desenvolvimento em meios que contêm altas concentrações desses poluentes, pois estes possuem mecanismos para o transporte de metais pesados e determinadas proteínas que protegem o organismo dos efeitos tóxicos do metal, ligando-o a enzimas específicas. Podendo ocorrer o transporte do metal através de gradiente quimiosmótico pela membrana citoplasmática de bactérias e fungos, diminuindo seu potencial tóxico GRANJEIRO *et al.*, (2004) e TURPEINEN (2002).

Porém, o fungo cultivado pelos Attini superiores exibe um alto grau de “domesticação”, ou seja, uma série de adaptações para a vida conjunta com os atíneos, sendo assim provavelmente incapaz de se multiplicar na forma de vida livre (SCHULTZ; BRADY, 2008). Devido a esse fato o fungo simbiote de formigas-cortadeiras apresenta crescimento lento em laboratório, fazendo com que depois de semanas de incubação, paralise seu desenvolvimento sem atingir as bordas das placas. O fungo simbiote em condições de laboratório se caracteriza por uma fase de crescimento maior em determinado intervalo, que com o passar do tempo vai se atenuando até que o processo tenda a se estabilizar ou parar o crescimento (SOUZA *et al.*, 2011).

Foram observadas diferentes taxas de crescimento do fungo *T. harzianum* em presença de Zn, indicando que a tolerância do fungo aos metais depende da concentração do metal, pois a quantidade de Zn é maior em cloreto de zinco (47,96%) enquanto sulfato de zinco é menor (40,51%). E da sua capacidade de adaptação, fato que corrobora o estudo de ZAFAR; AQIL & AHMAD (2007), no qual os autores verificaram que a variação na tolerância deve-se a um ou mais tipos de mecanismos de resistência.

Tais mecanismos podem ser produção de enzimas, como a reductase (SRIVASTAVA; THAKUR, 2006), imobilização de metais por formação de complexo, como os quelatos, bioacumulação ou biossorção, entre outros (AHMAD; ZAFAR & AHAMAD, 2005; GUIBAL; ROULPH; LECLOUREC, 1992), não sendo possível identificar o mecanismo de resistência atuante devido à falta de estudos genéticos e moleculares para os fenômenos de tolerância e detoxificação de metais, apresentados por microrganismos.

A presença de metais pode alterar a coloração típica do fungo no período de avaliação, foi notada a mudança de coloração verde para marrom em *T. harzianum*. Foi observado que a linhagem de *Aspergillus niger*, sofreu também clareamento da pigmentação do micélio, em presença de Zn. Tais mudanças são comuns em espécies fúngicas (EZZOUHRI *et al.*, 2009).

GADD (2000) descreve que os fungos apresentam grande capacidade de adaptação à presença de metais pesados no solo, sendo o mecanismo de alteração de pigmentação dos conídios normal em meios acrescidos com metais pesados, este fato é explicado por mutações genéticas e adaptações fisiológicas dos fungos em contato com o metal, pois a capacidade de um organismo sobreviver em condições adversas depende da rapidez de suas respostas fisiológicas as condições ambientais. Essa diferença de morfologia apresentada pelas linhagens pode ser devido à expressão de genes envolvidos no processo de diferenciação celular (FLORES, A. C. *et al.*, 2008).

#### **5.4 Imersão de formigas em solução de sulfato de zinco**

Embora o sistema imune dos invertebrados seja menos complexo que dos vertebrados, uma vez que se baseia unicamente na defesa imunitária inata, muitos componentes são similares a ambos. Por exemplo, a imunidade do inseto é caracterizada pela expressão de uma grande variedade de peptídeos antimicrobianos e são capazes de responder de forma muito eficaz a invasores estranhos, tais como parasitas e patógenos (LAVINE & STRAND, 2002).

As reações celulares que ocorrem na hemolinfa quando os hemócitos circulantes entram em contato com o corpo estranho desencadeiam o processo de fagocitose, agregação, nodulação ou encapsulação. Na hemocele existem vários tipos de hemócitos, mas os granulócitos, os plasmócitos e os coagulócitos são os que participam das defesas celulares e humorais na maioria dos insetos. (GILLESPIE; KANOST & TRENCZEK, 1997).

A resposta imune em insetos pode variar devido ao genótipo (RANTALA & ROFF, 2006), quantidade e qualidade dos alimentos (YANG; RUUHOLA & RANTALA, 2007; YANG *et al.*, 2008), atividade física (AHTIAINEN *et al.*, 2005), sexo

(VAINIO *et al.*, 2004), sinais sexuais secundários (RANTALA *et al.*, 2000), e poluição por metais pesados (SORVARI *et al.*, 2007; VAN OOIK *et al.*, 2008).

Dessa forma, alguns elementos químicos podem interferir na resposta imune de insetos. Por exemplo, metais como arsênico, cádmio e chumbo, afetaram o sistema imune da formiga *Formica aquilonia* (SORVARI *et al.*, 2007). Neste estudo, verificou-se um aumento na capacidade de encapsulação das formigas de acordo com o aumento da concentração desses poluentes até certo ponto, a partir do qual começou a diminuir a capacidade de encapsulação.

Resultados semelhantes foram encontrados quando se administraram doses crescentes dos metais cromo e chumbo a larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae): baixas doses favoreciam a resposta imune, enquanto as doses mais elevadas provocavam uma inibição (WU; YI, 2015)

O zinco é um metal pesado, entretanto é um dos oligoelementos essenciais para nutrição de animais. Esse elemento está envolvido em funções fisiológicas e bioquímicas de mais do que 300 tipos de enzimas e proteínas funcionais como, anidrase carbônica, carboxipeptidase, fosfatase alcalina, desidrogenase alcoólica e ainda é ativador das enzimas DNA e RNA polimerases, as quais são responsáveis no processo de proliferação celular e síntese de proteínas. Em moderada quantidade esse elemento tem um papel importante para manter o metabolismo normal, enquanto pode ser prejudicial quando exceder um nível específico (JIN *et al.*, 2004).

Estudos feitos com *Epirrita autumnata* (Lepidoptera:Geometridae), averiguaram que a resposta de encapsulamento foi maior nos indivíduos que eram alimentados com folhas de bétula (*Betula pubescens*) de uma área contaminada por metais pesados (Fe, Cu, Ni e Zn), do que com folhas de uma área não poluída. (VAN OOIK *et al.*, 2007). Da mesma forma, em um estudo de laboratório, descobriu-se que níveis moderados de poluição melhora a defesa imunitária dos indivíduos, enquanto altos níveis de poluição com metais pesados reduzem a imunidade. Entretanto, a poluição não é a alternativa viável para o decréscimo do sistema imune dos insetos (VAN OOIK *et al.*, 2008).

BISCHOF (1995) constatou que a contaminação por zinco afetou seriamente o metabolismo e a hemolinfa de *Lymantria dispar* (Lepidoptera; Lymantriidae) através de dieta artificial. O glicogênio, hidrato de carbono e lípidos de *L. dispar* foram extremamente reduzidos sob condições de estresse com zinco.

QIANG *et al.*, 2005 encontraram resultados semelhantes, isto é, o aumento na dose de zinco em alimentação artificial em larvas de *Spodoptera liturae* (Lepidoptera: Noctuidae) levou à acumulação de zinco na fase larval, na hemolinfa e na gordura corporal. A apoptose de hemócitos foi induzida em alta concentração de zinco. Apoptose é uma eliminação geneticamente programada de células excedentes e danificadas sem perturbação da homeostase no tecido circundante. Estudos conferiram que a intensidade dos efeitos sobre a apoptose dependia da concentração de zinco nas células e o tempo de exposição ao zinco (LIU *et al.*, 2004).

## 6 CONCLUSÕES

Podemos concluir com a realização desse trabalho que:

1. A utilização de formulações do tipo encapsulado granulado contendo *T. harzianum* e sulfato de zinco apresentaram boa aceitação por parte das colônias;
2. As iscas encapsuladas contendo farelo de trigo como fonte alimentar se mostraram atrativas e viáveis em temperatura controlada de 26°C durante, pelo menos, quatro meses;
3. Apesar das iscas não terem promovido a morte das colônias, elas reduziram o volume do fungo simbiote, desta forma pode-se concluir que novos isolados de fungos antagonistas e outros elementos químicos devem ser testados;
4. Altas doses cloreto de zinco inibem o desenvolvimento de *T. harzianum* e *L. gongylophorus*, enquanto as maiores concentrações de sulfato de zinco inibem o desenvolvimento do fungo simbiote;
5. Altas concentrações de zinco e o maior tempo de exposição a esse metal pesado afeta significativamente o sistema imune de invertebrados.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, I.; ZAFAR, S.; AHAMAD, F. Heavy metal biosorption potencial os *Aspergillus* and *Rizopus sp.* Isolated from wastewater treated soil. **Journal of applied Sciences and Environmental Management**, v.9.p.123-126, 2005.

AHTIAINEN, J. J.; ALATALO, R. V.; KORTET, R. & RANTALA, M. J. A trade-off between sexual signalling and immune function in a natural population of the drumming wolf spider *Hygrolycosa rubrofasciata*. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 18.p. 985–991, 2005.

AMARAL, K. D.; SEIDE, V. E.; DELLA LUCIA, T. M. C. Avaliação da taxa de encapsulação de operárias de formigas-cortadeiras submetidas à dieta a base de Neem. IV Simpósio de Entomologia, 2013. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. Programa de Pós-graduação em Entomologia, UFV. p.14.

ANSARI, T. M.; MARR, I. L.; TARIQ, N. Heavy metals in marine pollution perspective: a mini review. **Journal of Applied Sciences**, v. 4. p. 1-20, 2004.

ARUNAKUMARA, K. K. I. U.; XUECHENG, Z. Heavy metal bioaccumulation and toxicity with special reference to microalgae, **Journal of ocean university of china**, v. 7. p. 60-64, 2008.

AUTUORI, M. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp. – Hymenoptera –Formicidae). II. O sauveiro inicial (*Atta sexdens rubropilosa*, Forel, 1908). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 13. p. 67-86, 1942.

AUTUORI, M. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp. Hymenoptera: Formicidae). Número de formas aladas e redução dos sauveiros iniciais. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 19. p. 325-331, 1950.

AZAMBUJA, P. D.; E. S. GARCIA. Effects of azadirachtin on *Rhodnius prolixus*: immunity and *Trypanosoma* interaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.87.p. 69-72, 1992.

BABICH, H.; STOTZKY, G. Toxicity of zinc to fungi, bacteria and coliphages: Influence of chloride ions. **Applied and environmental microbiology**, v.36, p. 906-914, 1978.

BACCI, M. et al. Biopolymer-degrading bacteria from nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 28. p. 79–82, 1995.

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

BEGON, M., C. R. TOWNSEND & J. L. HARPER. **Ecologia de Indivíduos a Ecossistemas**. 4<sup>a</sup>ed, Artmed, Porto Alegre, 2007.

BELT, T. **The naturalist in Nicaragua**. 2<sup>a</sup>ed, United States of America: The University of Chicago Press, 1874.

BENITEZ, T. et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v.4.p.249-260, 2004.

BISCHOF, C. Effects of heavy metal stress on carbohydrate and lipid concentrations in the haemolymph and total body tissue of parasitized *Lymantria dispar* L. larvae (Lepidoptera), **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.112.p. 87-92, 1995.

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

BOER, S. P. A. et al. Prudent sperm use by leaf-cutter ant queens. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 276, p. 3945-3953, 2009.

BOT. et al. Variable sensitivity of fungi and bacteria to compounds produced by the metapleural glands of leafcutting ants. **Insectes Sociaux**, v.49.p. 363-370, 2002.

BRAGANÇA, M.A.L.; A. TONHASCA JR.; T.M.C. DELLA LUCIA. Reduction in the foraging activity of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* caused by the phorid *Neodohrniphora declinata*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 89. p.305-311, 1998.

BRUGGER, M. S. et al. Avaliação dos efeitos tóxicos de extrato hexânico de *Azadirachta indica* (A. Juss) em colônias de *Acromyrmex rugosus* (Smith, 1858) (Formicidae, Attini). **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 10. p. 235-240, 2008.

BUENO O. C. et al. Utilização de alimentos pelas formigas-cortadeiras. **Insetos Sociais da Biologia à Aplicação**, v.96. p.114-442, 2008.

BÜYÜKGÜZEL, E. et al. Mediate *Galleria mellonella* cellular immune response to viral infection. **Journal Insect Physiol**, v. 53. p. 99-105, 2007.

CABASSI, E. The immune system and exposure to xenobiotics in animals. **Veterinary Research Communications**, v.31.p.115–120, 2007.

CAMARGO, R. S.; FUJIHARA, R. T.; FORTI, L. C. Nest Digging by Leaf-Cutting Ants: Effect of Group Size and Functional Structures. **Psyche**, p.1-4, 2012.

CHAPELA, I. H. et al. Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. **Science**, v.266. p.1691-1695, 1994.

CHET, I.; BENHAMOU, N.; HARAN, S. Mycoparasitism and lytic enzymes. In: Kubicek, C. P.; Harman, G. E. (Org.). *Trichoderma and Gliocladium*. **Taylor and Francis**, v. 2, p. 153–171, 1998

CHET, I., INBAR.; J., HADAR, I. Fungal antagonists and mycoparasites..**The Mycota IV: Environmental and microbial relationships**, v.3. p.165-184,1997.

COUTINHO, L. M. Aspectos ecológicos da saúva no cerrado – a saúva, as queimadas e sua possível relação na ciclagem de nutrientes minerais. **Boletim de Zoologia**, v.8. p.1-9, 1984.

CURRIE, C. R.; STUART, A. E. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. Proceeding of the Royal Society of London. Serie B. **Biological Sciences**, v. 268. p. 1033-1039, 2001.

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

DELLA LUCIA, T. M. C.; FOWLER, H. G. As formigas cortadeiras. (Ed.). As formigas cortadeiras. **Folha de Viçosa**, p.01–03, 1993.

DELLA LUCIA, T.M.C. et al. Criação de formigas-cortadeiras em laboratório. As formigas-cortadeiras. **Folha de Viçosa**, p.262, 1993.

DELLA LUCIA, T. M. C. Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo. **Editora da UFV**, 2011. 419 p.

DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J.-M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology**, v. 52. p. 81-106, 2007.

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

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. **Ciência e Cultura**, v.45. p.142-144, 1993.

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

DOMSCH KH.; GAMS W.; ANDERSON TH. Compendium of soil fungi, **Academic Press**,v.1, 1980.

DUNN, P. E. Biochemical aspects of insect immunity. **Annual Review of Entomology**, v. 31. p. 321-339, 1986.

EZZOUHRI, L. et al. Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, **African journal of microbiology research**, v. 3. p. 35-48, 2009.

FARJI-BRENER, A. G.; GHERMANDI, L. Leaf-cutting ant nests near roads increase fitness of exotic plant species in natural protected areas. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 275, p. 1431–1440, 2008.

FARJI-BRENER, A. G.; GHERMANDI, L. Seedling recruitment in a semi-arid Patagonian steppe: Facilitative effects of refuse dumps of leaf-cutting ants. **Journal of Vegetation Science**, v. 15. p. 823-830, 2004.

FERNANDES, J. B et al. Extrações de óleos de sementes de citros e suas atividades sobre a formiga cortadeira *Atta sexdens* e seu fungo simbiote. **Química Nova**, v.25.p.1091-1095, 2002.

FERNÁNDEZ-MARÍN, H. et al. Active use of the metapleural glands by ants in controlling fungal infection. **Proceeding of the Royal Society of London, Series B**, v. 273. p.1689 -1695, 2006.

FIOLKA, M. J. Immunosuppressive effect of cyclosporin A on insect humoral immune response. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98. p. 287-292, 2008.

FLORES, A. C. et al. Efeito da temperatura na melanização de linhagens de *Aspergillus nidulans*. In: Anais do IX Encontro Paranaense de Genética, 2008.

FOLGARAIT, P. et al. Preliminary *in vitro* insights into the use of natural fungal pathogens of leaf-cutting ants as biocontrol agents. **Current Microbiology**, v.63. p. 250–258, 2011.

FOWLER, H. G. Patterns of colonization and incipient nest survival in *Acromyrmex nigerand Acromyrmex balzani* (Hymenoptera: Formicidae). **Insectes Sociaux**, v. 39. p. 347-350, 1992.

GADD, G. M. Bioremedial potential of microbial mechanism of metal mobilization and immobilization. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, p. 271-279, 2000.

GADD, G. M. et al. Nutritional influence on fungal colony growth and biomass distribution in response to toxic metals, **FEMS Microbiology Letters**, v. 204, p. 311-316, 2001.

GADD, G. M.; RAVEN, J. A. Geomicrobiology of Eukaryotic Microorganisms. **Geomicrobiology Journal**, v.27. p. 491-519. 2010.

GARCIA, E. S.; MACHADO, E. M. M.; AZAMBUJA, P. Effects of eicosanoid biosynthesis inhibitors on the prophenoloxidase-activating system and microaggregation reactions in the hemolymph of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*. **Journal Insect Physiol**, v.50. p. 157-165, 2004.

GARRETTSON M. et al. Diversity and abundance of understory plants on active and abandoned nests of leaf-cutting ants (*Atta cephalotes*) in a Costa Rican rain forest. **Journal Tropical Ecology**, v.14. p.17-26, 1998.

GILLESPIE, J. P.; KANOST, M. R. & TRENCZEK, T. Biological mediators of insect immunity, **Annual Review of Entomology**, v 42.p.611–643,1997.

GRANJEIRO, T. B. et al., Transport genes of *Chromobacterium violaceum*: an overview. **Genetics and Molecular Research**, v.1, p. 117-133, 2004.

GRIGOLETTI JUNIOR, A. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. **Floresta**, v. 30.p. 155-165, 2000.

GUIBAL, E.; ROULPH, C.; LECLOUREC, P. Uranium biosorption by the filamentous fungus *Mucor miechei*, pH effect on mechanisms and performance of uptake, **Water Resource**, v. 26. p. 1139, 1992.

HADAR, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with brean culture of *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v.69 p. 64-68, 1979.

HARMAN, G.E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO M. *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 43-56, 2004.

HAIFIG, S. S. V. Natureza do parasitismo de *Escovopsis* e *Escovopsioides* sobre *Leucoagaricus gongylophorus*, fungos associados aos jardins de formigas cortadeiras. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2014.

HAINES, B. Impact of leaf-cutting ants on vegetation development at Barro Colorado Island. **Tropical Ecological Systems**, p. 99-111, 1975.

HEINLAAN, M.et al. Toxicity of nanosized and bulk Zn, Cu and Ti to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*, **Chemosphere**, v. 71. p. 1308-1316, 2008.

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

HERZ, H. et al. High rate of leaf-cutter ant colony movements in a tropical forest. **Kurzbeiträge zur Tropenökologie** (ed. H. Dalitz, M. Haverkamp, J. Homeier & S. W. Breckle). Bielefelder Ökologische Beiträge, GTÖ, 1998.

HJELJORD, L.G.; STENSVAND, A.; TRONSMO, A. Antagonism of nutriente activated conidia of *Trichoderma harzianum* (atroviride) P1 against *Botrytis cinerea*. **Phytopathology**, v. 91. p. 1172-1180, 2001.

HOFFMAN, J. A. The immune response of *Drosophila*. **Nature**, v. 426. p. 33–38, 2003.

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

HUGHES, W. O. H.; EILENBERG, J.; BOOMSMA, J. J. Trade-offs in group living: transmission and disease resistance in leaf-cutting ants. Proceedings of The Royal Society B: **Biological Sciences**, v. 269. p. 1811–1819, 2002.

ISMAN, M. B. A renaissance for botanical insecticides? **Pest Management Science**, v. 71. p. 1587-1590, 2015.

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

JAROSZ, J. Induction kinetics of immune antibacterial proteins in pupae of *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B. **Comparative Biochemistry**, v. 106. p. 415-421, 1993.

JING, M. Y. et al. Advance in the study of nutrition of trace element zinc. **Chinese Science Bulletin .Indus. (in Chinese)**, v. 25.p.10, 2004.

KAAYA, G. P.; FLYG, C.; BOMAN, H. G. Insect immunity. **Insect Biochemistry**, v. 17. p. 309-315, 1987.

KING, P. et al. Biosorption of zinc onto *Syzygium cumini* L. Equilibrium and kinetic studies, **Chemical Engineering Journal**, v.144, p.181-187,2008.

KLOWDEN, M. J. Physiological systems in insects. 2. ed. **Elsevier Science & Technology Books**, p. 688, 2007.

KUMAR, G. P.; PRASAD, M. N. Cadmium toxicity to *Ceratophyllum demersum* L.: morphological symptoms, membrane damage, and ion leakage. Bulletin of Environmental Contamination. **Toxicology**, v. 72.p. 1038-45, 2004.

LAVINE, M.D.; STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 32, p. 1295-309, 2002.

LAWRENCE, D.A.; MCCABE, M.J.J.R. Immunomodulation by metals. Int. **Immunopharmacol**, v.2.p. 293–302, 2002.

LEWIS, J.A. & PAPAIVIZAS, G.C. Characteristics of alginate pellets formulated with *Trichoderma* and *Gliocladium* and their effect on the proliferation of the fungi in soil. **Plant Pathology**, v. 34.p.571-577, 1985.

LIMA, C.A.; DELLA LUCIA, T.M.C.; GUEDES, R.N.C.; VEIGA, C.E. Desenvolvimento de Iscas Granuladas com Atraves Alternativos Para *Atta bisphaerica* Forel, (Hymenoptera: Formicidae) e sua Aceitação Pelas Operárias. Departamento Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. **Neotropical Entomology**, v.32.p. 497-501, 2003.

LIMA, C.A.; DELLA LUCIA, T.M.C.; OZORIO, T.F. Preferencia de saúvas por plantas oriundas de serapilheira usada para vegetação de áreas degradadas. **Revista Árvore**, v.26. p.93-98, 2002.

LIU, X. M. et al. The molecular mechanism of apoptosis induced by heavy metal, Chin. J. **Cell Biology (in Chinese)**.v. 26.p. 235-240, 2004.

LOPES, C. S. Regulação do desenvolvimento e resposta imune de lagartas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) por *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae). 73 f. Dissertação de Mestrado, ESALQ/USP, Piracicaba, 2008.

LOPES, G. V. C. Efeito do sulfato de cobre e zinco no controle da população de fungos e bactérias do solo que causam intemperismo em arenitos de prédios históricos na Lapa (PR). Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

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

LÓPEZ, E.; VÁZQUEZ, C. Tolerance and uptake of heavy metals by *Trichoderma atroviride* isolated from sludge. **Chemosphere**, v. 50.p. 137-143, 2003.

VALE M, DO S. et al. Efeito da toxicidade de Cr (VI) e Zn (II) no crescimento do fungo filamentososo *Aspergillus niger* isolado de efluente industrial, **Revista Engenharia Sanitária**. v. 16.p. 237-244, 2011.

M, M. MENDONÇA. et al. Avaliação Da Sobrevivência De *Aspergillus nidulans* Em Meios Com Metais Pesados. **Anais do I Seminário Internacional de Ciência, Tecnologia e Ambiente**. UNIOESTE, Cascavel, 2009.

MALIK, A. Metal bioremediation through growing cells, **Environment International**, v.30. p.261-278, 2004.

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

MARSARO JÚNIOR. et al. Efeito de Secreções da Glândula Mandibular de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) Sobre a Germinação de Conídios de *Botrytis cinerea* Pers. Fr. **Neotropical Entomology**, v. 30. p. 403-406, 2001.

MATTOSO, T. C.; MOREIRA, D. D. O.; SAMUELS, R. I. Symbiotic bacteria on the cuticle of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* protect workers from attack by entomopathogenic fungi. **Biology Letters**, v.8. p. 461-464, 2012.

MAYHÉ-NUNES, A. J.; DIEHL-FLEIG, E. Distribuição de *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae) no Rio Grande do Sul. **Acta Biológica Leopoldensia**, v.16. p. 115-118, 1994.

MENEZES, J.P. et al. Toxicologia do biopreparado a base de *Trichoderma sp.* (isolado UFSM T17) administrado em mamífero. **Revista da FZVA**, v.17.p 38–50, 2010.

MICHEREFF FILHO. et al. Micoínseticidas e micoacaricidas no Brasil: como estamos após quatro décadas? **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76. p. 769-779, 2009.

MOUTINHO, P.; NEPSTAD, D.; DAVIDSON, E. Influence of leaf-cutting ant nests on secondary forest growth and soil properties in Amazonia. **Ecology**, v. 84. p.1265-1276, 2003.

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

MUELLER, U. G. et al. The origin of the attine ant-fungus symbiosis. **Quarterly Review Biol**, v.76.p. 169-197, 2001.

NICKELE, M. A. et al. Formigas cultivadoras de fungos: estado da arte e direcionamento para pesquisas futuras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33. p. 53–72, 2013.

NORTH, R. D.; JACKSON, C. W.; HOWSE, P. E. Evolutionary aspects of ant-fungus interactions in leaf-cutting ants. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 12. p. 386– 389, 1997.

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

PAGNOCCA, F. C.; MASIULIONIS, V. E.; RODRIGUES, A. Specialized Fungal Parasites and Opportunistic Fungi in Gardens of Attine Ants. **Psyche**, A Journal of Entomology, v. 2012. p. 1-9, 2012.

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

PERELLÓ, A. et al. Biocontrol efficacy of *Trichoderma* isolates for tan spot of wheat in Argentina. **Crop Protection**,v.22.p. 1099-1106, 2003.

PINTO, L. M. N. et al. Pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from two species of *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 63. p. 301-306, 2003.

QUINLAN, R.J.; CHERRETT, J.M. The role of substrate preparation in the symbiosis between the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) and its food fungus. **Ecological Entomology**, v. 2. p. 161-170, 1977.

QUINLAN, R.J.; CHERRETT, J.M. The role of the fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. **Ecological Entomology**, v. 4. p. 151-160, 1979.

RADHIKA, V.; SUBRAMANIAN, S.; NATARAJAN, K. A. Bioremediation of zinc using *Desulfotomaculum nigrificans*: bioprecipitation and characterization studies. **Water Research**, v. 40. p. 3628-3636, 2006.

RANTALA, M. J. & ROFF, D. A. Analysis of the importance of genotypic variation, metabolic rate, morphology, sex and development time on immune function in the cricket, *Gryllus firmus*. **Journal of Evolutionary Biology**, v.19.p. 834–843, 2006.

RANTALA, M. J et al. Immunocompetence, developmental stability and wingspot size in the damselfly *Calopteryx splendens* L. **Proceedings of the Royal Society of London Series B**, v. 267. p. 2453–2457, 2000.

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

RICKLEFS, R.E. A Economia da natureza. 5. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 498p.

RODRIGUES, A. et al. Assessment of microfungi in fungus gardens free of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 46. p. 329-334, 2005.

RODRIGUES, A. et al. Leaf-cutting ant faecal fluid and mandibular gland secretion: effects on microfungi spore germination. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39. p. 64-67, 2008.

ROLFF, J.; SIVA-JOTHY, M. T. Invertebrate ecological immunology. **Science**, v. 301.p. 472-475, 2003.

RUUHOLA, T.; YANG, S. & RANTALA, M. J. Increase in substrate availability down-regulates PO activity in *Epirrita autumnata*. **Chemoecology**, v. 20.p.11–18, 2010.

SANTOS, A. V.; DE 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**, v.163. p. 233–240, 2007.

SANTOS-OLIVEIRA, M.F.S et al. Toxicity of *Azadirachta indica* to leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v.47. p.423-431, 2006.

SCHIRMBÖCK, M. et al. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics: molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60. p.4364-4370, 1994.

SCHMID-HEMPEL, P. Variation in immune defence as a question of evolutionary ecology. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v.270. p. 357-366, 2003.

SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America, Washington**, v. 105. p. 5435-54401, 2008.

SILVA A. et al. Production of polysaccharidases in different carbon sources by *Leucoagaricus gongylophorus* Möller (Singer), the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens linnaeus*. **Curr Microbiology**, v.53. p. 68–71, 2006a.

SILVA, A. et al. Susceptibility of ant-cultivated fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales: Basidiomycota) towards microfungi. **Mycopathologia**, v. 132. p. 115-119, 2006b.

SILVA, A. et al. Survival of *Atta sexdens* on different food sources. **Journal of Insect Physiology**, v.49. p. 307-313, 2003.

SILVA, M. E.; DIEHL-FLEIG, E. Avaliação de diferentes linhagens de fungos entomopatogênicos para controle da formiga *Atta sexdens piriventris* (Santschi,1919) (Hymenoptera:formicidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 17. p. 263-269, 1988.

SILVA, R. G. X. Controle biológico – Produção massal de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. E seus usos no controle biológico de *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae) (Germar). 69 f. Monografia (Curso de Engenharia Florestal). Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade Regional de Blumenau – FURB. Blumenau, 2007.

SIQUEIRA, C. G. et al. Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64. p. 4820-4822, 1998.

SORVARI, J. et al.. Heavy metal pollution disturbs immune response in wild ant populations. **Environmental Pollution**, v.145.p.324-328,2007.

SOUZA, M. D. et al. Análise de agrupamento e regressão não-linear aplicados ao crescimento in vitro de *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller em meios de cultura acrescido com diferentes extratos vegetais. **Biotemas**, v.24.p.83-91, 2011.

SRIVASTAVA, S.; AHMAD, A. H.; THAKUR. I. S. Removal of chromium and pentachlorophenol from tannery e Zuents, **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1128-1132, 2006.

STRAND, M. R. The insect cellular immune response. **Insect Science**, v. 15. p.1–14, 2008.

TEREZAN, A. P. et al. Isolamento das substâncias do Extrato Bioativo obtido dos galhos de *Spiranthera odoratissima* St. Hil. **Systematics and Ecology**, v.31. p.805-807, 2003.

TURPEINEN, R. Interactions between metals, microbes and plants remediation of arsenic and lead contaminated soils. Dissertação de Mestrado em Ecologia e Ciência Ambiental – University of Helsinki, 2002.

VAINIO, L. et al. Individual variation in immune function in the ant *Formica exsecta*; effects of the nest, body size and sex. **Evolutionary Ecology**, v 18.p. 75–84, 2004.

VALIX, M.; LOON, L. O. Adaptive tolerance behavior of fungi in heavy metals, **Minerals Engineering**, v. 16. p. 193-198, 2003.

VAN BAEL, S. A. et al. Two fungal symbioses collide: endophytic fungi are not welcome in leaf-cutting ant gardens. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 276. p. 2419–2426, 2009.

VAN OOIK, T.; PAUSIO, S. & RANTALA, M. J. Direct effects of heavy metal pollution on the immune function of a geometrid moth, *Epirrita autumnata*. **Chemosphere**, v. 71.p. 1840–1844, 2008.

VAN OOIK, T.; RANTALA, M. J. & SALONIEMI, I. Diet-mediated effects of heavy metal pollution on growth and immune response in the geometrid moth *Epirrita autumnata*. **Environmental Pollution**, v 145.p. 348–354, 2007.

VINALE, F.; SILVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E.L.; MARRA, R.; WOOS, L.; LORITO, M. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40. p. 1-10, 2008.

VIRGA, R. H. P.; GERALDO, L. P. & SANTOS, F. H. Avaliação de contaminação por metais pesados em amostras de siris azuis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27. p. 779-785,2007.

WOOS, L.; LORITO, M. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. **Soil Biology and Biochemistry**, v.40.p.1-10, 2008.

WARD, P. S. et al. The evolution of myrmicine ants: phylogeny and biogeography of a hyperdiverse ant clade (Hymenoptera: Formicidae). **Systematic Entomology**, v.40. p.61-81, 2015.

WEBER, N. A. Gardening-ants: The attines. Philadelphia: **American Philosophical Society**, 146 p, 1972.

WILSON, E. O. Caste and division of labor in leafcutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*) I. The overall pattern in *A. sexdens*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 7. p.143-156, 1980.

WU, G.; YI, Y. Effects of dietary heavy metals on the immune and antioxidant systems of *Galleria mellonella* larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C. Toxicology & Pharmacology*, v. 167, p. 131-139, 2015.

X, QIANG .et al. Apoptosis of *Spodoptera litura* larval hemocytes induced by heavy metal zinc. **Chinese Science Bulletin**, v. 50. p. 2856-2860, 2005.

YANG, S. Y. et al. Effects of host plant shift on immune and other key life history traits of an eruptive Geometrid, *Epirrita autumnata* (Borkhausen). **Ecological Entomology** v. 33. p. 510–516, 2008.

YANG, S. Y.; RUUHOLA, T. & RANTALA, M. J. Impact of starvation on immune defense and other life-history traits of an outbreaking geometrid, *Epirrita autumnata*: a possible causal trigger for the crash phase of population cycle. **Annales Zoologici Fennici**, v. 44.p. 89–96, 2007.

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

ZAFAR, S.; AQIL, F.; AHMAB, I. Metal tolerance and biosorption potencial of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil, **Bioresource Technology**, v. 98. p. 2557- 2561, 2007.

ZANETTI, R. Estimativa do nível de dano econômico causado por formigas cortadeiras em eucaliptais. 1998. 87f. Tese (Doutorado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.

ZANETTI R. et al. Level of economic damage for leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in Eucalyptus plantations in Brazil. **Sociobiology**, v. 42. p. 433-442, 2003.

ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J.C.; SOUZA-SILVA, A. Eficiência de isca formicida aplicada sobre o monte de terra solta de ninho de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Árvore**, v.27. p.407-410, 2002.



