Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Comportamentos de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) na presença de diferentes propágulos dos fungos *Beauveria bassiana* e *Trichoderma longibrachiatum*

Barbara Castelano Santos

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2023

Barbara Castelano Santos
Bacharela em Engenheira florestal

Comportamentos de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) na presença de diferentes propágulos dos fungos *Beauveria bassiana* e *Trichoderma longibrachiatum*

versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **ITALO DELALIBERA JUNIOR**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Santos, Barbara Castelano

Comportamentos de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) na presença de diferentes propágulos dos fungos *Beauveria bassiana* e *Trichoderma longibrachiatum* /Barbara Castelano Santos. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2023.

79 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Formigas-cortadeiras 2. Fermentação submersa 3. Controle microbiano 4. Atratividade I. Título

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus.

Em especial, agradeço ao meu orientador Professor Dr. Italo Delalibera Júnior, pelas oportunidades, ensinamentos, orientação e formação profissional.

Agradeço ao Dr. Thalles Mattoso por todo suporte, apoio e ideias para execução deste projeto.

Agradeço ao Dr. Fernando Sujimoto pela parceria, didática e auxílio necessário à realização do trabalho.

À equipe do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano, principalmente à Sara e Taísa, pela amizade.

Obrigada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) e ao Departamento de Entomologia e Acarologia por toda estrutura.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a minha família, que sempre acreditam em mim e apoiam incondicionalmente meus sonhos.

E ao Pedro, meu namorado, por todo carinho, amor, admiração, compreensão e por comemorar comigo cada conquista.

Por fim, agradeço à CAPES pela bolsa de estudos fornecida.

EPÍGRAFE

A fé é o que aproxima o sonho à realidade.

SUMÁRIO

RESUMO.....7

ABSTRACT 8

1 INTRODUÇÃO 9

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 11

2.1 Formigas-cortadeiras 11

2.2 Sistema de defesa de formigas-cortadeiras contra invasão por microrganismos 12

2.3 *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) 13

2.4 Fungos entomopatogênicos e micoparasitas.....14

2.5 *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae) 16

2.6 *Trichoderma* spp. (Hypocreales: Hypocreaceae).....18

2.7 Voláteis produzidos por fungos.....20

3 MATERIAL E MÉTODOS 23

3.1 Coleta e manutenção de colônias de *Atta sexdens rubropilosa* 23

3.2 Isolados fúngicos 23

3.3 Produção de propágulos via fermentação submersa.....24

3.4 Coleta de COV's fúngicos e análise química por cromatografia gasosa 25

3.5 Coleta de compostos fúngicos não voláteis.....26

3.6 Bioensaios 26

3.6.1 Atratividade de operárias de *A. sexdens rubropilosa* aos compostos fúngicos voláteis.....26

3.6.2 Atratividade de operárias de *A. sexdens rubropilosa* aos compostos fúngicos não voláteis.....*29*

3.6.3 Atratividade de operárias de *A. sexdens rubropilosa* às estruturas fúngicas *31*

3.6.4 Preferência de operárias de *A. sexdens* rubropilosa aos propágulos de *B. bassiana* *31*

3.6.5 Comportamentos de *A. sexdens rubropilosa* em contato com estruturas fúngicas *31*

3.6.6 Sobrevivência de *A. sexdens rubropilosa* expostas aos propágulos fúngicos de *B. bassiana* *32*

3.6.7 Microscopia eletrônica de varredura.....*33*

3.7 Análise Estatística 34

4 RESULTADOS 37
4.1 Atratividade de *A. sexdens rubropilosa* aos compostos fúngicos voláteis..... 37
4.2 Atratividade de *A. sexdens rubropilosa* aos compostos fúngicos não voláteis 40
4.3 Atratividade de *A. sexdens rubropilosa* às estruturas fúngicas 41
4.4 Preferência de *A. sexdens rubropilosa* aos COVs, não voláteis e estruturas de *B. bassiana* 43
4.5 Comportamentos higiênicos de *A. sexdens rubropilosa* em contato com propágulos fúngicos 44
4.6 Sobrevivência de *A. sexdens rubropilosa* expostas aos propágulos fúngicos de *B. bassiana* 46
4.7 Microscopia eletrônica de varredura 47
4.8 Compostos orgânicos voláteis fúngicos 49
5 DISCUSSÃO..... 53
6 CONCLUSÕES..... 67
REFERÊNCIAS 69

RESUMO

Comportamentos de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) na presença de diferentes propágulos dos fungos *Beauveria bassiana* e *Trichoderma longibrachiatum*

As formigas-cortadeiras causam danos de grandes proporções em várias culturas, e são consideradas pragas-chave da silvicultura. A homeostase das colônias de formigas-cortadeiras é constantemente ameaçada devido à exposição a grande diversidade de fungos invasores. Consequentemente, esses insetos sociais desenvolveram a capacidade de reconhecer e neutralizar fungos entomopatogênicos e micoparasitas de seus jardins de fungo mutualista. O reconhecimento e emprego de estratégias de defesas contra a invasão se dá por meio da detecção de sinais químicos como compostos voláteis e não voláteis emitidos pelos fungos, bem como pelo contato físico com os propágulos. Grande parte das defesas empregadas se devem aos comportamentos higiênicos "self-grooming", "allo-grooming" e "weeding" promovidos por operárias, que são importantes para prevenir e impedir a expansão da disseminação. Tais estratégias de defesa são um dos principais entraves ao uso de controle microbiano em formigas-cortadeiras. Contudo, o comportamento das formigas-cortadeiras na presença de propágulos fúngicos incomuns no interior de ninhos, como blastosporos e microescleródios, ainda não é conhecido. Diante do exposto, a atratividade de diferentes propágulos fúngicos e seus compostos voláteis e não voláteis oriundos de blastosporos de *Beauveria bassiana*, microescleródios (MS) de *T. longibrachiatum* e conídios de ambos os fungos foi avaliada para operárias de *Atta sexdens rubropilosa*. Quando constatada tendência de atratividade, os propágulos foram contrastados em testes de preferência e seus compostos voláteis foram analisados por cromatografia gasosa. Os resultados sugerem que os compostos voláteis e não voláteis oriundos de blastosporos de *B. bassiana* foram atrativos às operárias de *A. sexdens rubropilosa*. Os compostos voláteis liberados por conídios de *B. bassiana* também demonstraram uma tendência à atratividade, e foram preferidos em relação aos blastosporos, possuindo em seu perfil cromatográfico maior diversidade de constituintes atrativos. Quando as operárias tiveram a oportunidade de contato com os propágulos frescos, nenhuma alteração em seu comportamento foi observada e a mesma proporção de discos foliares impregnados ou livre de propágulos fúngicos foi carregada pelas operárias, com exceção dos discos tratados com MS de *T. longibrachiatum* que foi considerado não atrativo às operárias. Além disso, a virulência de blastosporos foi comparada com conídios de *B. bassiana* para *A. sexdens rubropilosa* e foi possível constatar que os blastosporos foram capazes de infectar e matar rapidamente operárias de saúva com eficiência comparável aos conídios aéreos, bem como, as formigas empregaram significativamente menos "self-grooming" quando em contato com blastosporos em comparação aos conídios do mesmo fungo. Por último, o padrão de deposição desses dois tipos de propágulos produzidos por *B. bassiana* na cutícula de operárias da saúva foram comparados em imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e revelaram uma quantidade maior de blastosporos depositados ao tegumento das operárias, mesmo após períodos realizando comportamentos higiênicos. Levando em consideração a atratividade e virulência dos blastosporos e conídios de *B. bassiana*, esses propágulos foram considerados potenciais agentes de controle para *A. sexdens rubropilosa*. Contudo, os blastosporos oferecem vantagens ao controle de pragas devido a produção em fermentação submersa, mais rápida e padronizada, em comparação ao método de fermentação em substrato sólido usado para produção de conídios aéreos.

Palavras-chave: Formigas-cortadeiras, Fermentação submersa, Controle microbiano, Atratividade.

ABSTRACT

Behaviors of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) in the presence of different propagules of the fungi *Beauveria bassiana* and *Trichoderma longibrachiatum*

Leaf-cutting ants cause major damage in various crops and are considered key pests of silviculture. The homeostasis of the colonies of leaf-cutting ants is constantly threatened due to exposure to a great diversity of invasive fungi. Consequently, these social insects have developed the ability to recognize and neutralize entomopathogenic and mycoparasitic fungi from their mutualist fungus gardens. The recognition and use of defense strategies against invasion takes place through the detection of chemical signals as volatile and non-volatile compounds emitted by fungi, as well as physical contact with propagules. Much of the defenses employed are due to hygienic behaviors self-grooming, allo-grooming and weeding promoted by the worker ants, which are important to prevent and stop the spread of infection. Such defense strategies are the main obstacles in the use of microbial control in leaf-cutting ants. However, the behavior of leaf-cutting ants in the presence of unusual fungal propagules inside nests such as blastospores and microsclerotia (MS) is not yet known. Given the above, the attractiveness of different fungal propagules and their volatile and non-volatile compounds derived from blastospores of *Beauveria bassiana*, MS of *T. longibrachiatum* and conidia of both fungi was evaluated for workers of *Atta sexdens rubropilosa*. When at least one trend to attractiveness was observed, the propagules were contrasted in preference tests and their volatile compounds were analyzed by gas chromatography. The results suggest that the volatile and non-volatile compounds derived from *B. bassiana* blastospores were attractive to the workers of *A. sexdens rubropilosa*. The volatile compounds released by *B. bassiana* conidia also demonstrated a tendency to attractiveness, and were preferred in relation to blastospores, having in their chromatographic profile greater diversity of attractive constituents. When workers had the opportunity to contact fresh propagules, no change in their behavior was observed and the same proportion of leaf discs impregnated or free of fungal propagules was carried by the workers, except for the discs treated with *T. longibrachiatum* MS that was considered unattractive to the workers. In addition, blastospore virulence was compared with *B. bassiana* conidia for *A. sexdens rubropilosa* and it was possible to observe that blastospores were able to infect and quickly kill workers with efficiency comparable to conidia, as well as ants performed significantly less self-grooming when in contact with blastospores compared to conidia of the same fungus. Finally, the standard of deposition of these two different propagules produced by *B. bassiana* in the cuticle of workers were compared in scanning electron microscopy (SEM) images and revealed a greater amount of blastospores deposited at the integument of the workers, even after periods performing hygienic behaviors. Considering the attractiveness and virulence of *B. bassiana* blastospores and conidia, these propagules were considered potential control agents for *A. sexdens rubropilosa*. Blastospores offer advantages to pest control due to faster and more standardized submerged fermentation production than the solid substrate fermentation method used for conidia production.

Keywords: Leaf-cutting ants, Submerged fermentation, Microbial Control, Attractiveness.

1 INTRODUÇÃO

As saúvas, formigas-cortadeiras do gênero *Atta* (Hymenoptera: Formicidae), são insetos sociais que utilizam como substrato folhas de importantes culturas para cultivo de seu fungo mutualista *Leucoagaricus gongylophorus* (BICH et al., 2017; BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES; SANHUDO, 2011; MUELLER et al., 2010). Devido ao hábito de cortar folhas, as formigas-cortadeiras, especialmente *A. sexdens rubropilosa*, são consideradas pragas em muitas plantas cultivadas (GALLO et al., 2002) e pragas-chave na silvicultura (BOARETTO; FORTI, 1997)

O grande número de indivíduos nas sociedades de formigas-cortadeiras, o constante contato com o solo e o cultivo de uma única espécie de fungo mutualista tornam os indivíduos e os jardins de fungo altamente expostos a fungos invasores e, consequentemente, a um aumento do risco de contaminação (ALVES, 1998). Com isso, o controle microbiano com fungos entomopatogênicos e micoparasitas do fungo mutualista é uma alternativa promissora (LOPEZ; ORDUZ, 2003) ao controle químico, que é amplamente empregado no controle de formigas-cortadeiras atualmente (ZANETTI et al., 2014). Dentre os candidatos potenciais, o entomopatógeno *Beauveria bassiana* (CASTILHO et al., 2010; LOUREIRO; MONTEIRO, 2005) e espécies micoparasitas do gênero *Trichoderma* (CASTRILLO et al., 2016; DO NASCIMENTO et al., 2017; ORTIZ; ORDUZ, 2001) têm sido os mais estudados para o controle dessas pragas. Esses fungos produzem diferentes propágulos a depender do processo fermentativo, os quais apresentam vantagens no uso em relação aos conídios aéreos, que é o principal propágulo utilizado nos produtos comerciais à base de fungos (KOBORI et al., 2015; MASCARIN; JARONSKI, 2016). No entanto, as formigas-cortadeiras reconhecem e desencadeiam estratégias de defesa contra a presença de conídios de fungos invasores por meio do contato ou detecção de compostos voláteis e/ou produtos químicos da superfície dos microrganismos que são distintos do perfil químico de suas colônias (GOES et al., 2020).

De fato, a detecção de parasitas fúngicos pelos insetos parece contribuir na proteção contra infecções (YANAGAWA et al., 2012). No entanto, as respostas das colônias de formigas aos propágulos infecciosos são altamente variáveis (PEREIRA; DETRAIN, 2020), podendo variar entre evitação de superfícies contaminadas por fungos (JACCOUD; HUGHES; JACKSON, 1999), à atração e preferência por

construir seus ninhos em solos com alta incidência de fungos (BRÜTSCH et al., 2014; LECLERC; PINTO SILVA; DETRAIN, 2018). Além disso, a resposta comportamental depende do índice de virulência dos patógenos (MBURU et al., 2009), mas também se as formigas entraram em contato com os propágulos ao longo da vida (GOES et al., 2020; TRANTER et al., 2015).

Embora as formigas possuam a capacidade de detectar conídios de fungos a longas distâncias e adaptar as estratégias de defesa na presença desses propágulos (GOES et al., 2020; QIU et al., 2014; WALKER; HUGHES, 2009), é bastante improvável que as operárias entrem em contato com microescleródios e blastosporos em condições naturais. Nesse sentido, o reconhecimento e comportamento das formigas-cortadeiras em contato com essas estruturas ainda são amplamente desconhecidos.

As estratégias de defesa empregadas pelas formigas-cortadeiras têm sido apontadas como um dos principais entraves no controle microbiano de formigas-cortadeiras (TRAVAGLINI et al., 2018), exigindo-se a compreensão de como elas interagem com os microrganismos (ROCHA et al., 2017). Além disso, é desejável que potenciais agentes de controle de formigas-cortadeiras apresentem baixa rejeição ou até mesmo sejam atrativos às operárias (BRITTO et al., 2016; DELLA LUCIA et al., 1992). Com isso, o objetivo do presente trabalho é avaliar o reconhecimento, atratividade e comportamentos de defesa empregados por operárias de *A. sexdens rubropilosa* em contato com blastosporos, microescleródios e conídios aéreos de fungos parasitas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Formigas-cortadeiras

As formigas-cortadeiras, conhecidas popularmente como quenquéns e saúvas, são himenópteros eussociais pertencentes à família Formicidae, tribo Attini, subtribo Attina e aos gêneros *Acromyrmex* spp. e *Atta* spp., respectivamente (BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES; SANHUDO, 2011). São espécies nativas e de ocorrência exclusiva do continente americano, distribuídas desde os Estados Unidos até a Argentina (DELABIE et al., 2011).

Essas formigas mantêm um antigo mutualismo obrigatório com fungos basidiomicetos que cultivam como alimento (MUELLER et al., 2010). Vários autores relataram que o fungo cultivado pertence à família Agaricaceae e trata-se da espécie *Leucoagaricus gongylophorus*, que é a principal fonte alimentar para as larvas e a rainha (BICH et al., 2017; MIKHEYEV; MUELLER; ABBOT, 2006; SILVA-PINHATI et al., 2004). Para o cultivo do fungo, as operárias cortam folhas frescas de algumas espécies de plantas preferidas, transportam para o interior do ninho e processam em fragmentos menores que são incorporados ao fungo e usados como substrato (GARRETT et al., 2016).

Devido ao hábito de cortar folhas, as formigas-cortadeiras são consideradas pragas severas em muitas plantas cultivadas (GALLO et al., 2002). Em florestas plantadas de *Pinnus* e de *Eucalyptus*, são consideradas as principais pragas, especialmente nas fases de muda ou no início da condução de brotação (BOARETTO; FORTI, 1997). Os danos causados por essas formigas atingem grandes proporções, no entanto, são difíceis de mensurar. A maioria das estimativas de danos é fornecida pelo setor florestal, em que 30% dos custos de manejo são atribuídos ao monitoramento e controle de formigas (DELLA LUCIA; AMARAL, 2020).

Para evitar os danos causados por tal praga, medidas de controle químico têm sido predominantemente empregadas. Porém, o uso de ingredientes ativos químicos relativamente eficientes no controle de formigas é restringido por órgãos de certificação florestal (ZANUNCIO et al., 2016). Com isso, é imprescindível que novas alternativas de controle sejam desenvolvidas. Nesse sentido, o atual investimento em novas tecnologias de controle biológico apresenta boas perspectivas no manejo desses insetos sociais (ZANETTI et al., 2014).

Visando um método de controle alternativo, o controle biológico de formigas-cortadeiras é uma boa estratégia. Dentre os agentes biológicos, os fungos são os inimigos mais promissores, incluindo nesse grupo os entomopatogênicos e antagonistas do fungo mutualista (DAZA et al., 2019; FOLGARAIT; GOFFRÉ, 2021; LOPEZ; ORDUZ, 2003).

2.2 Sistema de defesa de formigas-cortadeiras contra invasão por microrganismos

Características da vida em sociedade como alta densidade de indivíduos e frequente contato entre eles aumentam o risco de contaminação e disseminação de patógenos, o que favorece o uso de controle microbiano (ALVES, 1998). Além disso, a proximidade com o solo e o forrageamento de substrato vegetal são ameaças à homeostase das colônias devido a exposição a grande diversidade de microrganismos que habitam essas superfícies (PAGNOCCA; RODRIGUES; BACCI, 2011). Adicionalmente, as formigas cultivam uma única linhagem de fungo mutualista de forma axênica (POULSEN; BOOMSMA, 2005), consequentemente, a falta de diversidade genética nos jardins de fungos aumenta a sua suscetibilidade a infecções por parasitas (RODRIGUES et al., 2008).

Consequentemente, as formigas-cortadeiras desenvolveram uma série de defesas comportamentais e fisiológicas que previne ou reduz a contaminação de seus ninhos por entomopatógenos e micoparasitas (NILSSON-MØLLER; POULSEN; INNOCENT, 2018). Dentre as estratégias de defesa, merecem destaque as atividades de limpeza desempenhadas pelos indivíduos da colônia denominada como *grooming,* que é dividida entre *self-grooming* (autolimpeza) e *allogrooming* (limpeza coletiva) (HOLLDOBLER; WILSON, 1990). O *self-grooming* consiste no comportamento da formiga limpar o próprio corpo através do movimento de esfregar principalmente as pernas pelos aparelhos bucais, removendo partículas e potenciais patógenos com a glossa. Já o *allogrooming* é desempenhado de forma mútua pelos companheiros de ninho, que podem inspecionar todo o corpo de um indivíduo e realizam a limpeza apenas se necessário (NILSSON-MØLLER; POULSEN; INNOCENT, 2018).

Outros mecanismos de prevenção contra microrganismos invasores são seleção e limpeza apuradas do substrato coletado, associações com microrganismos (CURRIE; MUELLER; MALLOCH, 1999) e produção de secreções

glandulares com compostos antimicrobianos (BOT et al., 2002). De forma complementar, o polietismo, que se trata da divisão de tarefas entre os indivíduos, o gerenciamento e descarte de resíduos e a própria estrutura do ninho evitam o contato com microrganismos perigosos (HART; RATNIEKS, 2001).

Além de medidas profiláticas, as formigas-cortadeiras possuem comportamentos que são respostas específicas à presença de patógenos fúngicos infectando seus jardins. As operárias separam e removem com a mandíbula grandes pedaços de jardim de fungos infectados e os depositam longe do jardim ou diretamente na câmara de resíduos (CURRIE; STUART, 2001). Essa remoção física de contaminantes microbianos por operárias é um comportamento geralmente referido como "*weeding*" (CURRIE; STUART, 2001).

No entanto, muitos microrganismos são capazes de superar essas estratégias de defesa e, por isso, são encontrados no interior dos ninhos (RODRIGUES et al., 2008; VAN BAEL et al., 2009). Grande diversidade de fungos, especialmente aqueles que habitam o solo e superfície das plantas coexistem também nos formigueiros. Alguns deles são parasitas oportunistas e tornam-se uma ameaça em condições de desequilíbrio dos ninhos (RODRIGUES et al., 2005).

2.3 *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae)

O gênero *Atta* spp. é composto por cerca de 15 espécies identificáveis (BARRERA et al., 2022). Dessas, *Atta sexdens* possui três subespécies, dentre elas, *Atta sexdens rubropilosa* possui maior importância econômica e maior distribuição pelo Brasil, onde é considerada a principal praga da silvicultura (DELLA LUCIA, 2003).

Morfologicamente*, A. sexdens rubropilosa* apresenta cabeça sem brilho e com pelos de coloração vermelha. Esta espécie causa danos especialmente em áreas reflorestadas, como *Eucalyptus* e *Pinus*, mas também em outras culturas. Estas saúvas constroem seus ninhos profundos e com grandes dimensões no solo e em locais sombreados, compostos por uma grande quantidade de câmaras subterrâneas especializadas (MARICONI, 1970). Essas características de morfogênese dos ninhos, aumentam a dificuldade de realizar o controle efetivo de formigueiros desta espécie (DELLA LUCIA; GANDRA; GUEDES, 2014).

A espécie possui um repertório ainda mais complexo de estratégias de defesa para evitar contaminação de seus ninhos por microrganismos. No interior da

colônia, a disposição dos resíduos é feita em câmaras distintas e isoladas das câmaras em que se encontram os jardins de fungo (LACERDA et al., 2010). Além disso, *A. sexdens rubropilosa* pode apresentar partição de tarefas no transporte de resíduos dos jardins de fungos para a câmara de lixo. Nesse caso, o lixo não é transferido diretamente para o monte de lixo final e, sim, uma operária deposita o resíduo sobre um pequeno monte secundário de lixo e, posteriormente, outra operária coleta e transfere para o monte principal, minimizando assim o contato com a câmara de dejetos (SOUZA et al., 2007). Outra característica peculiar aos ninhos desta subespécie é a presença de bactérias (*Burkholderia* sp.) produtoras de antibióticos (SANTOS et al., 2004). Essas secreções antimicrobianas podem ser utilizadas pelas formigas para inibir uma série de fungos entomopatógenos, o que provavelmente desempenha um papel significativo na defesa contra infecções (FRANCOEUR et al., 2021).

2.4 Fungos entomopatogênicos e micoparasitas

Os fungos entomopatogênicos, especialmente aqueles pertencentes ao filo Ascomycota e ordem Hypocreales, têm se mostrado uma estratégia promissora no controle de formigas-cortadeiras (TRAVAGLINI et al., 2018). Dentre os entomopatógenos, *B. bassiana* tem sido mais amplamente estudada para o controle desta praga.

Os fungos entomopatogênicos são microrganismos capazes de causar doenças aos insetos, o que geralmente resulta na morte de seus hospedeiros (STEINHAUS; MARTIGNONI, 2006). Eles são generalistas e capazes de infectar ampla variedade de insetos e os relatos de entomopatógenos colonizando operárias de formigas-cortadeiras são comuns (DIEHL-FLEIG et al., 1992; GOFFRÉ et al., 2018).

O processo de infecção ocorre predominantemente por meio da penetração do fungo através da cutícula do inseto e aberturas naturais (SINHA; CHOUDHARY; KUMARI, 2016). O início da invasão acontece a partir da adesão de propágulos fúngicos no tegumento do hospedeiro. Uma vez aderido, o propágulo germina e penetra na cutícula atingindo a hemocele. No interior do inseto, ocorre a colonização do hospedeiro pelo fungo por meio do crescimento em forma de blastosporos unicelulares, que são estruturas de crescimento rápido leveduriforme e mais dificilmente reconhecidas pelo sistema imune do hospedeiro. Ainda, pode ocorrer a

produção de micotoxinas que aceleram a morte do hospedeiro. Em condições adequadas, a conidiogênese encerra o processo de infecção, através da extrusão de hifas para o exterior do cadáver o que permite a disseminação e contaminação de novos hospedeiros (ALVES, 1998; GOETTEL; GLARE, 2005).

Os entomopatógenos desempenham um papel importante na regulação das populações de artrópodes em ecossistemas naturais e monoculturas (GOETTEL; GLARE, 2005). São um dos mais importantes agentes de mortalidade natural para as rainhas de *Atta* na fase de fundação dos formigueiros (ALVES, 1998; ALVES; SOSA GÓMEZ, 1983; RODRIGUES et al., 2010). Em laboratório, a patogenicidade e virulência de diversos fungos foram mostradas para operárias de formigas-cortadeiras (CARDOSO, 2010; GOFFRÉ et al., 2018; GOFFRÉ; FOLGARAIT, 2015; JACCOUD; HUGHES; JACKSON, 1999; LOUREIRO; MONTEIRO, 2005; RIBEIRO et al., 2012) e para outras castas (ALVES; SOSA GÓMEZ, 1983), mas em campo os resultados permanecem insatisfatórios ou inconsistentes (TRAVAGLINI et al., 2018).

Visto a importância dos fungos em causar epizootias e reduzir a sobrevivência de insetos danosos à agricultura, várias espécies foram produzidas e formuladas como inseticidas e são usadas por meio de aplicações inundativas para o controle microbiano de pragas (ZIMMERMANN, 2007). No caso de formigas-cortadeiras, iscas granuladas atrativas formuladas com entomopatógenos têm sido utilizadas e resultados promissores revelam que esse pode ser um veículo adequado para aplicação de fungos em formigueiros (CARDOSO et al., 2012; LOPEZ; ORDUZ, 2003). No entanto, é necessária a adição de atrativos que dificultem o reconhecimento do patógeno pelas formigas e consequentemente impeçam a rejeição da isca (CARDOSO et al., 2012).

Em relação aos micoparasitas, esses possuem a capacidade de parasitar outros fungos. Eles atuam enrolando-se ao redor das hifas do hospedeiro e, em seguida, causam a dissolução das células do fungo parasitado, além de competir por espaço e nutrientes (HOWELL, 2003). Preparações à base de micoparasitas têm sido comercializadas em todo o mundo e usadas para proteção de cultivos, com ênfase em controle de fitopatógenos para o manejo de doenças (WOO et al., 2014). Novos usos potenciais de micoparasitas para o controle biológico têm sido claramente demonstrados, inclusive como antagonista de fungos mutualistas de insetos-praga (VEGA et al., 2009).

Nesse sentido, alguns desses micoparasitas têm sido considerados potenciais candidatos ao controle de formigas-cortadeiras, devido à sua atividade antagônica e capacidade de parasitismo do fungo cultivado (CURRIE; MUELLER; MALLOCH, 1999; LOPEZ; ORDUZ, 2003; ORTIZ; ORDUZ, 2001). Numerosos estudos mostraram inibição do crescimento de *L. gongylophorus* por fungos filamentosos (BIZARRIA et al., 2018; CASTRILLO et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2017; ORTIZ; ORDUZ, 2001; SILVA et al., 2006). Nessa perspectiva, destacam-se espécies de *Trichoderma e Escovopsis* (CURRIE; MUELLER; MALLOCH, 1999).

Em linhas gerais, patógenos fúngicos e micoparasitas podem ser usados isoladamente ou em conjunto como ingrediente ativo para o desenvolvimento de produtos biológicos específicos, eficazes e econômicos. Embora haja muitos desafios a serem superados no que diz respeito ao controle microbiano de formigas-cortadeiras, estudos demonstraram o potencial desses fungos de infectar as formigas e seu fungo mutualista e controlar os formigueiros de forma promissora (DAZA et al., 2019; LOPEZ; ORDUZ, 2003). Além disso, esses microrganismos possuem compatibilidade com as técnicas de aplicação convencionais e estão bem adaptados às condições microclimáticas dentro dos formigueiros (LOPEZ; ORDUZ, 2003).

2.5 *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Clavicipitaceae)

Dentre as várias espécies do gênero *Beauveria*, *B. bassiana* é a espécie entomopatogênica mais notável (ZIMMERMANN, 2007). Possui ampla distribuição geográfica e pode ser encontrada no solo, insetos e tecidos vegetais (REHNER et al., 2011). A gama de hospedeiros utilizados pelo parasita fúngico abrange pragas agrícolas e florestais economicamente importantes (MAISTROU et al., 2020), incluindo formigas-cortadeiras (HUGHES; EILENBERG; BOOMSMA, 2002; JACCOUD; HUGHES; JACKSON, 1999).

Os conídios aéreos são o principal propágulo infeccioso de *B. bassiana*, no entanto, o entomopatógeno pode produzir diferentes estruturas fúngicas, entre elas, células vegetativas de aspecto leveduriforme que são denominados blastosporos, hifas e conídios submersos (HOLDER; KEYHANI, 2005; MASCARIN; JARONSKI, 2016). Os blastosporos são formados naturalmente na hemolinfa do hospedeiro durante a colonização e multiplicação do patógeno, mas também é possível a produção dessas células por meio de fermentação submersa (MASCARIN et al.,

2015a), que em alguns casos são ainda mais infectivos que os conídios aéreos (CORRÊA et al., 2020; HOLDER et al., 2007; MASCARIN et al., 2015a).

Atualmente, existem disponíveis no mercado inseticidas biológicos formulados à base de *B. bassiana* para o controle microbiano de diversas pragas agrícolas (SULLIVAN; PARKER; SKINNER, 2022). Assim como para o controle de outros insetos, resultados obtidos em condições de laboratório evidenciam que o controle biológico de formigas-cortadeiras com fungos entomopatogênicos pode ser bem-sucedido. Isto seria possível uma vez que, em colônias de formigas-cortadeiras, esses microrganismos podem causar aumento na taxa de mortalidade, redução da atividade de forrageamento e efeitos deletérios aos jardins de fungo, levando indiretamente ao declínio da colônia (JACCOUD; HUGHES; JACKSON, 1999). Sobretudo, *B. bassiana* é capaz de causar alta taxa de mortalidade em tempo reduzido em formigas-cortadeiras (CASTILHO et al., 2010; GOFFRÉ et al., 2018; LOUREIRO; MONTEIRO, 2005). Embora as formigas possuam diversos mecanismos de defesa, Diehl e Junqueira (2001) relataram que os compostos antimicrobianos produzidos na glândula metapleural de *Atta* sp. não possui ação antifúngica contra *B. bassiana*, o que favorece o uso da espécie em programas de controle microbiano.

Em adição, *B. bassiana* produz uma série de metabólitos que atuam na interação com insetos (ROHLFS; CHURCHILL, 2011). No manejo integrado de pragas, há um interesse crescente na utilização desses metabólitos voláteis e não voláteis biologicamente ativos que podem estar relacionados ao mecanismo de patogenicidade (CRESPO et al., 2008). Foi relatado recentemente que *B. bassiana* é capaz de produzir compostos que atuam na atração de seus hospedeiros seguido de infecção (GEORGE et al., 2013). Além disso, artrópodes não-alvo também são atraídos por *B. bassiana* e auxiliam na dispersão dos propágulos infectivos, desempenhando um papel ecologicamente importante na transmissão para novos hospedeiros (DROMPH; VESTERGAARD, 2002). Em adição, rainhas de formigas são atraídas por microrganismos, inclusive *B. bassiana,* para seleção de habitats adequados (HUANG et al., 2020) durante a fase de fundação da colônia (BRÜTSCH et al., 2014). No entanto, *B. bassiana* é repelente e causa comportamento de evitação em outros insetos sociais (MBURU et al., 2009; MBURU; MANIANIA; HASSANALI, 2013), apesar disso, possui efeito neutro para outras espécies,

demonstrando que o comportamento de atratividade ou repelência depende da espécie do hospedeiro, da cepa fúngica, concentração etc. (MNYONE et al., 2010).

2.6 *Trichoderma* spp. (Hypocreales: Hypocreaceae)

O gênero fúngico *Trichoderma* é representado por cerca de 254 espécies descritas que são amplamente distribuídas em todo o mundo (BISSETT et al., 2015). É considerado oportunista, possui rápido crescimento e coloniza substratos variados sob condições ambientais muito diversas. Uma das características mais relevantes de espécies do gênero *Trichoderma* é a sua aptidão em parasitar fungos, o que permite o desenvolvimento de produtos biológicos com múltiplas funções (MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, 2019).

Embora possa ser encontrado em uma ampla gama de hospedeiros, a sua capacidade de antagonizar o crescimento de patógenos de plantas tem sido a mais explorada (VERMA et al., 2007). Outro grande potencial de *Trichoderma* é no controle biológico de insetos-praga indiretamente, por meio do parasitismo de microrganismos simbiontes de insetos (POVEDA, 2021), como no caso de formigas-cortadeiras. Neste caso, ele atua como antagonista do fungo cultivado e seria um possível candidato ao controle desta praga, causando a morte do formigueiro pela falta de alimento (LOPEZ; ORDUZ, 2003). De forma direta, no caso de insetos-praga (FERREIRA; MUSUMECI, 2021) como as formigas-cortadeiras, *Trichoderma* é capaz de reduzir o tempo de sobrevivência de operárias (MUSSI-DIAS et al., 2020; ROCHA et al., 2017; STEFANELLI et al., 2021) e de fases jovens de *Atta sexdens rubropilosa* (STEFANELLI et al., 2021).

Nesse sentido, é interessante que, naturalmente, espécies de *Trichoderma* spp. são encontradas em jardins de fungos de várias espécies de formigas (RODRIGUES et al., 2011). Sendo o fungo filamentoso mais frequentemente associado a ninhos de *A. sexdens rubropilosa* no campo (RODRIGUES et al., 2005). Igualmente, em colônias de *Atta sexdens* em laboratório, *Trichoderma* infecta e causa redução no volume dos jardins de fungos, embora geralmente não resulte em morte das colônias (SILVA et al., 2020). Em comparação com *Escovopsis weberi,* um parasita especializado somente encontrado nos jardins de fungos cultivados de formigas (CURRIE; MUELLER; MALLOCH, 1999), espécies de *Trichoderma* provocam uma infecção notavelmente mais agressiva em *L. gongylophorus* (DRUZHININA et al., 2018).

Dentre as espécies de *Trichoderma* que foram relatadas inibindo o crescimento de *L. gongylophorus* consta *T. koningiopsis*, (CASTRILLO et al., 2016) *T. lignorum* (ORTIZ; ORDUZ, 2001), *T. spirale* (NASCIMENTO et al., 2017) *T. harzianum* (SILVA et al., 2006)*, T. afroharzianum* e *T. hamatum* (BIZARRIA et al., 2018). Em testes de pareamento *in vitro*, as taxas de inibição do crescimento micelial do fungo cultivado são muito variáveis, no entanto, os melhores isolados de *Trichoderma* podem atingir cerca de 75% de inibição do mutualista em 15 dias (SILVA et al., 2006).

Em fermentação submersa, é possível produzir diferentes propágulos de *Trichoderma*, tais como conídios submersos, micélio e até mesmo estruturas de resistência como clamidósporos e microescleródios. Dessa forma, essa técnica possibilita a abertura de uma nova abordagem ao desenvolvimento de produtos resistentes às condições adversas no campo e para aplicações no solo (KOBORI et al., 2015), ideal para pragas que vivem neste ambiente, como as formigas-cortadeiras.

Além dos propágulos, *Trichoderma* produz grande variedade de metabólitos secundários com potencial biotecnológico. Entre eles, a produção de compostos orgânicos voláteis é considerada um mecanismo eficaz de antibiose sintetizados por espécies de *Trichoderma*. Estes compostos liberados possuem papel ativo na inibição do crescimento de fungos competidores (RAJANI et al., 2021) e até mesmo são responsáveis por causar mortalidade em formigas-cortadeiras por meio da exposição de operárias aos voláteis do fungo (MUSSI-DIAS et al., 2020).

Devido à multifuncionalidade e alto potencial de *Trichoderma* no controle de formigas-cortadeiras, esforços para o desenvolvimento de formulações e modo de aplicação adequados para o controle biológico de saúvas têm sido empregados. Em alguns resultados favoráveis, Silva et al. (2020) mostraram que iscas encapsuladas com *Trichoderma* foram aceitas e viáveis por um bom período, bem como, Lopez; Orduz, (2003) confirmaram a morte de ninhos de *Atta* sp. tratados com uma mistura de conídios de entomopatógenos combinado com *Trichoderma.* Em adição, Rocha et al. (2017) investigaram o potencial de *Trichoderma* endofítico para proteção de plantas cultivadas do corte por formigas-cortadeiras e verificaram que esta pode ser uma estratégia promissora. Entretanto, as formigas preferem forragear plantas sem a presença do fungo e comumente removem fragmentos de jardins de fungos que

apresentem sinais de *Trichoderma* mas, alguns fungos conseguem permear esta barreira (CURRIE; STUART, 2001).

2.7 Voláteis produzidos por fungos

Os fungos e outros microrganismos produzem e liberam uma gama versátil de metabólitos com papéis interessantes em interações com plantas e insetos que podem ter efeitos benéficos ou prejudiciais aos organismos que interagem (WEISSKOPF; SCHULZ; GARBEVA, 2021). Dentre os metabólitos, os compostos orgânicos voláteis (COV's) são um grupo quimicamente diverso (DAVIS et al., 2013). Os COV's são moléculas pequenas de baixo peso molecular, o que facilita a evaporação e difusão pelo ar, água e solos porosos, muitas vezes liberando seu odor característico (SCHMIDT et al., 2015). Os componentes majoritários da mistura de voláteis liberados por fungos são geralmente ácidos, álcoois, aldeídos, hidrocarbonetos, cetonas, terpenos entre outros, tipicamente diferente dos compostos associados às bactérias (HUNG; LEE; BENNETT, 2015). Ainda, a quantidade e a composição dos voláteis fúngicos podem variar de acordo com a espécie, condições de cultivo, parâmetros físico-químicos, entre outros (WEISSKOPF; SCHULZ; GARBEVA, 2021).

Nesse sentido, o potencial biotecnológico de COV's emitidos por fungos tem sido alvo de pesquisas recentes. Eles atuam como semioquímicos provocando mudanças imediatas no comportamento de insetos, bem como, são antagonistas de fitopatógenos e promotores de crescimento de plantas (MORATH; HUNG; BENNETT, 2012).

É notável que os insetos são altamente responsivos às emissões microbianas (DAVIS et al., 2013). Existem na literatura alguns exemplos de atração de insetos mediada por substâncias emitidas por fungos (DAVIS; BOUNDY-MILLS; LANDOLT, 2012; DAVIS; LANDOLT, 2013). Um estudo recente reforçou o interesse em estudar microrganismos envolvidos em simbioses de insetos ao concluírem que voláteis microbianos são conhecidos por serem um elemento-chave na atração de formigas (FISCHER et al., 2017). Além disso, a comunicação química mediada por voláteis em insetos sociais é ainda mais complexa e desempenha um papel significativo na manutenção da organização social (RICHARD; HUNT, 2013).

Sob a perspectiva do controle microbiano, um melhor entendimento dos COV's fúngicos é relevante, pois as respostas higiênicas empregadas pelas

formigas-cortadeiras são desencadeadas a partir do reconhecimento de microrganismos invasores pelas operárias por meio da detecção de compostos voláteis ou produtos químicos da superfície dos microrganismos que são distintos do perfil químico de suas colônias (GOES et al., 2020). Por fim, para que um produto seja eficaz no controle de formigas-cortadeiras, a isca deve ser atrativa para as formigas mesmo que distante do ninho e a rejeição inicial não deve ocorrer (CARLOS et al., 2009). Com isso, a busca por agentes de controle atrativos ou imperceptíveis às formigas é de suma importância no desenvolvimento de um produto biológico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e manutenção de colônias de *Atta sexdens rubropilosa*

As colônias recém fundadas de *A. sexdens rubropilosa* foram coletadas em campo entre fevereiro e abril de 2021 em área de plantio de *Pinus* sp. no município de Itirapina-SP e na cidade de Anhembi-SP, na Estação Experimental de Ciências Florestais da ESALQ-USP na borda do talhão de Teca (*Tectona grandis*). A criação foi mantida no departamento de entomologia e acarologia da ESALQ-USP em Piracicaba-SP em sala de criação de insetos sociais. A coleta e manutenção das formigas-cortadeiras em condições artificiais foram realizadas conforme a metodologia proposta por Della Lucia (2011), denominada sistema de criação aberto, que permite o livre forrageamento das operárias.

Os ninhos da espécie, com aproximadamente quatro meses de idade, foram identificados a partir do monte de terra solta característico. Em seguida, foi feita a escavação dos formigueiros iniciais para a coleta cuidadosa do jardim de fungo, formas jovens, operárias e rainha. Cada colônia foi retirada do solo e transferida individualmente para recipientes plásticos de 1L, transportados para o laboratório e acondicionados sobre bandejas (60x40x9 cm) que tinham suas bordas revestidas por talco inerte para evitar o escape dos indivíduos. Esses recipientes tinham suas tampas perfuradas e cobertas com algodão umedecido e continham um orifício em sua lateral para permitir a saída das operárias para o forrageamento. A criação foi mantida em condições controladas à temperatura de 25 ± 5°C, 60 ± 10% de umidade relativa e 12:12 de fotoperíodo. Diariamente, foram oferecidos como suprimento para as formigas folhas frescas de diversas plantas atrativas como *Acalypha* sp., *Hibiscus* sp. e *Gmelina arborea.*

3.2 Isolados fúngicos

Foram selecionados os isolados de *B. bassiana* ESALQ-4475 e de *T. longibrachiatum* ESALQ-F74I, obtidos a partir da Coleção de Entomopatógenos denominada “Professor Sérgio Batista Alves”, localizada no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”– Universidade de São Paulo (ESALQ-USP), na cidade de Piracicaba-SP, Brasil.

3.3 Produção de propágulos via fermentação submersa

Os isolados de *T. longibrachiatum* e *B. bassiana* selecionados foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura composto por batata 200g/L, dextrose 15g/L e ágar 20g/L - BDA (Difco ®) e 0,5g/L do pentabiótico (Zoetis ®). Após a repicagem, as placas foram incubadas em câmara climatizada do tipo B.O.D (Biological Oxigen Demand) a 25 ± 1ºC e 12 horas de fotofase durante 5-7 dias ou 10-12 dias, respectivamente. Os discos de ágar esporulados obtidos das culturas monospóricas dos isolados foram preservados em criotubos estéreis, imersos em solução de 10% de glicerol ou esporo puro e acondicionados em freezer a -80ºC. Os inóculos dos isolados foram preparados a partir de suspensões de conídios frescos dos fungos obtidas por raspagem das placas de cultivo fúngico adicionado a 10 mL de uma solução de água destilada estéril + 0,05% de Tween 80 (Synth ®) ajustadas à concentração de $5x10^6$ conídios mL^{-1}.

A produção de blastosporos de *B. bassiana* foi feita conforme a metodologia proposta por Iwanicki et al. (2020). Os propágulos foram obtidos em fermentação submersa utilizando o meio líquido Adamek (JACKSON et al., 1997) modificado, cada litro de meio composto por 40g de milhocina; 2,5g de KH_2PO_4; 1g de $CaCl_2.2H_2O$; 0,83g de $MgSO_4.7H_2O$; 0,3g de $FeSO_4.7H_2O$; 12,8 mg de $MnSO_4.H_2O$; 11,2 mg de $ZnSO_4.7H_2O$; 29,6 mg de $CoCl_2.6H_2O$; 0,2 mg de cada vitamina: tiamina, riboflavina, pantotenato de cálcio, niacina, piridoxamina e ácido tióctico e 40 g de glucose, que foi autoclavada separadamente da solução salina e adicionada ao meio antes da inoculação do fungo. Para produção de microeslerodios de *T. longibrachiatum* foi utilizado o meio de cultivo adaptado de Song et al. (2014), cuja composição nutricional por litro de meio consiste em: 4 g $(NH_4)_2$ $C_6H_6O_7$; 6 g de KH_2PO_4; 0,8 g de $CaCl_2.2H_2O$; 0,6 g de $MgSO_4.7H_2O$; 0,2 g de $FeSO_4.7H_2O$; 10 g de glicose.

A fermentação dos isolados foi conduzida em frascos Erlenmeyer (Bellco ®) de 250 mL contendo o volume de 45 mL dos meios de cultivo somado a 5 mL de inóculo de cada um dos isolados fúngicos, que foram mantidos em incubadora rotatória tipo shaker (Marconi ®) por 3 dias a 28 °C sob agitação orbital de 350 rpm para *B. bassiana* e 5 dias a 28 °C sob agitação orbital de 300 rpm para *T. longibrachiatum*.

3.4 Coleta de COV's fúngicos e análise química por cromatografia gasosa

Os compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos por blastosporos e conídios de *B. bassiana* foram coletados usando um Sistema de Coleta Volátil ARS (ARS, Gainesville, FL, EUA). Seis réplicas de controle composto por material inerte puro (argila cinza) e seis réplicas das amostras (10% de inerte somado às estruturas fúngicas) foram colocados em câmaras de vidro totalmente fechadas (21,5 cm de comprimento x 4 cm de diâmetro interno) conectadas ao ARS por mangueiras de teflon. Ar limpo e umidificado foi injetado nas câmaras a 1,0 L/min. Uma coluna de polímero adsorvente (30 mg; Hayesep-Q, 80-100 mesh, Alltech Associates, Deerfield, IL, EUA) foi acoplada à saída da câmara de vidro. Após 48 h da coleta de COVs, as colunas de polímero foram eluídas com 150 µL de hexano destilado (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) forçado através do absorvente com gás nitrogênio filtrado e as amostras foram armazenadas em frascos e mantidas em freezer a -30 °C até a análise.

A análise química foi realizada usando cromatografia gasosa acoplada a um detector de ionização de chama (GC-FID; GC2010 Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com uma coluna de fase estacionária de baixa polaridade (30 m × 25 µm × 25 mm; HP-5, Agilent J&W, Santa Clara, CA, EUA).

Um microlitro de cada amostra foi injetado a 250°C em modo *splitless* com hélio como gás de arraste a um fluxo constante de 1 mL/min. A temperatura inicial da coluna do GC foi mantida a 40 ºC por 5 minutos, aumentada para 150 ºC a 5 ºC/min, permanecendo nesta temperatura por 1 minuto e, por fim, aumentada para 250 ºC a 20 ºC/min, permanecendo nesta temperatura por 2 minutos.

Para a identificação dos compostos, 1µl foi injetado em modo *splitless* em um cromatógrafo a gás (Varian 3800) acoplado a um espectrômetro de massas (Varian 4000 Ion Trap) (Agilent Technologies) equipado com o mesmo tipo de coluna do GC-FID. O hélio foi utilizado como gás de arraste a um fluxo de 1 mL/mim e a programação de temperatura do forno do GC foi a mesma utilizada nas análises no GC-FID. Os COVs fúngicos foram identificados provisoriamente com base em uma comparação de espectros de massa com o banco de dados da biblioteca (NIST11). A seleção de compostos foi feita com uma porcentagem de correspondência na base de dados de pelo menos 80%. COVs conhecidos associados ao meio de cultura, ao controle e compostos com boro em sua composição química oriundos do

material de frascos de vidro borossilicatos foram excluídos do perfil cromatográfico dos propágulos (AHMED et al., 2018).

3.5 Coleta de compostos fúngicos não voláteis

Os compostos químicos das estruturas fúngicas foram extraídos lavando os propágulos em solvente. Primeiramente, todo o meio de cultura foi centrifugado a 5000 rpm por 5 minutos e descartado. O cultivo fúngico foi ressuspendido em uma solução de água destilada e 0,05% de Tween 80. Então, os propágulos foram ajustados a concentração de $1x10^8$ para blastosporos e conídios ou $1x10^3$ para microescleródios, e centrifugados novamente em tubo de vidro do tipo falcon para obtenção de um pellet contendo apenas células fúngicas que foi armazenado em freezer -80ºC. O pellet foi ressuspendido em solvente hexano duplamente destilado e mantido na mesma concentração. Os propágulos ficaram em contato com o solvente por 5 minutos e em agitação constante. Para obtenção do extrato natural, utilizando uma seringa de vidro, o extrato hexânico contendo os produtos químicos das diferentes estruturas fúngicas foi filtrado através de um filtro de membrana de 0,22 µm. Após filtração, as soluções de hexano foram mantidas em tubo do tipo vial e armazenadas em freezer -30ºC até o uso.

3.6 Bioensaios

3.6.1 Atratividade de operárias de *A. sexdens rubropilosa* aos compostos fúngicos voláteis

Para o ensaio de atratividade aos compostos voláteis, as estruturas fúngicas foram estabilizadas por meio de um processo de secagem. Para estruturas produzidas em fermentação submersa foi realizada a remoção do meio de cultivo, que pode ser atrativo às formigas e descaracterizar os tratamentos nos ensaios de atratividade. Para isso, o fermentado foi centrifugado a 5000 rpm durante 5 minutos em centrífuga e o sobrenadante foi separado, aos propágulos concentrados foi adicionado água destilada estéril para lavagem do restante do meio de cultivo. Em seguida, as concentrações das estruturas fúngicas foram quantificadas com auxílio de câmara de contagem, obtendo soluções concentradas a $1x10^8$ blastosporos mL^{-1} e $1x10^3$ microescleródios mL^{-1}. Os conídios aéreos frescos foram obtidos por meio de raspagem das placas e ajustados à concentração de $1x10^8$ conídios $mL^{-1.}$

Para a estabilização dos propágulos fúngicos, foi utilizada a metodologia descrita por Mascarin et al. (2015), em que 10% (p/v) de argila cinza foi misturado às suspensões concentradas. Essa mistura foi filtrada em papel filtro de 12,5 cm de diâmetro, através de bomba de vácuo acoplada a funil de Buchner. O papel de filtro onde as partículas sólidas ficaram retidas foi mantido em câmara de secagem sob fluxo de ar constante para secagem lenta. O material seco foi obtido quando a umidade relativa interna da câmara de secagem atingiu um valor inferior a 20%, ou até que as amostras atingissem uma atividade final de água (a.w) ≤ 4%, conforme medido por um analisador de atividade de água. O material seco foi triturado em microprocessador e embalado a vácuo em sacos de polietileno e armazenado a 4 °C até o uso nos experimentos. O sobrenadante das culturas líquidas também foi utilizado como tratamento, para isso, foi realizada a filtragem através de uma membrana de filtro de 0,22 µm com o objetivo de reter os propágulos fúngicos, em seguida, foi adicionado 10% (p/v) do material inerte e foi submetido ao processo de secagem e armazenamento.

Para realização dos bioensaios de atratividade das operárias submetidas às fontes de odores voláteis foram utilizadas cinco colônias de *A. sexdens rubropilosa* que permaneceram em privação de alimento por 24 horas antes da condução dos ensaios. Cada uma das colônias foi mantida sobre bandejas (arena de forrageamento) revestida com talco nas bordas para impedir o escape dos indivíduos. O recipiente das colônias continha um orifício de entrada e saída das operárias que permitia o livre acesso à arena de forrageamento. As colônias tinham aproximadamente um ano de idade e foram mantidas nas mesmas condições da criação (Item 3.1) e em sala com luz difusa para condução dos bioensaios, que foram realizados sempre no período da tarde. A cada bioensaio, as bandejas eram devidamente limpas com acetona a fim de remover qualquer odor, e o acesso à arena de forrageamento era fechado e aberto somente no início do bioensaio.

As arenas de forrageamento continham na extremidade oposta da posição das colônias duas saídas de ar, localizadas de forma equidistantes uma de cada lado da bandeja. As saídas de ar eram protegidas com uma tela para impedir o acesso das operárias. Às saídas, foram conectados tubos do tipo falcon, que por sua vez, eram interligados por mangueiras a uma câmara com sistema de fornecimento de ar umidificado (Chamber Humidified Air Delivery System/Analytical Research Systems, EUA) que fornecia um fluxo de ar constante na arena.

Em um esquema de dupla-escolha, simultaneamente, foram oferecidos para as formigas duas fontes de odores: no interior do tubo localizado em um dos lados da arena, era colocado uma amostra com ~2g de material inerte puro (argila cinza) no tratamento controle, e no tubo do lado oposto a mesma quantidade das estruturas fúngicas estabilizadas nas concentrações previamente estabelecidas para cada um dos tratamentos. A corrente de ar filtrado e úmido passava pelas amostras de odor e os voláteis das amostras eram transferidos para a arena de forrageamento. Medidores de vazão mantiveram a taxa dos fluxos de ar constantes em 0,4 L/min. A emissão dos voláteis na arena de forrageamento foi constante durante cada gravação. Os lados dos sinais de odor foram alternados entre eles para excluir comportamentos tendenciosos. Para o critério de escolha, foi delimitado dentro da arena dois quadrantes em torno das saídas do fluxo de ar, que são as zonas de interesse usadas durante a análise para quantificar comportamentos relacionados com a posição espacial das operárias na arena. Os ensaios foram compostos por 6 tratamentos contrastados com o controle, sendo blastosporos de *B. bassiana*, conídios aéreos de *B. bassiana* e *T. longibrachiatum*, microescleródios de *T. longibrachiatum* e o sobrenadante das culturas líquidas de *B. bassiana* e de *T. longibrachiatum.*

Para um registro uniforme da posição das operárias dentro da arena de forrageamento, uma câmera digital (Webcam Logitech C505 HD) foi instalada acima do centro da arena. Os vídeos foram gravados com auxílio do programa de gravação de vídeo OBS Studio (Open Broadcaster Software). Posteriormente, os vídeos foram analisados através de um sistema de rastreamento de vídeo, Ethovision XT (NOLDUS; SPINK; TEGELENBOSCH, 2001). Após ser fornecido o fluxo de ar, a gravação do vídeo e o modo de rastreamento do software foram iniciados imediatamente após a primeira operária visitar uma das zonas de interesse na arena de forrageamento e os comportamentos foram registrados por um período de 2 horas ininterruptas. O software rastreou as operárias dentro das regiões de interesse definidas na arena (no EthoVision chamadas de zonas). Foi realizado o rastreamento de 16 formigas simultaneamente, que é o máximo de indivíduos que a versão utilizada do software oferece. A arena foi calibrada com o tamanho real da bandeja. As variáveis comportamentais foram escolhidas de acordo com o interesse biológico e consistiram na contagem do número de vezes que uma operária visitou cada uma das zonas de interesse (“Visitas Ethovision”) e o tempo médio gasto (em

minutos) de uma operária em cada uma das zonas de interesse, ou seja, o tempo gasto acumulado em que o ponto central do corpo da formiga permaneceu no interior de uma das zonas. Os vídeos de 2 horas de duração provenientes dos ensaios também foram analisados visualmente pelo operador e a cada 5 minutos o número de formigas no interior de cada uma das zonas de interesse foram registrados manualmente, gerando o conjunto de dados “Visitas Contagem”.

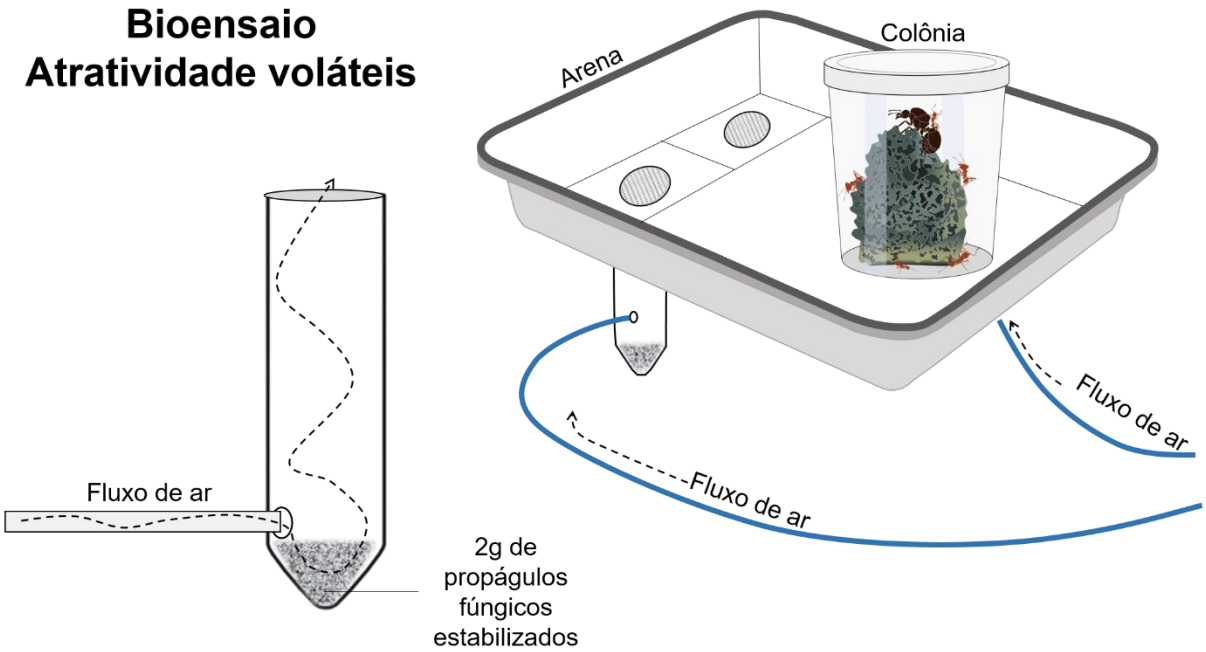

Figura 1. Esquema da metodologia do bioensaio de atratividade aos compostos voláteis

3.6.2 Atratividade de operárias de *A. sexdens rubropilosa* aos compostos fúngicos não voláteis

Para o ensaio de atratividade aos compostos não voláteis, as estruturas fúngicas foram submetidas a um processo de lavagem. Os compostos não voláteis das estruturas fúngicas foram extraídos através de lavagem dos propágulos em solvente. O solvente utilizado foi o hexano destilado que possui capacidade de extrair uma ampla quantidade de compostos, principalmente não polares (HERNÁNDEZ et al., 2006).

Para estruturas produzidas em fermentação submersa a remoção do meio de cultivo através de centrifugação e ajuste das concentrações foi realizada conforme descrito para o ensaio de atratividade aos compostos voláteis. O pellet de células fúngicas foi mantido em contato com o solvente por 5 minutos e em agitação constante. O extrato hexânico contendo os compostos químicos dos diferentes propágulos fúngicos foi filtrado com uso de uma seringa de vidro e um filtro de

membrana de 0,22 µm. Após filtrado, as soluções de hexano foram mantidas em tubo do tipo vial e armazenadas em freezer -30ºC até o uso.

Para realização dos bioensaios de atratividade das operárias submetidas aos compostos fúngicos não voláteis foram utilizadas quatro colônias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas às mesmas condições dos ensaios de atratividade aos compostos fúngicos voláteis. Para avaliar as escolhas das operárias, na arena de forrageamento devidamente limpa, foram oferecidas folhas frescas em forma de discos (6 mm de diâmetro) perfurados com um cortador de papel. Foram utilizadas folhas da espécie *Gmelina arborea*, por ser utilizada na manutenção da criação e por tratar-se de um alvo preferencialmente cortado pelas formigas-cortadeiras (ESPINOZA, 2004). Dez discos de folhas da espécie vegetal foram impregnados com 20 µL do solvente puro (hexano) no tratamento controle e 20 µL do extrato hexânico das estruturas fúngicas nas determinadas concentrações para os tratamentos. Neste último caso, os extratos foram diluídos e oferecidos em diferentes concentrações, sendo elas 10%, 50% e 100%. Os ensaios foram compostos por 4 tratamentos contrastados com o controle, sendo blastosporos de *B. bassiana*, conídios aéreos de *B. bassiana* e *T. longibrachiatum*, microescleródios de *T. longibrachiatum*

Os discos de folha vegetal impregnados com extratos dos tratamentos e controle foram posicionados na área delimitada como zona de interesse na arena de forrageamento de forma equidistante e oferecidos simultaneamente para as formigas. O lado em que os discos eram dispostos foram alternados entre eles para controlar os enviesamentos laterais. Após o acesso à arena ser aberto, assim que o primeiro disco foi carregado foi iniciado a gravação de vídeo por 2 horas ininterruptas ou até que todos os discos fossem carregados. Os vídeos foram gravados conforme descrito para o bioensaio de atratividade aos voláteis.

Os vídeos foram analisados quanto ao número de discos carregados e ao tempo de carregamento de cada um dos tratamentos. Para a variável resposta número de discos carregados, a seguinte metodologia adaptada de Della Lucia et al. (1992) foi utilizada: quando 100% dos discos de uma das escolhas (discos do tratamento ou discos do controle) eram carregados o número de discos não carregados pelo tratamento oposto era contabilizado. Já para variável resposta tempo de carregamento, para cada tratamento o intervalo entre o primeiro e último disco carregado foi contabilizado em minutos.

3.6.3 Atratividade de operárias de *A. sexdens rubropilosa* às estruturas fúngicas

Para a descrição da resposta comportamental das operárias submetidas as estruturas fúngicas frescas foi utilizada a mesma metodologia descrita para o ensaio de atratividade aos compostos não voláteis. Para isso, dez discos de folhas da espécie vegetal foram impregnados com 20 µL de uma solução de água destilada estéril + Tween 0,05 % no tratamento controle e 20 µL das estruturas fúngicas nas determinadas concentrações para os tratamentos.

3.6.4 Preferência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* aos propágulos de *B. bassiana*

Os ensaios de preferência foram realizados entre as estruturas que demonstraram atratividade significativa frente ao grupo controle nos testes de atratividade ou, pelo menos, uma tendência à atratividade. Nesse sentido, blastosporos de *B. bassiana* foram contrastados com seus conídios e a preferência foi observada. Para realização dos ensaios de preferência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* aos compostos voláteis, não voláteis e estruturas frescas de *B. bassiana* a mesma metodologia do bioensaio de atratividade respectivo foi utilizada.

3.6.5 Comportamentos de *A. sexdens rubropilosa* em contato com estruturas fúngicas

Para esse ensaio, foram utilizadas quatro colônias mantidas na criação de insetos sociais do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano. De cada uma das colônias foram obtidas cinco subcolônias que foram submetidas aleatoriamente aos tratamentos, totalizando 20 subcolônias. As subcolônias, que são pequenas colônias sem rainha, foram compostas por 5 operárias pertencentes à subcasta “generalistas”, que apresentam a largura da cápsula cefálica entre 1,4–2,2 mm e uma pequena quantidade (~1 g) do fungo mutualista colocados em placas de Petri de plástico (diâmetro 9 cm, altura 1,5 cm) contendo uma camada de gesso de 1 cm no fundo para manutenção da umidade. Todas as operárias foram anestesiadas com uso de CO_2 e, logo após, 1 mL de solução fúngica ou uma suspensão de controle foi aplicada através da torre de Potter e distribuída uniformemente sob as subcolônias, incluindo o fungo cultivado. O desenho experimental do estudo consistiu em 5 tratamentos com 4 blocos (colônias), como segue: conídios aéreos e blastosporos

de *B. bassiana*, conídios aéreos e microescleródios de *T. longibrachiatum*. Os conídios aéreos de ambos fungos e blastosporos de *B. bassiana* foram ajustados a concentração de $1x10^8$ conídios e blastosporos mL^{-1} e os microescleródios foram utilizados na concentração $1x10^3$ microescleródios mL^{-1}. O tratamento controle consistiu em uma solução de água destilada estéril e 0,05% Tween 80 sem propágulos fúngicos. O bioensaio foi conduzido em delineamento em blocos casualizados para investigar a frequência dos comportamentos sob cada estrutura dos fungos. Os comportamentos foram registrados por 30 minutos com uma câmera de vídeo (FDR-AX53 4K; Sony, Tóquio, Japão) 15 minutos após a pulverização dos tratamentos. As gravações foram feitas no interior de um fitotron (Eletrolab) com as seguintes condições experimentais: luz indireta e temperatura de 23 ± 0,5 ° C com 70 ± 5% de umidade durante o período de gravação dos vídeos para observar os comportamentos higiênicos.

Todos os comportamentos foram reconhecidos com base no guia visual dos principais comportamentos defensivos aos ataques de patógenos em formigas-cortadeiras proposto por Nilsson-Møller, Poulsen e Innocent, (2018). Foram contabilizadas as frequências de *self-grooming*, *allogrooming* e *weeding*. Foi definido o comportamento de *grooming* contínuo como uma única ocorrência, a menos que a formiga mudasse o padrão de higienização. Os comportamentos foram considerados e contabilizados somente se a formiga analisada apresentasse os seguintes padrões de comportamento: (a) uma única formiga limpando seu próprio corpo especialmente pernas e antenas usando suas mandíbulas (*self-grooming*); (b) uma formiga sendo limpa por uma ou mais outras formigas (*allogrooming*) e (c) o ato de uma ou mais formigas separarem e removerem com a mandíbula grandes pedaços de jardim de fungo infectados por micoparasitas e deposita-los longe do jardim ou diretamente na câmara de resíduos (*weeding*).

3.6.6 Sobrevivência de *A. sexdens rubropilosa* expostas aos propágulos fúngicos de *B. bassiana*

A virulência de blastosporos de *B. bassiana* (ESALQ4475) foi avaliada e comparada com conídios aéreos contra operárias generalistas de formigas-cortadeiras. As operárias foram removidas de uma única colônia mantida no departamento de entomologia da ESALQ-USP e, com auxílio de uma pinça, foram selecionados indivíduos pertencentes à subcasta “generalistas” que apresentam a

largura da cápsula cefálica entre 1,4–2,2 mm. Esses grupos de formigas foram colocados em uma placa de Petri de plástico (diâmetro 9 cm, altura 1,5 cm) que continha uma fina camada de gesso no fundo, forrada com papel filtro umedecido e uma pequena quantidade (~1 g) do fungo mutualista que pertencia à colônia de onde as operárias foram retiradas. Em cada placa de Petri foram colocadas 5 formigas pertencentes à mesma colônia dois dias antes da data da aplicação do bioensaio para aclimatar as formigas no novo ambiente. O delineamento foi inteiramente casualizado e composto por 3 tratamentos, sendo eles blastosporos e conídios de *B. bassiana*, além do controle. Cada tratamento foi composto por 9 repetições (placas- unidades experimentais) contendo 5 formigas cada (insetos- unidades observacionais).

Todas as operárias foram anestesiadas com uso de CO_2 e, logo após, foram pulverizadas com suspensões de blastosporos frescos ou conídios na concentração de $1x10^8$ blastosporos ou conídios mL^{-1} preparados com uma solução de 0,05% Tween 80. O grupo controle foi formado por insetos pulverizados apenas com a solução de Tween. Foram pulverizados 2 mL de cada tratamento através da Torre de Potter. Após a pulverização, as placas de Petri foram mantidas a 26–28 °C com fotoperíodo de 12:12h e umidade ambiente não controlada.

Operárias mortas foram registradas diariamente por 7 dias após a aplicação. Para confirmar que a mortalidade foi devido à infecção fúngica, as formigas mortas foram transferidas para uma câmara úmida e mantidas a 28° C até que a esporulação fúngica pudesse ser observada.

3.6.7 Microscopia eletrônica de varredura

Para análise no microscópio eletrônico de varredura (MEV), foi utilizada a metodologia adaptada de Travaglini et al. (2016). O objetivo da análise foi entender a localização principal da deposição de propágulos e quantidade de propágulos fúngicos remanescentes na superfície corporal de operárias de *A. sexdens rubropilosa* após a exposição por diferentes propágulos de *B. bassiana* mantidas em grupos com a possibilidade de limpar os propágulos por meio do grooming por 0,30 e 60 minutos.

Foram utilizadas operárias da subcasta generalistas de uma única colônia do departamento de entomologia da ESALQ-USP. Os indivíduos foram mantidos em grupos de cinco operárias, colocados em uma placa de Petri de plástico (diâmetro 9

cm, altura 1,5 cm) forrada com papel filtro umedecido. Todas as formigas de cada grupo foram imersas individualmente por 3 segundos em solução concentrada dos seguintes tratamentos: $1x10^8$ conídios ou blastosporos mL^{-1} de *B. bassiana*. Após exposição aos propágulos fúngicos, as operárias foram retornadas em seus grupos às placas de Petri, onde permaneceram com a possibilidade de exercer seus comportamentos de *grooming* normalmente pelos períodos de 0, 30 e 60 minutos após aplicação.

Para avaliação da quantidade de propágulos remanescentes na cutícula das operárias que tiveram a possibilidade de limpar a si mesmas (*self-grooming*) e as companheiras de ninho (*allogrooming*) por diferentes períodos, uma formiga de cada placa foi retirada aos 0, 30 e 60 minutos após aplicação e em seguida foram mortas por baixas temperaturas. Imediatamente após a morte, as formigas submetidas à exposição aos propágulos fúngicos foram submetidas a um processo de fixação do material para MEV. A fixação foi feita pelo método químico por meio da exposição por 24 horas em vapor de tetróxido de ósmio (OsO_4) para estabilização estrutural.

Para as avaliações espaciais dos propágulos depositados ao corpo das formigas, com o auxílio de uma lupa, os exemplares inteiros já estabilizados foram colados na posição dorso-lateral em uma fita adesiva de carbono dupla face e fixadas sob porta amostras (stubs) que são pequenos cilindros metálicos. O manuseio foi feito delicadamente com pinça para evitar danos à superfície corporal dos insetos, as pernas e as antenas foram acomodadas afastadas do corpo a fim de não impedir a visualização. As amostras foram recobertas por uma fina camada de metal, o alvo metálico utilizado foi ouro, e o procedimento foi realizado em uma câmara de vácuo metalizadora (Balzers, modelo SCD-050) onde as amostras foram pulverizadas com o metal nobre. As imagens foram coletadas com microscópio eletrônico de varredura modelo JEOL JSM-IT300 pertencente ao Laboratório de Microscopia Eletrônica aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) da ESALQ/USP em Piracicaba, São Paulo, Brasil.

3.7 Análise Estatística

Todas as análises foram realizadas no software estatístico RStudio (v. 4.2.1) (TEAM, 2020).

Nos bioensaios de atratividade e preferência aos compostos não voláteis e estruturas onde as variáveis resposta consistiram em tempo de carregamento de

discos e número de discos carregados, a comparação do tempo de carregamento de dez discos por operárias de *A. sexdens rubropilosa* entre os tratamentos foi realizada através de análise de variância (ANOVA) dos valores transformados em raiz quadrada para satisfazer normalidade. Nos casos em que esta não era satisfeita mesmo após a transformação, utilizou-se o teste não paramétrico Wilcoxon–Mann–Whitney (WMW) para comparação (WILCOXON, 1945).

As colônias de formigas foram consideradas como blocos, avaliando o efeito de blocos, tratamentos e a interação entre ambos. O número de discos carregados pelas formigas entre tratamentos quando estas coletaram os dez discos de ao menos um dos tratamentos foi comparado utilizando modelo linear generalizado (GLM) com distribuição Poisson dos erros, ajustando para superdispersão (Quasipoisson) quando necessário (MCCULLAGH; NELDER, 1989).

Assim como na comparação do tempo, as colônias de formigas foram consideradas como blocos, avaliando o efeito de blocos, tratamentos e a interação entre ambos. O tempo para carregar os dez discos foi adicionado ao modelo como um *offset* para acomodar a possível influência no total de discos carregados. Utilizou-se análise de deviance com teste de qui-quadrado para modelo Poisson e teste F para modelo quasipoisson (MCCULLAGH; NELDER, 1989). Ainda, no experimento de atratividade aos compostos fúngicos não voláteis as diferentes concentrações foram adicionadas ao modelo como fatores, e foram avaliados os efeitos de blocos, tratamentos, concentrações e a interação entre tratamento e concentração. Como não houve efeitos significativos da concentração, os gráficos foram gerados com dados referente à média de discos carregados e tempo de carregamento de todas as concentrações utilizadas (10,50 e 100%).

Nos bioensaios de atratividade e preferência aos compostos voláteis, as mesmas análises foram utilizadas para a comparação entre o tempo gasto (ANOVA ou WMW) e número de visitas (GLM) entre controle e tratamento aplicando, separadamente, os dados de “Visitas Contagem” e “Visitas Ethovision”. O software Ethovision fornece valores de zero em casos que o inseto rastreado não estiver visível dentro dos limites da arena, por isso, fez-se necessário retirar essas observações para não influenciar nos resultados, uma vez que os valores não correspondiam a visitas, mas sinalizavam não detecção da formiga pelo equipamento.

As curvas de sobrevivência foram geradas com os dados de operárias mortas até o dia 7 por meio dos pacotes survmine (KASSAMBARA et al., 2017) e survival (THERNEAU, 2020) do software R (TEAM, 2020). As curvas de sobrevivência foram estimadas por um modelo não paramétrico ajustado à distribuição Weibull. Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as curvas de sobrevivência para os tratamentos foram estimadas pelo teste log-rank.

O tempo letal mediano dos tratamentos foi comparado pela sobreposição dos intervalos de confiança (IC 95%) estimados pela função LT_logit do pacote ecotox do R. O ajuste do modelo foi verificado por meio do Qui-quadrado de Pearson e o modelo foi considerado bem ajustado quando o valor de p. foi superior a 0,05. Os valores de TM_{50} não foram considerados estatisticamente significativos quando seus IC de 95% se sobrepuseram.

Para o bioensaio de comportamento, a frequência de limpeza (*self-grooming, allogrooming* e *weeding*) exibidos por operárias generalistas de *A. sexdens rubropilosa* em contato com as diferentes estruturas fúngicas foi comparada utilizando modelo linear generalizado (GLM) ajustada a distribuição Quasipoisson (MCCULLAGH; NELDER, 1989). A verificação da qualidade do ajuste foi feita por meio do uso do gráfico meio-normal de probabilidades com envelope de simulação (pacote do R “hnp”) (MORAL; HINDE; DEMÉTRIO, 2017). As colônias de formigas foram consideradas como blocos e incluídas ao modelo como fatores. Após o ajuste do melhor modelo, os efeitos dos tratamentos e blocos foram verificados através da análise de deviance com teste F e quando significativo, as médias dos mesmos foram comparadas por meio do teste de comparação de médias (teste de Tukey, $p<0,05$), que foram realizadas por meio da função glht do pacote multicomp (TEAM, 2020).

4. RESULTADOS

4.1 Atratividade de *A. sexdens rubropilosa* aos compostos fúngicos voláteis

De acordo com a análise de variância, a média de ocorrências avaliada pelo método de contagem visual (Visitas Contagem) (p= 0,004) foi superior na zona de emissão de odores voláteis liberados por blastosporos de *B. bassiana,* que recebeu em média 5,0±0,5 visitas em comparação ao controle (3,9±0,4 visitas). A média de ocorrências determinada pelo software Ethovision (Visitas Ethovision) também foi significativamente maior (p= 0,002) na zona de emissão de odores voláteis liberados pela estrutura leveduriforme do fungo, que recebeu em média 35,0±3,2 visitas e 25,5±2,6 visitas na zona de emissão de voláteis liberados pelo controle. O tempo médio gasto acumulado no interior de cada uma das zonas de interesse foi aproximado, em média de 6 minutos.

Para os conídios de *B. bassiana*, as médias de visitas para o tratamento foram de 4,5±0,2 “Visitas Contagem” e de 37,5±5,0 “Visitas Ethovision” em comparação ao controle que recebeu 3,9±0,2 e 23,5±3,3 “Visitas Contagem” e “Visitas Ethovision”, respectivamente. Entretanto, estas diferenças numéricas pela escolha da fonte de odores voláteis emitidos pela estrutura fúngica não foram estatisticamente significativas (p= 0,305).

Para o tratamento composto por sobrenadante de *B. bassiana*, a zona da arena que continha amostra liberando voláteis do controle recebeu significativamente mais “Visitas Ethovision” em relação ao tratamento, com 126,8±16,7 e 117,3±13,9 visitas respectivamente. O tempo médio foi significativamente maior na zona volatilizando COVs liberados pelo tratamento, 25,5±3,7min em comparação ao controle 12,0±0,9min. Os resultados deste tratamento foram divergentes, com isso, o sobrenadante da cultura líquida de *B. bassiana* não foi considerado atrativo.

Para as amostras com COVs liberados pelas diferentes estruturas de *T. longibrachiatum* (microescleródios, conídios e sobrenadante) as variáveis resposta de número de visitas em “Visitas Contagem” e “Visitas Ethovision” não obtiveram diferenças significativas. Em relação à variável resposta tempo médio que as operárias de *A. sexdens rubropilosa* permaneceram próximas à fonte de voláteis, este só diferiu do controle no tratamento com COVs oriundos de conídios de *T. longibrachiatum*, onde esta variável foi maior na fonte de voláteis liberados pelo controle (11,5±3,3 min.) em relação ao tratamento (4,3±0,8 min.)

Em nenhum dos ensaios, as visitas foram significativamente maiores no controle, evidenciando que a resposta das operárias foi neutra em relação ao tratamento controle, composto por argila cinza pura, indicando que o material inerte não liberou nenhum volátil que pudesse influenciar o comportamento dos insetos. Quando o número de visitas ou o tempo de permanência das operárias foi significativamente maior nas zonas de emissão de voláteis fúngicos, este foi considerado atrativo às formigas em relação ao controle.

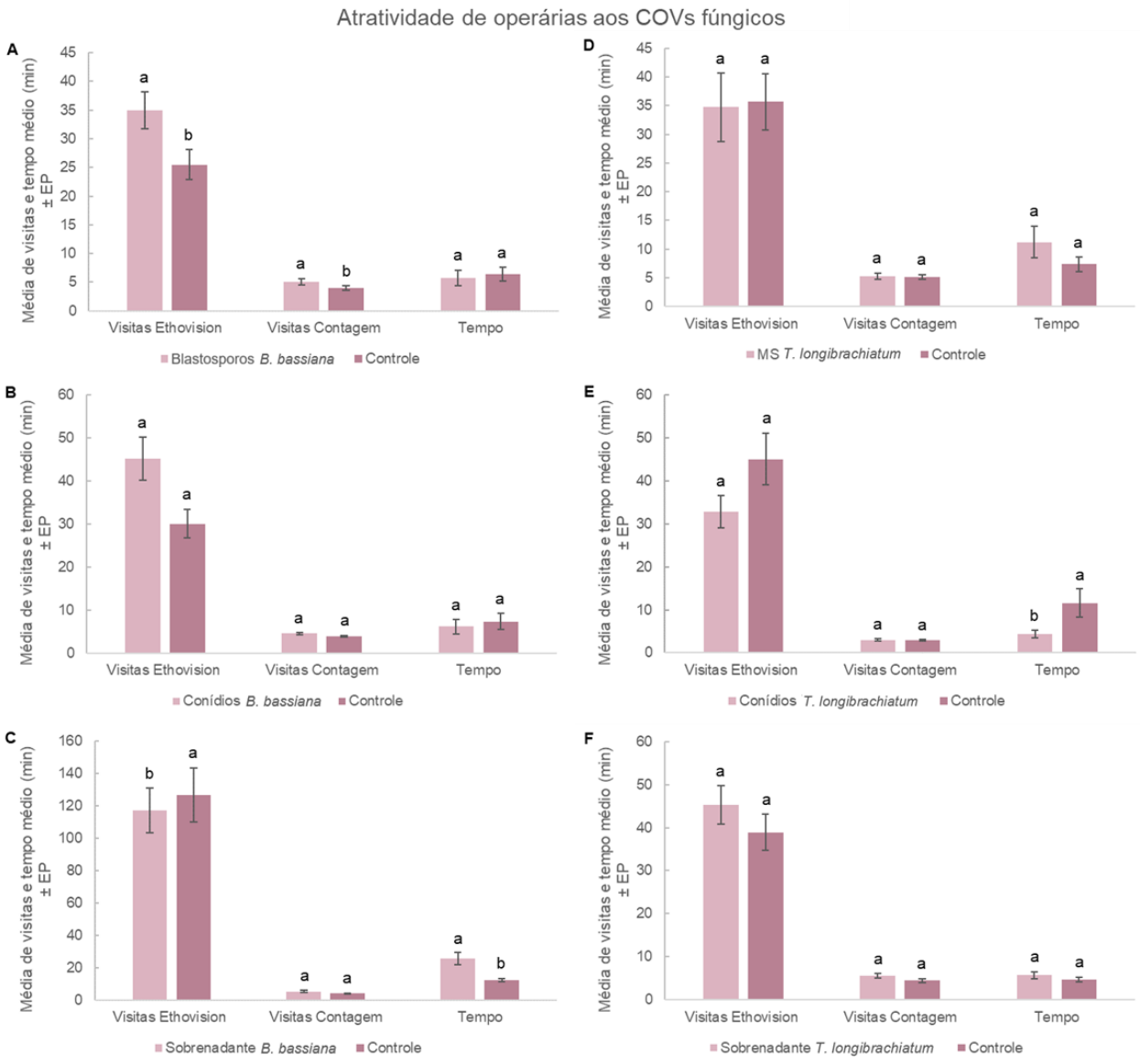

Figura 2 Atratividade de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* aos compostos fúngicos voláteis. Média ± Erro padrão de "Visitas Contagem", "Visitas Ethovision" e tempo médio gasto em cada uma das zonas por operárias de *Atta sexdens rubropilosa.* A: Fonte de odores voláteis extraídos de blastosporos de *Beauveria bassiana*, B: Fonte de odores voláteis extraídos de conídios aéreos de *Beauveria bassiana*, C: Fonte de odores voláteis extraídos do sobrenadante de *B. bassiana*, D: Fonte de odores voláteis extraídos de microescleródios (MS) de *T. longibrachiatum,* E: Fonte de odores voláteis extraídos de conídios aéreos de *T. longibrachiatum*. F: Fonte de odores voláteis extraídos do sobrenadante de *T. longibrachiatum*. Todos os tratamentos foram contrastados com as médias referente a fonte de odor emitido pelo material inerte (controle). As barras seguidas de mesma letra não diferem entre si.

4.2 Atratividade de *A. sexdens rubropilosa* aos compostos fúngicos não voláteis

A análise de variância do número de discos carregados e tempo de carregamento dos discos por *A. sexdens rubropilosa* em cada uma das concentrações utilizadas, 10, 50 e 100% de todos os tratamentos não resultou em diferenças significativas. Nesse sentido, foi utilizada a média de cada uma das variáveis para todas as concentrações.

O número de discos carregados e tempo de carregamento de discos para média de todas as concentrações utilizadas (10, 50 e 100%) demonstraram que as operárias de *A. sexdens rubropilosa* carregaram significativamente um número maior de discos foliares impregnados com extrato dos compostos não voláteis extraídos de blastosporos de *B. bassiana*, em média 8,7±0,8 discos, em comparação à média de discos carregados no controle, que foi igual a 6,5±1,0 discos (p= 0,043). O tempo gasto pelas formigas para o carregamento de 10 discos impregnados com o tratamento foi em média de 7,6±1,3 minutos, não diferindo estatisticamente do tempo de carregamento de discos do controle 9,7±1,6 minutos (p= 0,263).

Ainda para *B. bassiana*, os discos impregnados com compostos não voláteis extraídos dos conídios do entomopatógeno, foram carregados de forma semelhante aos discos impregnados com o solvente puro, não apresentando diferença significativa conforme análise de variância do número de discos carregados (p= 0,511) e do tempo de carregamento (p= 0,243). Os valores médios de número de discos carregados e tempo de carregamento foram 6,6±1,1 discos e 9,1±1,5 minutos para os discos do tratamento e 7,0±1,2 discos e 11,1±1,7 minutos para os discos do controle.

Para os discos impregnados com compostos não voláteis extraídos dos diferentes propágulos de *T. longibrachiatum* (conídios e microescleródios), não houve diferenças significativas entre o número de discos carregados e o tempo de carregamento de 10 discos pelas operárias em comparação aos controles.

Para os conídios de *T. longibrachiatum* o número médio de discos carregados impregnados com compostos não voláteis da estrutura foi igual a 8,1±2,8 discos. A média de discos carregados impregnados com o controle foi igual a 7,0±3,5 discos não diferindo estatisticamente entre si (p= 0,474). Foram carregados em média 8,5±0,6 e 7,0±1,1 discos impregnados com compostos não voláteis extraídos dos microescleródios de *T. longibrachiatum* e controle respectivamente (p=

0,683). O tempo médio de carregamento dos discos tratados com não voláteis de MS *T. longibrachiatum* foi 15,0±4,6 minutos e para os discos do controle, a média de tempo de carregamento foi referente a 18,1±6,3 minutos (*p*= 0,939). O tempo de carregamento dos discos tratados com os extratos de conídios aéreos de *T. longibrachiatum* foi em média de 17,8±5,5 minutos e não diferiu dos discos do controle que foram carregados em média de 11,3±2,9 minutos (*p*= 0,25).

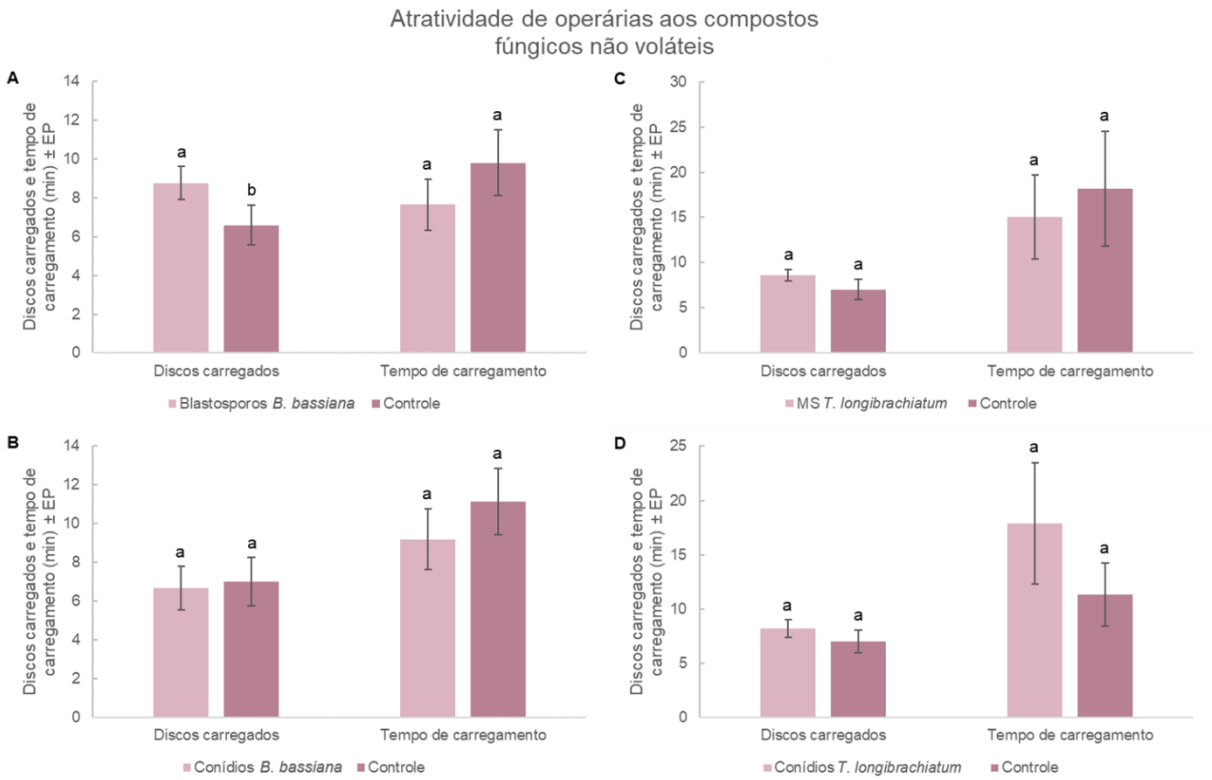

Figura 3 Atratividade de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* aos compostos fúngicos não voláteis. Média de discos carregados e tempo médio de carregamento de 10 discos por operárias de *Atta sexdens rubropilosa* A: Discos impregnados com compostos não voláteis extraídos de blastosporos de *Beauveria bassiana*, B: discos impregnados com compostos não voláteis extraídos de conídios aéreos de *Beauveria bassiana*, C: discos impregnados com compostos não voláteis extraídos de microescleródios (MS) de *T. longibrachiatum*, D: discos impregnados com compostos não voláteis extraídos de conídios aéreos de *T. longibrachiatum*. Todos os tratamentos foram contrastados com as médias referente aos discos impregnados com controle. As barras seguidas de mesma letra não diferem entre si.

4.3 Atratividade de *A. sexdens rubropilosa* às estruturas fúngicas

Para a atratividade das estruturas fúngicas frescas às operárias, não houve nenhuma estrutura considerada atrativa. A análise de variância do número de discos carregados e tempo de carregamento de 10 discos por *A. sexdens rubropilosa* tratados com as diferentes estruturas frescas de *B. bassiana* (blastosporos e conídios) e conídios de *T. longibrachiatum* não diferiram entre si em comparação aos discos tratados com o controle.

O tratamento com MS de *T. longibrachiatum* foi considerado não atrativo, visto que as operárias escolheram carregar significativamente (*p*= <0,001) mais discos do controle onde não havia a presença da estrutura (10±0,05 discos) em relação aos discos tratados com MS frescos (5,5±1,2 discos) e empregaram significativamente mais que o dobro de tempo para carregar os discos tratados com microescleródios, (49,9±8,2 min) em comparação à média de tempo de carregamento de discos do controle cujo valor obtido foi 24,7±5,3 minutos (*p*= 0,029). Em relação aos discos tratados com microescleródios de *T. longibrachiatum*, houve uma interação significativa entre blocos e tratamento, evidenciando que o número de discos carregados dependeu da colônia além do tratamento.

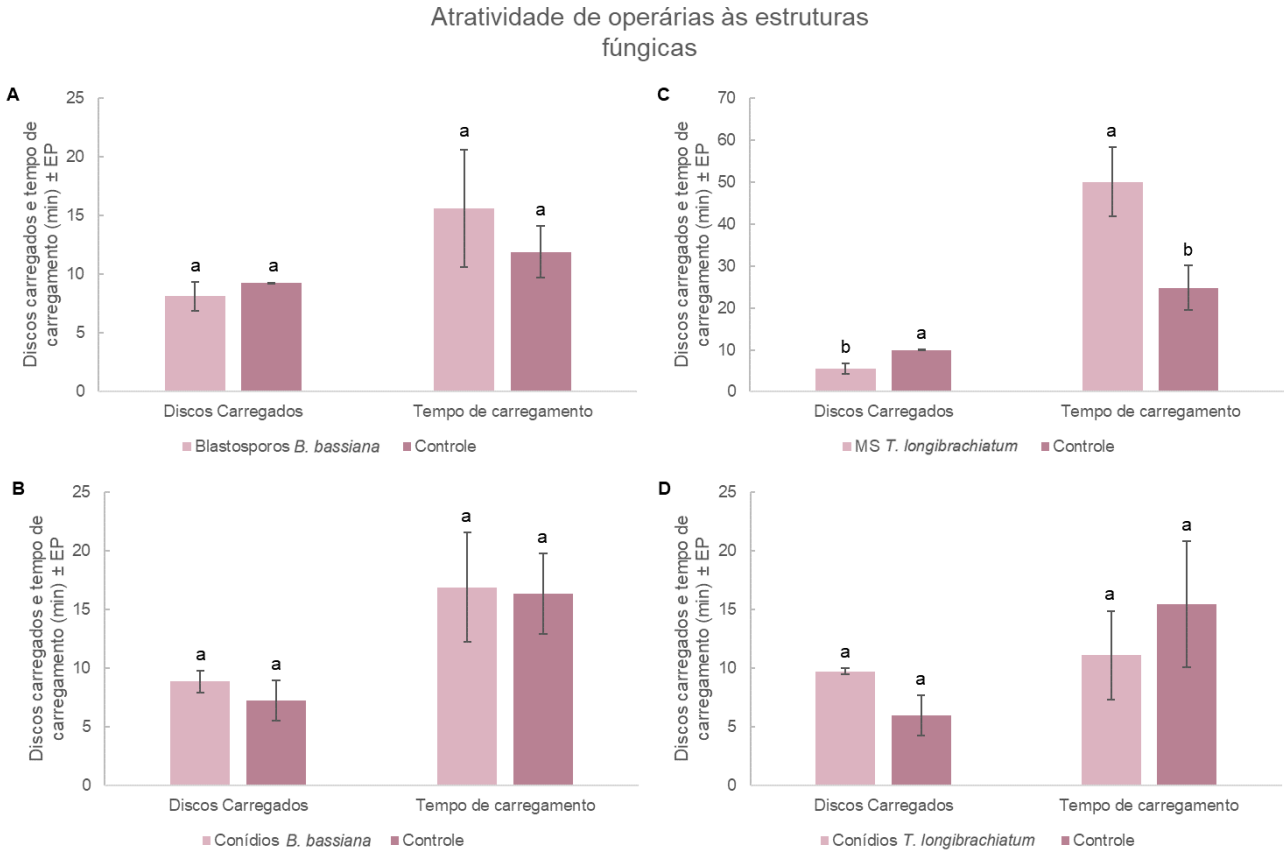

Figura 4 Atratividade de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* às estruturas fúngicas frescas. Média de discos carregados e tempo médio de carregamento de 10 discos por operárias de *Atta sexdens rubropilosa* A: Discos impregnados com blastosporos de *Beauveria bassiana*, B: discos impregnados com conídios aéreos de *Beauveria bassiana*, C: discos impregnados com microescleródios (MS) de *T. longibrachiatum*, D: discos impregnados com conídios aéreos de *T. longibrachiatum*. Todos os tratamentos foram contrastados com as médias referente aos discos impregnados com controle. As barras seguidas de mesma letra não diferem entre si.

4.4 Preferência de *A. sexdens rubropilosa* aos COVs, não voláteis e estruturas de *B. bassiana*

Nos bioensaios para determinação da preferência de *A. sexdens rubropilosa* aos compostos voláteis liberados por blastosporos e conídios de *B. bassiana*, após análise de variância (p= 0,01), os voláteis liberados pelos conídios foram considerados preferidos (41,1±4,1 visitas), pois receberem significativamente mais visitas (Método Ethovision) que os blastosporos (34,6±4,5 visitas). Para preferência aos compostos não voláteis e estruturas, não houve preferência por carregaremento de discos impregnados com blastosporos ou conídios de *B. bassiana*, embora os discos impregnados com conídios tenham sido numericamente mais carregados em ambos os casos (Figura 5).

O tempo (preferência voláteis) e tempo médio de carregamento de discos (preferência não voláteis e preferência estruturas) não diferiu entre os tratamentos.

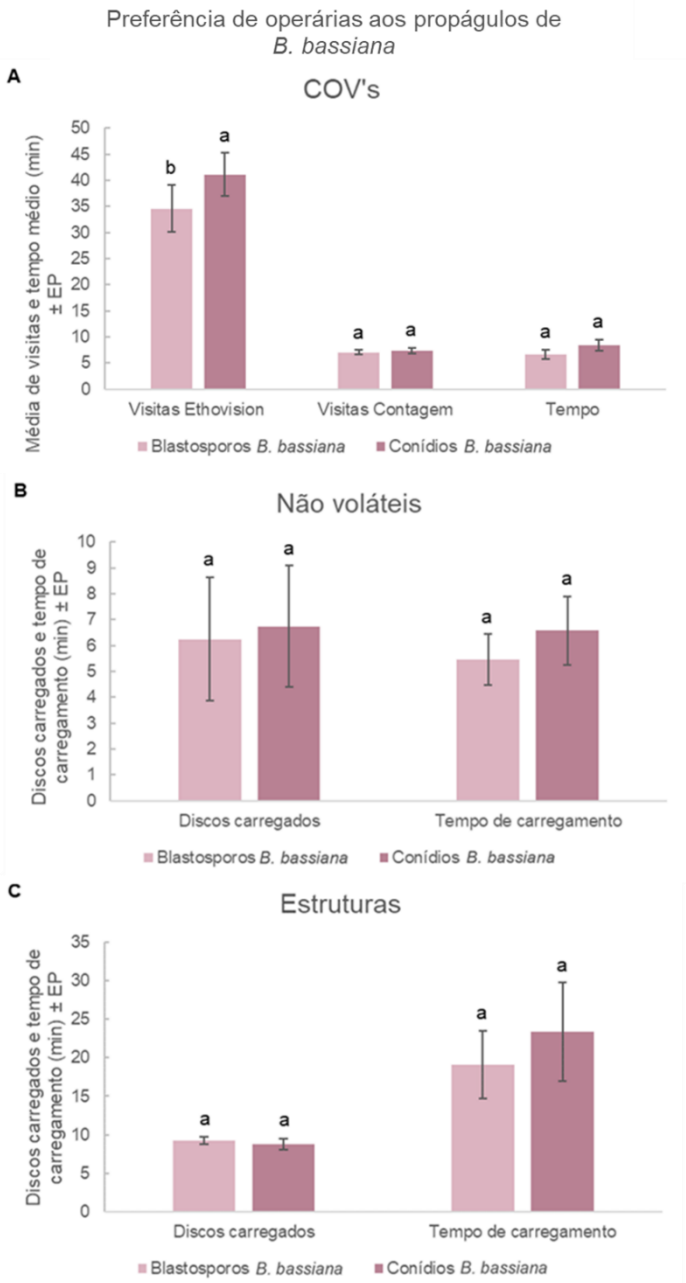

Figura 5 Preferência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* aos compostos voláteis (A), não voláteis (B) e as estruturas (C) dos diferentes propágulos produzidos por *Beauveria bassiana*: blastosporos e conídios. A: Média de visitas (Contagem e Ethovision) e tempo médio acumulado gasto em minutos de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* em cada uma das zonas de emissão de voláteis liberados por blastosporos e conídios de *Beauveria bassiana*. B: Número de discos carregados e tempo de carregamento (minutos) de 10 discos impregnados com compostos não voláteis extraídos de blastosporos e conídios de *Beauveria bassiana* por operárias de *Atta sexdens rubropilosa*. C: Número de discos carregados e tempo de carregamento (minutos) de 10 discos impregnados com blastosporos e conídios frescos de *Beauveria bassiana* por operárias de *Atta sexdens rubropilosa.* Barras seguidas por letras iguais, não diferem significativamente entre si.

4.5 Comportamentos higiênicos de *A. sexdens rubropilosa* em contato com propágulos fúngicos

Após o teste de comparação de médias, foi possível verificar que houve diferença estatística ao nível de 5% de significância entre os tratamentos para o comportamento de *self-grooming* (*p*= 0,0005). As operárias de *A. sexdens*

rubropilosa em contato com conídios de *B. bassiana* apresentaram significativamente a maior frequência média do comportamento (111,2±2,8) em comparação aos demais, especialmente em comparação aos blastosporos produzidos pelo mesmo fungo onde a média de *self-grooming* exibidos pelas operárias submetidas a este tratamento foi igual a 68,7±7,0.

Para as demais variáveis, *weeding* e *allogrooming*, não foram encontradas diferenças significativas na frequência de comportamentos higiênicos exibidos por operárias generalistas de *A. sexdens rubropilosa* em contato com os diferentes propágulos fúngicos de *B. bassiana* e *T. longibrachiatum.* No entanto, a frequência de *weeding* realizados por operárias submetidas ao tratamento com microescleródios de *T. longibrachiatum* (8,5±2,2) foi ligeiramente maior em relação às operárias tratadas com conídios do micoparasita (2±0,8), porém não houve diferença significativa.

Independentemente do tratamento, o *self-grooming* foi o comportamento mais empregado pelas operárias, o qual foi exibido em um total de 347 vezes durante o período de observações. Por outro lado, os eventos de *weeding* e *allogrooming* foram muito menos frequentes, apenas um total de 20 e 11 exibições, respectivamente. Todos os comportamentos higiênicos foram exercidos com menor frequência no tratamento controle.

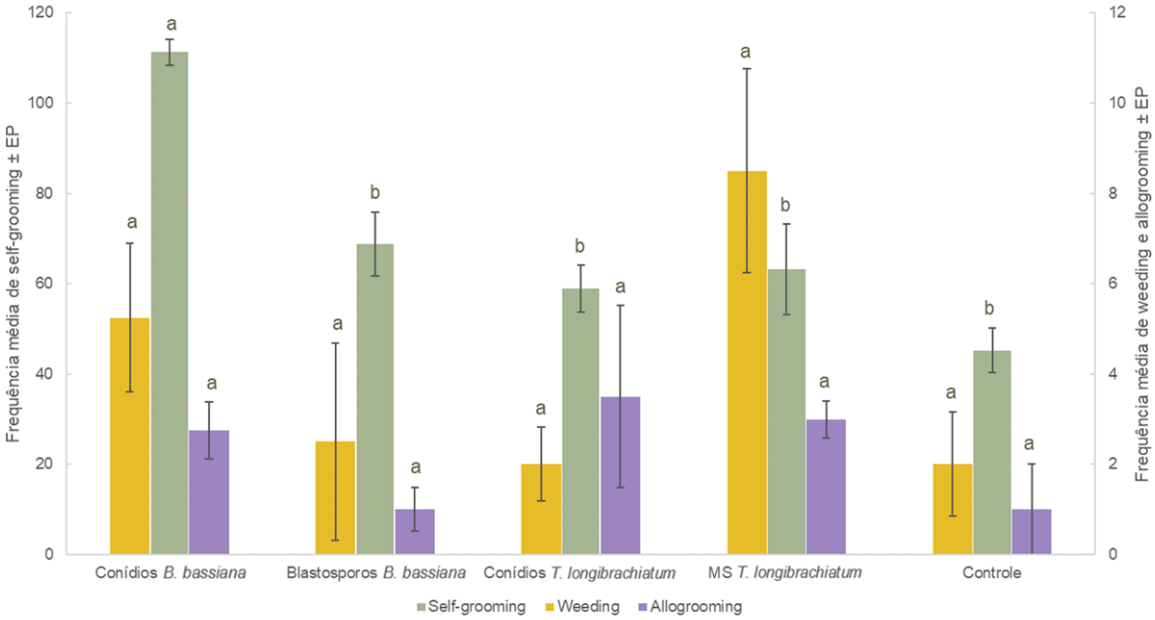

Figura 6 Frequência média de self-grooming, allogrooming e weeding exibidos por operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas aos tratamentos: conídios de *Beauveria bassiana*, blastosporos de *Beauveria bassiana*, conídios de *T. longibrachiatum* sp, microescleródios de *T. longibrachiatum* e Controle (suspensão sem estruturas fúngicas 0,05% Tween 80). Barras seguidas por letras iguais, não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey.

4.6 Sobrevivência de *A. sexdens rubropilosa* expostas aos propágulos fúngicos de *B. bassiana*

As curvas de sobrevivência para operárias de *A. sexdens rubropilosa* após a exposição a conídios ou blastosporos de *B. bassiana* e seu respectivo controle são mostradas na Figura 7.

A análise de sobrevivência revelou que os blastosporos (p= 0,00019) e conídios (p= 0,00047) de *B. bassiana* reduziram significativamente a sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* através da aplicação direta por pulverização em relação ao grupo controle, mas os tratamentos não diferiram entre si (p= 0,829) pelo teste de log-rank. Os blastosporos de *B. bassiana* causaram mortalidade em 86,7% (IC- 71,9- 93,6%) das operárias submetidas ao tratamento no 7º dia. A mortalidade causada pela aplicação de conídios de *B. bassiana* atingiu a taxa de 82,2% (IC- 66,7- 90,5%) de mortalidade no 7º dia após aplicação. No mesmo período, 40% das operárias tratadas com a solução controle morreram (IC- 52,7- 23,8%).

Quanto ao tempo para causar mortalidade em 50% dos indivíduos (tempo letal mediano- TL_{50}), o valor de TL_{50} para formigas tratadas com blastosporos de *B. bassiana* foi 3,5 dias (IC- 2,7 – 4,3), para formigas tratadas com conídios o valor de TL_{50} foi 3,7 dias (IC- 3,3- 4,1) e 10,5 dias (IC- 6,93- 33,1) para formigas tratadas com solução de Tween (controle). Com base na sobreposição dos intervalos de confiança, o TL_{50} dos tratamentos com propágulos fúngicos diferiu significativamente dos controles, mas não diferiram entre si.

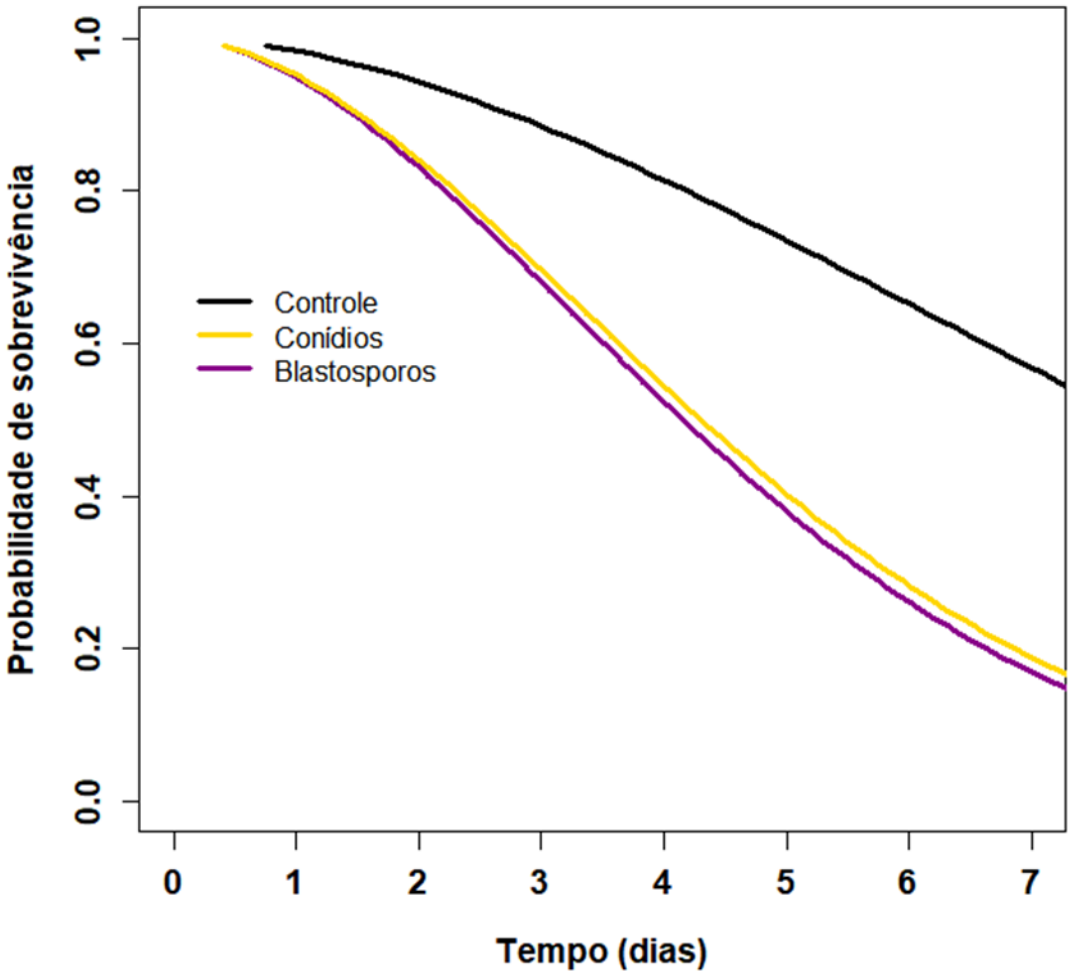

Figura 7 Curvas de sobrevivência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* submetidas à aplicação direta por pulverização de blastosporos de *Beauveria bassiana*, conídios de *Beauveria bassiana* e controle. Os resultados são a probabilidade de sobrevivência média de cada grupo de cinco formigas por placa de Petri, com um total de 45 formigas utilizadas por tratamento. Tratamento com conídios e blastosporos de *Beauveria bassiana* diferem do controle (p= 0,00047 e p= 0,00019). Tratamentos com blastosporos e conídios de *Beauveria bassiana* não diferem entre si pelo teste de log-rank (p= 0,829).

4.7 Microscopia eletrônica de varredura

As micrografias mostraram que havia propágulos remanescentes nas cutículas das operárias, mesmo aquelas que tiveram a possibilidade de realização de *self-grooming* e *allogrooming* pelos períodos de 30 e 60 minutos após aplicação das suspensões fúngicas sobre o tegumento das formigas. Os conídios apareceram depositados em menor quantidade em comparação aos blastosporos em todos os períodos avaliados.

Em ambos os propágulos, frequentemente se formavam aglomerados, mas também estavam presentes como propágulos individuais, em várias partes da cutícula de operárias de *A. sexdens rubropilosa* como cabeça, abdome e mandíbulas. As superfícies irregulares do tegumento, especialmente as regiões inter segmentares e concavidades presentes na base das sensilas, demonstraram serem áreas com grande deposição das estruturas fúngicas (Figura 8).

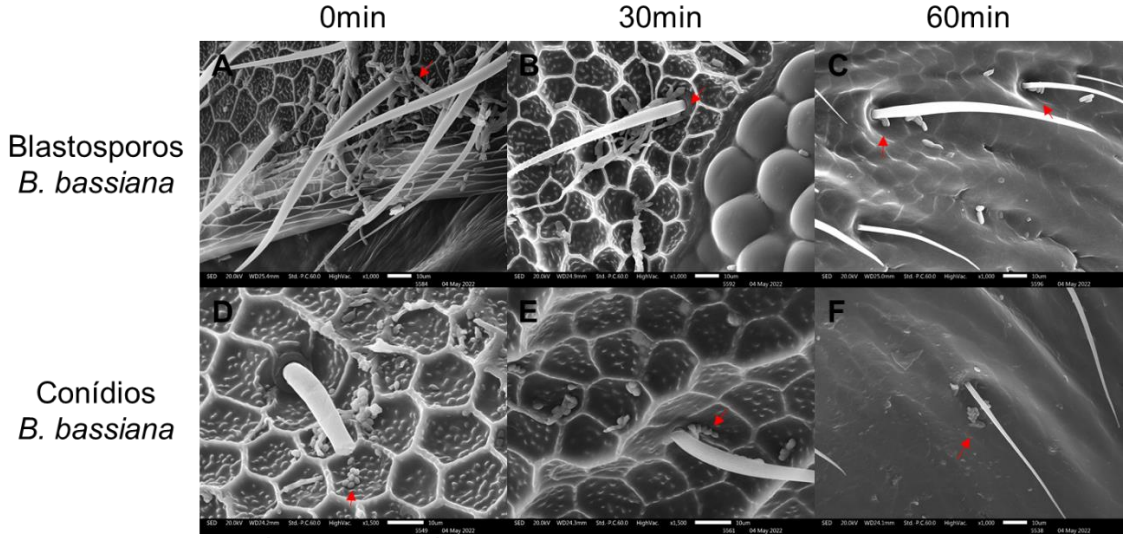

Figura 8 Regiões da cutícula de operárias de *A. sexdens rubropilosa*, contendo blastosporos de *Beauveria bassiana* (A-C), e conídios de *Beauveria bassiana* (D-F). Exemplares submersos em solução de $1x10^8$ blastosporos mL^{-1} que não tiveram a possibilidade de realizar *grooming* (0min- A) e que tiveram a possibilidade de realizar *grooming* por 30 e 60 minutos após aplicação (30 min –B) e (60 min- C). Exemplares submersos em solução de $1x10^8$ conídios mL^{-1} que não tiveram a possibilidade de realizar *grooming* (0min- D) e que tiveram a possibilidade de realizar *grooming* por 30 e 60 minutos após aplicação (30 min –E) e (60 min- F). A: aglomerados de blastosporos nas áreas interssegmentares da região do abdome, B: aglomerados de blastosporos na região da cabeça, C: blastosporos na região da mandíbula, D e E: aglomerados de conídios na região da cabeça, F: aglomerados de conídios na região da mandíbula. Setas vermelhas (A-F): propágulos depositados preferencialmente à base das sensilas e concavidades do tegumento. Barra de escala: 10 µm.

4.8 Compostos orgânicos voláteis fúngicos

A partir da análise GC-MS foi possível identificar os compostos oriundos dos diferentes propágulos produzidos por *B.bassiana*. Foram identificados 20 compostos liberados por blastosporos e 25 compostos emitidos por conídios de *B. bassiana*. Cinco compostos, sendo eles o 2-etil-1-hexanol, nonanal, nonadecano, dodecano e 2-metil tetracosano foram identificados como constituintes comuns do perfil cromatográfico das duas estruturas. Os conídios aéreos de *B. bassiana* apresentaram maior diversidade de compostos exclusivos em comparação aos compostos exclusivos oriundos de blastosporos, tendo seu perfil composto por 20 e 15 compostos exclusivos respectivamente (Figura 9).

Os nomes dos compostos e respectivos peso molecular (PM), fórmula química (FQ) e tempo de retenção (RT) são apresentados na Tabela 1. A maioria dos compostos estavam em classes de alcano, álcoois, aldeídos, benzeno e cetona.

Os compostos 2-etil-1-hexanol, nonanal, nonadecano, dodecano e 2-metil tetracosano foram identificados como constituintes comuns do perfil cromatográfico das duas estruturas.

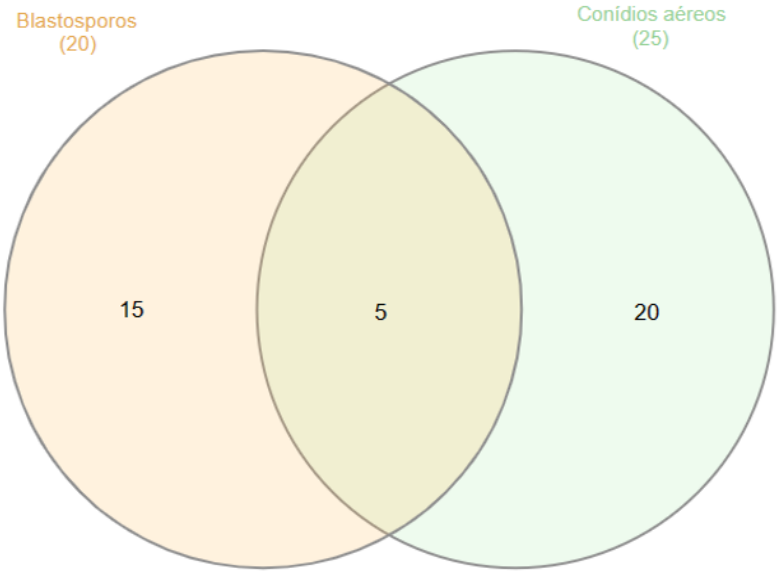

Figura 9 Diagrama de Venn representando diversidade de constituintes exclusivos e constituintes em comum do perfil cromatográfico de cada um dos propágulos produzidos por *Beauveria bassiana.*

Tabela 1. Compostos orgânicos voláteis constituintes do perfil cromatográfico de blastosporos e conídios de *B. bassiana*.

Propágulo fúngico	Composto	Peso molecular (PM)	Fórmula química (FQ)	T.R (min)
Blastosporos de *B.bassiana*				
1	Octano,2,2-dimetil	142	C10H22	12,30
2	Nonano	142	C9H20	12,95
3	2-etil-1-hexanol*	130	C8H18O	13,25
4	Undecano	156	C11H24	13,25
5	2-octeno,3,7-dimetil	140	C10H20	14,58
6	2-acetilciclopentanono	126	C7H10O2	15,05
7	Decanol	158	C10H220	15,52
8	Nonanono	142	C9H18O	15,91
9	Nonanal*	142	C9H18O	16,12
10	Benzeno propan-2-ona	136	C9H12O	17,19
11	(2-metoxietenil)-, (Z)- benzeno	134	C9H10O	18,23
12	Nonadecano*	268	C19H4O	18,68
13	Decano-3,8-dimetil	170	C12H26	19,52
14	Dodecano*	170	C12H26	20,24
15	Heptadecano,7-metil	254	C18H38	23,81
16	9-metillheptadecano	254	C18H38	24,24
17	2-metiltetracosano*	352	C25H52	20,40
18	1-Hexadecanal	242	C16H34O	24,71
19	2-metiltetracosano*	352	C25H52	25,00
20	Nonadecano,9-metil	282	C20H42	28,68
21	2-metillhexacosano*	380	C27H56	34,15
22	2-metilhexacosano*	380	C27H56	34,89

Conídios de *B.bassiana*				
1	2-Heptanono,6-Metil	128	C8H16O	10,90
2	2-octanona	128	C8H16O	12,19
3	Octanal	128	C8H16O	12,55
4	Heptano2,2,4,6,6-pentametil	170	C12H26	12,96
5	1-Hexanol, 2-etil*	130	C8H18O	13,72
6	2-heptanono,4,6-dimetil	142	C9H18O	14,08
7	2-Octenal	126	C8H14O	14,24
8	2-Dodecanono	184	C12H24O	14,33
9	2-Undecanono,6,10-dimetil	198	C13H260	14,56
10	1-Octanol	130	C8H18O	15,06
11	2-Nonanono	142	C9H18O	15,52
12	Nonanal*	142	C9H18O	15,89
13	2-Isopropil-5-oxohexanal	156	C9H16O2	16,79
14	2-Undecanono,6,10-dimetil	198	C13H260	17,45
15	Etanona,1(-4-metilfenil)	134	C9H10O	17,95
16	Nonadecano*	268	C19H40	18,25
17	Pentadecanono,6,10-14-trimetil	268	C18H36O	18,67
18	Decanal	156	C10H20O	19,02
19	Dodecano*	170	C12H26	19,53
20	1-Hexadeceno	224	C16H32	19,86
21	Tetracontano, 3,5,24-trimetil	604	C43H88	19,99
22	Octano,1,1-Oxibis	242	C16H34O	21,66
23	2-Octilbenzoato	234	C15H22O2	22,33
24	Ácido octanóico	382	C25H50O2	24,27
25	2-metiltetracosano*	352	C25H52	24,46
26	(2-Dodecen-1-il) anidro acético	266	C16H26O3	28,81

*compostos em comum

5 DISCUSSÃO

Embora existam estudos buscando elucidar interações entre formigas-cortadeiras e microrganismos invasores (CURRIE; MUELLER; MALLOCH, 1999; PAGNOCCA; MASIULIONIS; RODRIGUES, 2012; RODRIGUES et al., 2008, 2011), este é o primeiro estudo que comparou os comportamentos higiênicos, de atratividade e preferência de operárias de *A. sexdens rubropilosa* em contato com os propágulos fúngicos microescleródios e blastosporos, produzidos via fermentação submersa, em comparação aos conídios aéreos do fungo entomopatogênico *B. bassiana* e do micoparasita *T. longibrachiatum*. Os resultados evidenciaram que os compostos voláteis e não voláteis oriundos de blastosporos de *B. bassiana* são atrativos às operárias de *A. sexdens rubropilosa* quando contrastados com material inerte. Quando blastosporos foram contrastados com conídios, as operárias preferiram significativamente os COVs emitidos pelos conídios aéreos de *B. bassiana*.

A análise cromatográfica dos perfis voláteis de blastosporos e conídios aéreos de *B. bassiana* revelou uma grande diversidade de compostos. Cada estrutura produzida pelo fungo emitiu um padrão de voláteis específico, no entanto, alguns compostos foram comuns a ambos os propágulos, entre eles, o 2-etil-1-hexanol. De fato, este composto foi descrito como majoritário do perfil de *B. bassiana* por outros autores, representando cerca de 45% de toda a composição química dos voláteis emitidos (AVERY et al., 2022). Com isso, sugere-se que este metabólito onipresente nos perfis voláteis pode ter sido responsável por desempenhar um papel na mediação da resposta atrativa desencadeada em operárias de *A. sexdens rubropilosa*, e deve ser testado isoladamente em formigas-cortadeiras para confirmação de seu potencial como atrativo.

Em concordância com esta hipótese, abelhas (*Bombus impatiens*) são atraídas por voláteis emitidos por néctar alterado por microrganismos. Testes de eletroantenografia (EAG) demonstraram que este álcool, 2-etil-1-hexanol, isoladamente, provocou forte resposta de despolarização de EAG, evidenciando que os neurônios olfativos das abelhas foram altamente sensíveis a este composto (SCHAEFFER et al., 2019). O 2-etil-1-hexanol também é atrativo à abelhas melíferas (*Apis mellifera*) e a atração é ainda mais significante em colmeias cujo ar foi impregnado com o volátil, visto que, nessas colmeias, ~70% das visitas feitas por forrageiras foram em estações de alimentação contendo o composto, em

comparação às colmeias que não tiveram o ar inundados com o volátil (JAKOBSEN et al., 1995). O 2-etil-1-hexanol é constituinte também do perfil volátil de várias espécies de flores silvestres (CROWLEY-GALL et al., 2021), e é correlacionado positivamente com insetos forrageadores de flores (DU et al., 2018), como as formigas-cortadeiras. Além disso, 2-etil-1-hexanol oriundo de isolado de *B. bassiana* foi correlacionado como bioativo a outros insetos, como a mariposa-praga, da espécie *Ostrinia furnacalis*, que são atraídas pelos voláteis e preferiram ovipositar em plantas de milho inoculadas com o fungo *B. bassiana*, comparativamente, o número de ovos em plantas inoculadas foi cerca de três vezes maior em relação às plantas do controle (ZHU et al., 2022). Outros compostos identificados no perfil cromatográfico de *B. bassiana* como o nonanal e o decanal são frequentemente relatados como metabólitos responsáveis pela atração de insetos-praga (MOLNÁR et al., 2015) e inimigos naturais (HORI; ENYA, 2013).

Este estudo comparou qualitativamente os compostos oriundos dos diferentes propágulos de *B. bassiana*, ainda, análises quantitativas dos voláteis emitidos por blastosporos e conídios de *B. bassiana* seriam úteis para comparar a concentração dos componentes entre as diferentes estruturas. As formigas-cortadeiras demonstraram uma preferência pelos voláteis de conídios aéreos em comparação aos COVs emitidos por blastosporos. Tal resposta olfativa exibida pelas operárias pode estar atrelada não somente aos constituintes particulares da mistura de voláteis, mas também às proporções específicas de compostos onipresentes (BRUCE; WADHAMS; WOODCOCK, 2005), indicando que os conídios de *B. bassiana* emitem compostos em uma concentração preferida pelas operárias de *A. sexdens rubropilosa*.

Existem inúmeros casos em que voláteis emitidos por microrganismos estão associados a mudanças de comportamentos em insetos. Testes de atratividade anteriores demonstraram que *B. bassiana* é atrativa a diferentes espécies (BRÜTSCH et al., 2014; CAPPA et al., 2019; GEORGE et al., 2013; PONTIERI et al., 2014; ZHU et al., 2022). No entanto, em sua maioria, os estudos evidenciam que os insetos foram repelidos pelo entomopatógeno (DAVIS et al., 2013). Por exemplo, Yanagawa et al. (2011) encontraram em cupins (*Coptotermes formosanus*) uma forte aversão aos voláteis emitidos pelo entomopatógeno *B. bassiana.* Por outro lado, estudo realizado por Hussain et al. (2010) indicou que esses cupins não

reconheceram prontamente os voláteis liberados por *B. bassiana* e, consequentemente, não adotaram comportamento de evitação.

Aparentemente, a resposta comportamental dos insetos aos compostos liberados por microrganismos variam entre atração, repelência ou resposta neutra (WEISSKOPF; SCHULZ; GARBEVA, 2021), e depende fortemente do perfil volátil, visto que diferentes isolados do fungo *B. bassiana* apresentam diferentes níveis de repelência (MBURU; MANIANIA; HASSANALI, 2013). Entretanto, os estudos citados demonstraram o comportamento de insetos em relação aos voláteis emitidos somente por conídios, e resultados em relação aos blastosporos são escassos. Nesse sentido, Wright, Connick e Jackson (2003) relataram que blastosporos de outro fungo entomopatogênico, *Cordyceps fumosorosea,* mostraram-se muito menos repelentes aos cupins subterrâneos (*Coptotermes formosanus*), quando comparados aos conídios aéreos. Neste caso, 89% dos cupins escavaram seus túneis em areia incorporada com preparação seca de blastosporos e terra diatomáceas e atingiram o fundo do tubo em 7 dias, enquanto apenas 7% dos cupins adotaram seu comportamento comum de tunelamento em areia tratada com conídios aéreos, sendo repelidos pelos voláteis oriundos dos conídios. Estes resultados corroboram com os testes de atratividade de *A. sexdens rubropilosa* aos COVs de blastosporos e conídios aéreos de *B. bassiana* onde foi constatada a atratividade dos blastosporos. Fica evidente o papel de COVs destas estruturas fúngicas sobre a resposta comportamental das formigas. Tais respostas podem ser a chave para a adoção de novas estratégias de uso destes propágulos ao combate destes insetos quando pragas agrícolas importantes, principalmente aos insetos sociais cujo comportamento é um fator limitante ao uso destes microrganismos como agentes de controle, como no caso das formigas-cortadeiras.

Certamente, mais estudos comportamentais utilizando diferentes propágulos fúngicos devem ser feitos, pois ainda há uma lacuna no conhecimento do comportamento em relação às diferentes estruturas. No entanto, a repelência dos isolados fúngicos pode ser minimizada a depender do tipo de formulação, concentração e propágulos utilizados (JACKSON; DUNLAP; JARONSKI, 2010).

Além dos compostos voláteis de blastosporos de *B. bassiana* atrativos, os compostos não voláteis desta estrutura também atraíram as operárias, indicando que ambos foram importantes para o reconhecimento da estrutura e que as formigas integraram as pistas gustativas e olfativas para tomar decisões de forrageamento.

Em contraste com os resultados obtidos por Schaeffer et al., (2019) em testes de escolha em olfatômetro, abelhas foram atraídas por uma mistura de COVs emitida por microrganismos, porém em testes de alimentação, a resposta gustativa foi diferente, e as abelhas não foram atraídas e consumiram menos néctar colonizado.

Diferentemente dos voláteis emitidos por *B. bassiana*, os ensaios mostraram que os voláteis emitidos pelos conídios de *T. longibrachiatum* não foram atrativos às operárias de *A. sexdens rubropilosa*. De forma contrária, mesmo que *Trichoderma* seja relatado como prejudicial ao fungo mutualista cultivado por cupins (MATHEW et al., 2012), testes de atratividade anteriores mostraram que cupins cultivadores de fungos exibiram resposta neutra em relação aos voláteis emitidos por conídios de *Trichoderma*, uma vez que o cupim (*Odontotermes formosanus)* se agregou no solo independentemente se estava tratado ou não com conídios do micoparasita (XIONG et al., 2018).

Sendo assim, o reconhecimento de odores relacionados às infecções é particularmente importante em insetos sociais, pois a detecção precoce e a remoção eficiente do parasita reduzem a propagação de fungos indesejáveis dentro dos ninhos (SWANSON et al., 2009). Além disso, a percepção do odor relacionado a parasitas pelos insetos parece desempenhar um papel no mecanismo de seu comportamento de higiene (MBURU et al., 2009).

Além das substâncias voláteis e não voláteis que são elementos chave para atração, o contato físico das operárias com as estruturas é igualmente importante. Nos testes de atratividade às estruturas, quando foi oferecido folhas cobertas por blastosporos ou conídios frescos do entomopatógeno *B. bassiana*, as operárias coletaram e transportaram as folhas contaminadas e as folhas livres de patógeno na mesma proporção. Como foi demonstrado também para formigas necrófagas, que ao receber alimento coberto por conídios de *Metarhizium*, as forrageadoras de *Myrmica rubra* foram tão propensas a recuperar esse item alimentar quanto um alimento isento de esporos, ou seja, em testes de escolha, em 50% das vezes, as formigas carregaram um alimento coberto por altas concentrações de conídios, não discriminando de itens não contaminados (PEREIRA; DETRAIN, 2020).

Quanto às folhas tratadas com estruturas frescas de *T. longibrachiatum*, as operárias foram favoráveis ao carregamento de folhas tratadas com conídios do micoparasita tanto quanto as folhas sem a presença de propágulos fúngicos. Estudos anteriores de aceitação revelaram que iscas contendo *Trichoderma*

harzianum encapsulado foram consideradas bem aceitas por colônias de *Atta sexdens*, visto que as operárias transportaram aproximadamente 40% da quantidade total de grânulos disponíveis, que reduziu 30% do volume do fungo cultivado em 15 dias (SILVA et al., 2020). Por outro lado, as operárias carregaram significativamente menos folhas incorporadas com MS frescos de *Trichoderma*.

É incontestável que os microescleródios são muito maiores que os conídios, apresentando tamanho médio de cerca de 90-600 µm de diâmetro (KOBORI et al., 2015). Esta característica provavelmente facilitou o reconhecimento e rejeição pelas operárias. Além disso, o tempo de carregamento dessas folhas incorporadas com MS foi muito maior em relação ao tempo de carregamento das folhas do controle. Vale ressaltar que durante os experimentos, notou-se que o comportamento de limpeza dos discos foliares foi evidente durante o carregamento, especialmente nos discos impregnados com MS de *T. longibrachiatum*, o que provavelmente aumentou consideravelmente o tempo de carregamento desses discos. É notável que as formigas-cortadeiras possuem o hábito de limpar cuidadosamente o substrato coletado (FINE LICHT; BOOMSMA, 2010; GARRETT et al., 2016). Inclusive, há evidências de que as operárias gastam mais tempo processando e selecionando folhas de vegetais colonizadas endofiticamente por fungos (VAN BAEL et al., 2009). Em geral, as formigas selecionam o substrato coletado com base em diversos fatores, e a adequação do material vegetal para o fungo mutualista é levada em consideração (VERZA et al., 2007). Portanto, é provável que as operárias tenham carregado significativamente menos discos impregnados com microescleródios de *T. longibrachiatum* com base na adequação do substrato, visto que *Trichoderma* é altamente antagônico e parasita do fungo cultivado, *L. gongylophorus* (CURRIE; MUELLER; MALLOCH, 1999; LOPEZ; ORDUZ, 2003; ORTIZ; ORDUZ, 2001).

As respostas comportamentais das formigas dependem da natureza dos fungos aos quais elas são expostas, e parecem ser específicas de acordo com o propágulo fúngico. No geral, os resultados obtidos nos bioensaios de comportamentos higiênicos revelaram uma mudança comportamental das formigas em contato com propágulos fúngicos. De forma semelhante a estudos que mostraram que a presença de diversos parasitas (BOS et al., 2012) e, em particular, do fungo patogênico *B. bassiana* (KONRAD et al., 2018), estimularam comportamentos higiênicos em formigas. O presente trabalho mostrou que as frequências de *self-grooming* exibidas pelas subcolônias expostas aos conídios

aéreos de *B. bassiana* foram superiores em relação às colônias não expostas a patógenos. No entanto, outros propágulos fúngicos não alteraram o comportamento das operárias em relação ao controle. A percepção pelos insetos do odor relacionado ao patógeno parece desempenhar um papel no mecanismo de seu comportamento de higiene (MBURU et al., 2009) nos ensaios de atratividade aos odores voláteis, as formigas também foram capazes de reconhecer e moldar seus comportamentos em relação aos diferentes propágulos fúngicos.

Esta evidência está de acordo com relatórios anteriores que descreveram que formigas-cortadeiras aumentam significativamente as frequências de *self-grooming* após o contato com entomopatógenos (TRANTER et al., 2015), bem como, a duração do comportamento é maior quando expostas a entomopatógenos e micoparasitas (MORELOS-JUÁREZ et al., 2010). Este comportamento tem sido observado em várias espécies de formigas cortadeiras, incluindo *A. sexdens* (SILVA CAMARGO; PUCCINI; FORTI, 2017). Por exemplo, *A. cephalotes* aumentou a frequência de auto-limpeza após tratamento com conídios de *T. longibrachiatum*, sendo que antes da exposição ao micoparasita, a frequência de *allogrooming* exibida durante uma hora era em média 295 eventos, e após o tratamento com os conídios, aumentou para cerca de 500 eventos.

A frequência de *self-grooming* foi significativamente maior nas subcolônias em contato com conídios aéreos de *B. bassiana*. Porém, para as subcolônias expostas aos blastosporos deste entomopatógeno, a quantidade de *self-grooming* exibida pelas operárias foi quase duas vezes menor em comparação à primeira estrutura. De fato, as formigas-cortadeiras são capazes de reconhecer conídios (GOES et al., 2020; QIU et al., 2014; WALKER; HUGHES, 2009) e, consequentemente, o reconhecimento desencadeia respostas higiênicas (GOES et al., 2020). No entanto, não se sabe se as formigas são capazes de reconhecer blastosporos.

Os diferentes propágulos de *B. bassiana* apresentam características morfológicas, bioquímicas e patológicas distintas (HOLDER et al., 2007) que podem ter influenciado no reconhecimento e consequente diferenças de *self-grooming*. A aprendizagem associativa também pode estar relacionada ao reconhecimento de microrganismos nocivos no interior dos ninhos. Nas situações em que as estruturas nunca tenham causado resultados negativos antes, as operárias talvez não sejam capazes de reconhecer prontamente e atuar em defesas específicas (GOES et al.,

2020). Os blastosporos, diferentemente dos conídios, não são comuns nos formigueiros, somente sendo encontrados no interior de corpos de insetos infectados por patógenos fúngicos (MASCARIN; JARONSKI, 2016). Este fato sugere, então, que as formigas não conseguiriam detectar essas estruturas por aprendizagem associativa.

Até mesmo para as colônias não tratadas com estruturas fúngicas, a frequência de *self-grooming* foi alta. Sabe-se que este comportamento pode ser uma resposta a infecção fúngica após a detecção de microrganismos estranhos, mas também é utilizada pelas formigas como medida profilática, direcionado à proteção de indivíduos vulneráveis, independentemente da detecção de patógenos (MORELOS-JUÁREZ et al., 2010). Além disso, esse comportamento possui outras funções, como por exemplo, são importantes na manutenção da homogeneidade do odor da colônia (RICHARD; ERRARD, 2009).

No entanto, é interessante do ponto de vista do controle microbiano, a frequência de *self-grooming* ter sido significativamente menor no tratamento com os blastosporos de *B. bassiana* em comparação aos conídios aéreos, pois os blastosporos podem ser ainda mais virulentos do que os conídios para diferentes hospedeiros (IWANICKI et al., 2018; JACKSON et al., 1997; MASCARIN et al., 2015a, 2015b; MASCARIN; JARONSKI, 2016). De forma complementar, espera-se que a alta frequência de defesas comportamentais contra infecções aumente a sobrevivência das formigas ou do jardim de fungos (YEK; BOOMSMA; SCHIØTT, 2013) e de forma contrária para a menor intensidade desses comportamentos, favorecendo o potencial uso de blastosporos no controle microbiano desta praga.

Além disso, os comportamentos higiênicos reduzem as taxas de infecção de formigas expostas, pois remove os conídios antes de penetrar na cutícula (OKUNO et al., 2012). Nesse sentido, um propágulo com maior rapidez na germinação, como os blastosporos (BERNARDO et al., 2018) seria vantajoso sob a perspectiva do controle microbiano, visto que menor será o tempo de exposição aos comportamentos defensivos empregados pelas operárias.

Subcolônias de *A. sexdens rubropilosa* não apresentaram diferenças significativas nas frequências de *allogrooming* exibidos por operárias que foram expostas a diferentes propágulos fúngicos e não expostas. Os resultados estão de acordo com a maioria dos estudos das relações formigas-patógenos, demonstrando que a frequência de *allogrooming* não depende da contaminação fúngica (COTAZO-

CALAMBAS et al., 2022; REBER et al., 2011; THEIS et al., 2015). Nesse casso, trata-se de uma medida preventiva direcionado a indivíduos que estão potencialmente em risco de trazer partículas infecciosas para a colônia (REBER et al., 2011) ou ser direcionado para os membros do grupo mais suscetíveis (UGELVIG; CREMER, 2007). Por exemplo, Cotazo-Calambas et al. (2022) também não mostraram variação na frequência de *alogrooming* em resposta aos conídios de *Trichoderma sp.*

Em adição, os resultados evidenciaram que a frequência de *allogrooming* foi muito menor em comparação às frequências de *self-grooming*. Estudos sugerem que a frequência de *allogrooming* seja reduzida porque este comportamento social é mais eficaz que o *self-grooming* (QIU et al., 2014), pois permite a remoção de propágulos de regiões que dificilmente seriam removidos através de *self-grooming* (REBER et al., 2011). Yanagawa, Yokohari e Shimizu (2008) concluíram que a maioria dos conídios permaneceram aderidos ao tórax de cupins isolados de seus companheiros de ninho, evidenciando a importância do *allogrooming* para limpeza de regiões do tegumento de difícil acesso por si próprios.

Por outro lado, existem custos sociais no emprego do *allogrooming*. O comportamento pode ter efeitos opostos na transmissão de doenças em sociedades de formigas, pois aumenta o risco de transmissão para indivíduos não contaminados quando a limpeza é direcionada a indivíduos expostos a patógenos (THEIS et al., 2015), Sendo assim, as interações sociais, inclusive o *allogroming*, são as principais rotas de contaminação da colônias através da rápida dispersão de inseticidas entre companheiras de ninho (FORTI et al., 2007; MOTA FILHO et al., 2021) e também na disseminação de patógenos (SILVA CAMARGO; PUCCINI; FORTI, 2017). Assim, manter a frequência desse comportamento em níveis baixos pode contribuir para evitar a dispersão de uma ameaça potencial.

Em geral, a quantidade e a eficiência de *self-grooming* ou *allogrooming* podem variar de acordo com a dose da infecção, pois a remoção de propágulos pode se tornar cada vez mais difícil em altas doses (REBER et al., 2011) e também da espécie do parasita (WALKER; HUGHES, 2009), visto que conídios de alguns fungos entomopatogênicos podem ser mais rapidamente removidos da cutícula por *grooming* que outros (YANAGAWA; YOKOHARI; SHIMIZU, 2008).

O comportamento de remoção de partes infectadas de jardins (*weeding*) é uma resposta específica à presença de micoparasitas (CURRIE; STUART, 2001).

Por este motivo, era esperado que esse comportamento se intensificasse na presença de conídios e microescleródios de *T. longibrachiatum*. No entanto, as subcolônias em contato com propágulos fúngicos deste estudo não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos nas frequências de *weeding* exibidos pelas operárias. Além disso, os comportamentos de *weeding* foram exibidos em níveis baixos. Esses resultados são consistentes com trabalhos anteriores que encontraram baixas frequências de *weeding*, não diferindo entre subcolônias experimentais infectadas e não infectadas com *Escovopsis* (ABRAMOWSKI; CURRIE; POULSEN, 2011; NILSSON-MØLLER; POULSEN; INNOCENT, 2018).

Embora as formigas sejam capazes de detectar instantaneamente a presença de propágulos fúngicos em seus jardins e desempenhar comportamentos higiênicos para controlar a infeção (UGELVIG; CREMER, 2007), o *weeding* torna-se mais importante nos estágios mais avançados de infecção (ABRAMOWSKI; CURRIE; POULSEN, 2011; CURRIE; STUART, 2001; NILSSON-MØLLER; POULSEN; INNOCENT, 2018). Neste estudo, a infecção das subcolônias experimentais apresentava-se nos estágios iniciais, o que, provavelmente explica os baixos níveis de *weeding* apresentados. Mais estudos com objetivo de avaliar o comportamento higiênico das operárias ao decorrer da evolução da contaminação seriam importantes para melhor compreensão do papel das estratégias de defesa contra patógenos fúngicos.

As formigas podem distinguir entre o micélio e conídios de *Trichoderma* (CURRIE; STUART, 2001), porém, não era conhecido se elas são capazes de detectar microescleródios. Os resultados dos testes de atratividade às estruturas fúngicas, em suma, demonstraram que embora considerados não atrativos, os discos foliares impregnados com MS fresco de *T. longibrachiatum* foram carregados para o interior dos ninhos. Além disso, os resultados dos testes de comportamentos higiênicos, demonstraram que as operárias não aumentaram significativamente a frequência de eventos de *weeding* quando tratadas com MS. Estes dados em conjunto podem oferecer percepções interessantes para o desenvolvimento de novas estratégias de uso destes propágulos no controle microbiano de formigas-cortadeiras. A falta de rejeição do propágulo e a não adoção de maiores frequências de *weeding* no início da infecção, pode gerar oportunidades para reidratação dos MS no ambiente úmido das colônias. Os MS, quando reidratados, podem germinar e produzir grandes quantidades de conídios infectivos (KOBORI et al., 2015), que por

sua vez, podem contaminar os jardins de fungo cultivado. De fato, o potencial de *Trichoderma* no controle de formigas-cortadeiras tem sido demonstrado (LOPEZ; ORDUZ, 2003), além disso, os microescleródios são estruturas de resistência ideais para aplicação no solo (KOBORI et al., 2015).

Adicionalmente, este trabalho representa o primeiro relato de blastosporos de *B. bassiana* infectando formigas operárias de *A. sexdens rubropilosa* com resultados semelhantes em comparação aos conídios aéreos. Os resultados levam a propor que os blastosporos podem ser tão eficazes quanto os conídios aéreos para o controle de formigas-cortadeiras, podendo ser potencialmente utilizados para o biocontrole.

Foram encontrados TL_{50} e taxas de sobrevivência significativamente menores das formigas tratadas com a concentração de $1x10^8$ mL $^{-1}$ blastosporos e conídios de *B. bassiana* em comparação ao controle. A maioria dos testes de patogenicidade de conídios de fungos entomopatogênicos sobre formigas-cortadeiras revelam uma ampla variação nos resultados, que podem variar de acordo com a virulência dos isolados, espécie de formiga (CASTILHO et al., 2010), concentração (GOFFRÉ; FOLGARAIT, 2015), casta estudada e forma de exposição aos propágulos (ALVES; SOSA GÓMEZ, 1983). Entretanto, alguns resultados são semelhantes aos encontrados neste estudo. Por exemplo, Loureiro e Monteiro (2005) verificaram que conídios do isolado de *B. bassiana* causaram a morte de mais de 80% das formigas de *A. sexdens sexdens* e apresentaram TL_{50} em média de 2,6 dias. Para *Acromyrmex*, Goffré et al. (2018) relataram que um isolado de *B. bassiana* causou a mortalidade de 92,3% das formigas em 4-5 dias.

A infectividade de blastosporos frescos de *B. bassiana* sobre a formiga-cortadeira *A. sexdens rubropilosa* apresentou valores de mortalidade variando de 71,9 a 93,6%, sendo ligeiramente maiores, no entanto, semelhante estatisticamente à mortalidade atingida pelos conídios aéreos. Eficiência igual de conídios aéreos e blastosporos de *B. bassiana* foram demonstradas para outras pragas, como o psilídeo do citrus *Diaphotina citri* (MORALES-REYES et al., 2018). Em contraste, os blastosporos do entomopatógeno podem ser ainda mais virulentos do que os conídios para diferentes hospedeiros (CORRÊA et al., 2020; MASCARIN et al., 2015b). Em insetos sociais, esta tendência ainda não é clara. Por exemplo, para cupins subterrâneos (*Formosan*), blastosporos secos de *Cordyceps fumosorosea* na

concentração de $1x10^8$ blastosporos mL^{-1} causou 31% de mortalidade em 7 dias (DUNLAP; JACKSON; WRIGHT, 2007).

Não houve diferença significativa no tempo necessário para causar mortalidade em 50% das operárias tratadas com blastosporos em comparação ao tratamento com conídios aéreos de *B. bassiana*. A diferença de TL_{50} para as operárias tratadas com suspensão de blastosporos (3,5 dias) foi de 0,2 dia em relação às operárias tratadas com a suspensão de conídios (3,7 dias). Seria esperado um menor TL_{50} devido, pelo menos parcialmente, a um menor tempo necessário para a germinação completa dos blastosporos (ALVES et al., 2002). No geral, os conídios de fungos levam em média de 16 a 24h para germinar (MASCARIN et al., 2015a), enquanto os blastosporos podem germinar mais rapidamente, levando cerca de 4 horas em condições favoráveis (BERNARDO et al., 2018).

De acordo com dados publicados, a patogenicidade de um determinado fungo entomopatogênico nem sempre está relacionada à sua ação repelente sobre o hospedeiro (MITINA; SELITSKAYA; SCHENIKOVA, 2020). Por exemplo, embora um isolado de *B. bassiana* tenha causado altos índices de mortalidade em um hospedeiro (*Sitophilus granarius*), os insetos da espécie apresentaram resposta neutra aos esporos (MITINA; SELITSKAYA; SCHENIKOVA, 2020). Neste estudo, os diferentes propágulos de *B. bassiana* além de serem patogênicos às operárias de *A. sexdens rubropilosa*, os blastosporos foram considerados atrativos e os conídios foram preferidos, o que é interessante para o controle microbiano de formigas-cortadeiras, uma vez que para estes insetos, as iscas contendo o princípio ativo deve ser atrativa às operárias (DELLA LUCIA et al., 1992).

As observações qualitativas das imagens obtidas em MEV permitiram concluir que havia conídios aéreos e blastosporos de *B. bassiana* remanescentes nas cutículas das operárias de *A. sexdens rubropilosa,* mesmo aquelas que tiveram a possibilidade de realização de *self-grooming* e *allogrooming* pelos períodos de 30 e 60 minutos. Por outro lado, o *grooming* empregado por cupins durante um período de 3 horas reduziu drasticamente a quantidade de conídios aderidos à cutícula, ainda, dependendo da espécie do fungo, os conídios foram removidos mais rapidamente (YANAGAWA; YOKOHARI; SHIMIZU, 2008). Neste estudo, o período em que permaneceram em grupo com a possibilidade de realização dos comportamentos de *grooming* foi de 30 ou 60 minutos, o que pode ter sido

insuficiente para haver uma redução clara da quantidade de propágulos depositados na cutícula. Entretanto, espera-se que quanto maior o tempo de exposição aos comportamentos defensivos empregados pelas operárias, menor o risco da infecção fúngica (BERNARDO et al., 2018).

Esses propágulos estavam em sua maioria depositados às superfícies irregulares do tegumento, especialmente às regiões intersegmentares e às concavidades da base das sensilas. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Travaglini (2017), que verificaram que os conídios de *B. bassiana* encontram-se localizados preferencialmente na região da base das sensilas em *A. sexdens rubropilosa*. É conhecido que o fungo entomopatogênico *B. bassiana* é capaz de penetrar em regiões da cutícula flexíveis e membranosas, como as regiões intersegmentares e base da seta de seus hospedeiros (BAEK et al., 2022). Tal fato pode explicar o maior acúmulo de *B. bassiana* nesses locais, e também a alta mortalidade encontrada nos ensaios de sobrevivência.

Aparentemente, havia menos conídios de *B. bassiana* do que blastosporos no tegumento de operárias de *A. sexdens rubropilosa*. Ambos os propágulos frequentemente formavam aglomerados, mas também estavam presentes como propágulos individuais. Aglomerados de blastosporos presentes em maior número na cutícula das formigas podem ter sido intensificados pelo uso de suspensões aquosas na imersão dos insetos. Suspensões aquosas, embora normalmente utilizadas em aplicações de fungos entomopatogênicos, podem ter efeito prejudicial na adesão dos conídios hidrofóbicos (ALVES et al., 2002). Além disso, blastosporos e conídios de *B. bassiana* possuem variações nas propriedades da superfície celular que levam a diferentes padrões de adesão (HOLDER; KEYHANI, 2005), o que pode ter influenciado na presença de menor quantidade de conídios. Da mesma forma que os resultados do bioensaio de comportamento revelaram que as operárias empregaram significativamente mais *self-grooming* em contato com conídios em comparação aos blastosporos de *B. bassiana*, esse resultado pode estar atrelado à menor quantidade de conídios verificados em MEV.

A capacidade de *B.bassiana* produzir mais de um propágulo infectivo, com propriedades de se ligar a diferentes substratos (HOLDER et al., 2007), altamente virulentos e atrativos às operárias de *A. sexdens rubropilosa*, permite a exploração dessas características para escolha do propágulo específico de acordo com o hospedeiro, forma de aplicação e habitat da praga. Outra vantagem é a fermentação

submersa, que é um processo econômico que pode ser usado para produzir rapidamente altas concentrações de blastosporos de vários isolados de *B. bassiana* (MASCARIN et al., 2015a) e MS de *Trichoderma* (KOBORI et al., 2015). Além disso, o potencial do uso simultâneo de fungos entomopatogênicos e micoparasitas para o controle de formigas-cortadeiras evidencia boas perspectivas futuras (LOPEZ; ORDUZ, 2003).

6 CONCLUSÕES

Os resultados sugerem que os compostos voláteis e não voláteis oriundos de blastosporos de *B. bassiana* foram atrativos às operárias de *A. sexdens rubropilosa*. Os compostos voláteis liberados por conídios de *B. bassiana* também demonstraram uma tendência à atratividade, e foram preferidos em relação aos blastosporos, possuindo em seu perfil cromatográfico maior diversidade de constituintes atrativos. Quando em contato com as estruturas frescas, as operárias não alteraram seu comportamento e carregaram a mesma proporção de discos foliares impregnados ou livre de propágulos fúngicos, com exceção dos discos tratados com MS de *T. longibrachiatum,* que foi considerado não atrativo às operárias.

Além disso, ambos propágulos do entomopatógeno *B. bassiana* são virulentos às operárias, causando alta mortalidade. As formigas empregaram significativamente menos *self-grooming* quando em contato com blastosporos de *B. bassiana* em comparação aos conídios do mesmo fungo, e não promoveram maiores frequências de *weeding* na presença dos propágulos de *T. longibrachiatum*. As imagens de MEV revelaram uma quantidade maior de blastosporos depositados ao tegumento das operárias, mesmo após períodos realizando comportamentos higiênicos. Levando em consideração a atratividade e virulência dos blastosporos e conídios de *B. bassiana*, esses propágulos podem ser considerados potenciais agentes de controle para *A. sexdens rubropilosa*.

REFERÊNCIAS

ABRAMOWSKI, D.; CURRIE, C. R.; POULSEN, M. Caste specialization in behavioral defenses against fungus garden parasites in *Acromyrmex octospinosus* leaf-cutting ants. **Insectes Sociaux**, v. 58, n. 1, p. 65–75, 2011.

AHMED, W. M. et al. Development of an adaptable headspace sampling method for metabolic profiling of the fungal volatome. **R Soc of Chemistry**, v. 143, n. 17, p. 4155-4162, 2018.

ALVES, S. B. (ED.). **Controle microbiano de insetos**. 2ª ed. Piracicaba, SP: FEALQ, 1998.

ALVES, S. B. et al. *Beauveria bassiana* yeast phase on agar medium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 81, n. 2, p. 70–77, 2002.

ALVES, S. B.; SOSA GÓMEZ, D. R. **Virulência do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. para duas castas de *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1968).**Poliagro, , 1983.

AVERY, P. B. et al. Choice behavior of the generalist pentatomid predator *Podisus maculiventris* when offered lepidopteran larvae infected with an entomopathogenic fungus. **BioControl**, v. 67, n. 2, p. 201–211, 2022.

BAEK, S. et al. Ultrastructural analysis of beetle larva cuticles during infection with the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. **Pest Management Science**, n. May, 2022.

BERNARDO, C. C. et al. Conidia and blastospores of *Metarhizium* spp. and *Beauveria bassiana* s.l.: Their development during the infection process and virulence against the tick *Rhipicephalus microplus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 9, n. 5, p. 1334–1342, 2018.

BICH, G. A. et al. Isolation of the symbiotic fungus of *Acromyrmex pubescens* and phylogeny *of Leucoagaricus gongylophorus* from leaf-cutting ants. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, n. 4, p. 851–856, 2017.

BISSETT, J. et al. Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. **IMA Fungus**, v. 6, n. 2, p. 263-295, 2015.

BIZARRIA, R. et al. Soluble Compounds of Filamentous Fungi Harm the Symbiotic Fungus of Leafcutter Ants. **Current Microbiology**, v. 75, n. 12, p. 1602–1608, 2018.

BOARETTO, M. A. C.; FORTI, L. C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. **Ser. Tecn. IPEF, FCA/UNESP**, v. 11(30), p. 31–46, 1997.

BOLTON, B. et al. **Bolton's catalogue of ants of the world 1758-2005**. Cambridge: Harvard University Press, 2006.

BOS, N. et al. Sick ants become unsociable. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 25, n. 2, p. 342–351, 2012.

BRANDÃO, C. R. F.; MAYHÉ-NUNES, A. J.; SANHUDO, C. E. D. Taxonomia e filogenia das formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.) **Formigas-cortadeiras da bioecologia ao manejo**. Viçosa, MG: UFV, 2011. p. 28–48.

BRITTO, J. S. DE et al. Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. v. 3, p. 11–92, 2016.

BRUCE, T. J. A.; WADHAMS, L. J.; WOODCOCK, C. M. Insect host location: A volatile situation. **Trends in Plant Science**, v. 10, n. 6, p. 269–274, 2005.

BRÜTSCH, T. et al. Ant queens (Hymenoptera: Formicidae) are attracted to fungal pathogens during the initial stage of colony founding. **Myrmecological News**, v. 20, p. 71–76, 2014.

CAPPA, F. et al. Natural biocide disrupts nestmate recognition in honeybees. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.

CARDOSO, S. R. DE S. **Morfogênese de ninhos iniciais de *Atta* spp. (Hymenoptera: formicidae), mortalidade em condições naturais e avaliação da ação de fungos entomopatogênicos.** Botucatu, SP, 2010.

CARDOSO, S. R. S. et al. Carrying and effect of granulated baits formulated with entomopathogenic fungi among *Atta sexdens rubropilosa* colonies (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 59, n. 3, p. 681–689, 2012.

CARLOS, A. A. et al. Influence of Fungal Contamination on Substrate Carrying by the Leafcutter Ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera : Formicidae). **Sociobiology**, v. 53, n. 3, p. 785–794, 2009.

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

CASTRILLO, M. L. et al. Biocontrol of *Leucoagaricus gongylophorus* of leaf-cutting ants with the mycoparasitic agent *Trichoderma koningiopsis*. **Mycosphere**, v. 7, n. 6, p. 810–819, 2016.

CORRÊA, B. et al. Comparative analysis of blastospore production and virulence of *Beauveria bassiana* and *Cordyceps fumosorosea* against soybean pests. **BioControl**, v. 65, n. 3, p. 323–337, 2020.

COTAZO-CALAMBAS, K. M. et al. Behavioral Response of the Leaf Cutting Ant *Atta cephalotes* (Hymenoptera : Formicidae) to *Trichoderma* sp . **Journal of Insect Behavior**, 2022.

CRESPO, R. et al. Volatile organic compounds released by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Microbiological Research**, v. 163, n. 2, p. 148–151, 2008.

CROWLEY-GALL, A. et al. Volatile microbial semiochemicals and insect perception at flowers. **Current Opinion in Insect Science**, v. 44, p. 23–34, 2021

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

CURRIE, C. R.; STUART, A. E. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 268, n. 1471, p. 1033–1039, 2001.

DAVIS, T. S. et al. Microbial Volatile Emissions as Insect Semiochemicals. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, n. 7, p. 840–859, 2013.

DAZA, F. F. F. et al. Spores of *Beauveria bassiana* and *Trichoderma lignorum* as a bioinsecticide for the control of *Atta cephalotes*. **Biological research**, v. 52, n. 1, p. 51, 2019.

DELABIE, J. H. C. et al. Distribuição das formigas-cortadeiras dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta* no novo mundo. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **Formigas-cortadeiras da bioecologia ao manejo**. Viçosa, MG: UFV, 2011. p. 80–101.

DELLA LUCIA, T. C. M. Hormigas de importancia económica en la región Neotropical. In: HARDERS, F. G. (Ed.). **Introducción a las Hormigas de la región Neotropical**. Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, 2003. p. 337–349.

DELLA LUCIA, T. M. C. et al. Aceitação de iscas granuladas com sulfluramida, um novo princípio ativo, por formigas-cortadeiras, no campo. **Revista Árvore**, v. 16, n. 2, p. 218–223, 1992.

DELLA LUCIA, T. M. C. **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa, MG: UFV, 2011.

DELLA LUCIA, T. M. C.; AMARAL, K. D. Past and Current Strategies for the Control of Leaf-Cutting Ants in Brazil. In: ESTAY, S. (Ed.). **Forest Pest and Disease Management in Latin America**. Springer, 2020. p. 211–230.

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

DIEHL-FLEIG, E. et al. Ocorrência natural de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. no Rio Grande do Sul. **Acta Biologica Leopoldensia**, v. 14, n. 1, p. 99–104, 1992.

DIEHL, E.; JUNQUEIRA, L. K. Seasonal variations of metapleural secretion in the leaf-cutting ant *Atta sexdens piriventris* Santschi (Myrmicinae: Attini), and lack of fungicide effect on *Beauveria bassiana* (Bals.) vuillemin. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 4, p. 517–522, 2001.

DRUZHININA, I. S. et al. Massive lateral transfer of genes encoding plant cell wall-degrading enzymes to the mycoparasitic fungus *Trichoderma* from its plant-associated hosts. **PLoS Genetics**, v. 14, n. 4, p. 1–33, 2018.

DU, X. et al. Volatiles from *Prunus persica* Flowers and Their Correlation with Flower-Visiting Insect Community in Wanbailin Ecological Garden, China. **Advances in Entomology**, v. 06, n. 02, p. 116–133, 2018.

DUNLAP, C. A.; JACKSON, M. A.; WRIGHT, M. S. A foam formulation of *Paecilomyces fumosoroseus*, an entomopathogenic biocontrol agent. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, p. 513–523, 2007.

FERREIRA, F. V.; MUSUMECI, M. A. *Trichoderma* as biological control agent: scope and prospects to improve efficacy. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 5, p. 1–17, 2021.

FINE LICHT, H. H. DE; BOOMSMA, J. J. Forage collection, substrate preparation, and diet composition in fungus-growing ants. **Ecological Entomology**, v. 35, n. 3, p. 259–269, 2010.

FORTI, L. C. et al. Dispersal of the delayed action insecticide sulfluramid in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 50, n. 3, p. 1149–1163, 2007.

GALLO, D. et al. **Entomologia agrícola**. Piracicaba, SP: FEALQ, 2002.

GARRETT, R. W. et al. Leaf processing behaviour in *Atta* leafcutter ants: 90% of leaf cutting takes place inside the nest, and ants select pieces that require less cutting. **Royal Society Open Science**, v. 3, n. 1, 2016.

GEORGE, J. et al. Malaria Mosquitoes Attracted by Fatal Fungus. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. 2–9, 2013.

GOES, A. C. et al. How Do Leaf-Cutting Ants Recognize Antagonistic Microbes in Their Fungal Crops? **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 8, n. May, p. 1–12, 2020.

GOETTEL, M. S.; GLARE, T. Entomopathogenic Fungi and their Role in Regulation of Insect Populations. In: L. GILBERT, K. IATROU, S. G. (Ed.). . **Insect Control: Biological and Synthetic Agents**. Boston: Elsevier, 2005. p. 361–406.

GOFFRÉ, D. et al. Selection and yield optimisation of a *Beauveria bassiana* isolate for the biological control of leaf cutter ants. **Biocontrol Science and Technology**, v. 28, n. 7, p. 672–687, 2018.

GOFFRÉ, D.; FOLGARAIT, P. J. *Purpureocillium lilacinum*, potential agent for biological control of the leaf-cutting ant *Acromyrmex lundii*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 130, p. 107–115, 2015.

HART, A. G.; RATNIEKS, F. L. W. Task partitioning, division of labour and nest compartmentalisation collectively isolate hazardous waste in the leafcutting ant *Atta cephalotes*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 49, n. 5, p. 387–392, 2001.

HERNÁNDEZ, J. V. et al. Leaf-cutter ant species (Hymenoptera: *Atta*) differ in the types of cues used to differentiate between self and others. **Animal Behaviour**, v. 71, n. 4, p. 945–952, 2006.

HOLDER, D. J. et al. Surface characteristics of the entomopathogenic fungus *Beauveria* (Cordyceps) *bassiana*. p. 3448–3457, 2007.

HOLDER, D. J.; KEYHANI, N. O. Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria* (Cordyceps) *bassiana* to Substrata. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5260–5266, 2005.

HOLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants**. Harvard University Press, 1990.

HORI, M.; ENYA, S. Attractiveness of synthetic volatile blends of flowering rice panicles to *Trigonotylus caelestialium* (Kirkaldy) (Heteroptera: Miridae). **Journal of Applied Entomology**, v. 137, n. 1–2, p. 97–103, 2013.

HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, v. 87, n. 1, p. 4–10, 2003.

HUANG, H. et al. The nesting preference of an invasive ant is associated with the cues produced by actinobacteria in soil. **PLoS Pathogens**, v. 16, n. 9, p. 1–21, 2020.

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, n. 1502, p. 1811–1819, 2002.

HULCR, J.; MANN, R.; STELINSKI, L. L. The Scent of a Partner: Ambrosia Beetles Are Attracted to Volatiles from Their Fungal Symbionts. **Journal of Chemical Ecology**, v. 37, n. 12, p. 1374–1377, 2011.

HUSSAIN, A. et al. Behavioral and electrophysiological responses of *Coptotermes formosanus* Shiraki towards entomopathogenic fungal volatiles. **Biological Control**, v. 55, n. 3, p. 166–173, 2010

IWANICKI, N. S. et al. Growth kinetic and nitrogen source optimization for liquid culture fermentation of *Metarhizium robertsii* blastospores and bioefficacy against the corn leafhopper *Dalbulus maidis.* **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 5, p. 1–13, 2020.

JACCOUD, D. B.; HUGHES, W. O. H.; JACKSON, C. W. The epizootiology of a *Metarhizium* infection in mini-nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 93, n. 1, p. 51–61, 1999.

JACKSON, M. A.; DUNLAP, C. A.; JARONSKI, S. T. Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. **BioControl**, v. 55, n. 1, p. 129–145, 2010.

JACKSON, M. A. et al. Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. **Mycological Research**, v. 101, n. 1, p. 35–41, 1997.

JAKOBSEN, H. B. et al. Can social bees be influenced to choose a specific feeding station by adding the scent of the station to the hive air? **Journal of Chemical Ecology**, v. 21, n. 11, p. 1635–1648, 1995.

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

KASSAMBARA, A. et al. Package ‘survminer’. Drawing Survival Curves using ‘ggplot2’. **R package version 0.3**, v. 1, 2017.

KOBORI, N. N. et al. Liquid culture production of microsclerotia and submerged conidia by *Trichoderma harzianum* active against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani.* **Fungal Biology**, v. 119, n. 4, p. 179–190, 2015.

KONRAD, M. et al. Ants avoid superinfections by performing risk-adjusted sanitary care. **PNAS**, v. 115, n. 11, p. 2782-2787, 2018.

LACERDA, F. G. et al. Mortality of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers in contact with colony waste from different plant sources. **Bulletin of Entomological Research**, v. 100, n. 1, p. 99–103, 2010.

LECLERC, J. B.; PINTO SILVA, J.; DETRAIN, C. Impact of soil contamination on the growth and shape of ant nests. **Royal Society Open Science**, v. 5, n. 7, p. 1–11, 2018.

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

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

MAISTROU, S. et al. Virulence traits within a community of the fungal entomopathogen *Beauveria*: Associations with abundance and distribution. **Fungal Ecology**, v. 48, p. 100992, 2020.

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

MASCARIN, G. M. et al. Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 127, p. 11–20, 2015a.

MASCARIN, G. M. et al. Glucose concentration alters dissolved oxygen levels in liquid cultures of *Beauveria bassiana* and affects formation and bioefficacy of blastospores. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 16, p. 6653–6665, 2015b.

MASCARIN, G. M.; JARONSKI, S. T. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 11, p. 1–26, 2016.

MATHEW, G. M. et al. Microbial community analysis in the termite gut and fungus comb of *Odontotermes formosanus*: The implication of *Bacillus* as mutualists. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 79, n. 2, p. 504–517, 2012.

MBURU, D. M. et al. Relationship between virulence and repellency of entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to the termite *Macrotermes michaelseni*. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, n. 9, p. 774–780, 2009.

MBURU, D. M.; MANIANIA, N. K.; HASSANALI, A. Comparison of Volatile Blends and Nucleotide Sequences of Two *Beauveria Bassiana* Isolates of Different Virulence and Repellency Towards the Termite *Macrotermes Michealseni*. **Journal Chemical Ecology**, v.39, p. 101–108, 2013.

MCCULLAGH, P.; NELDER, J. A. Generalized Linear Models. **CRC Press**, 1989. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/3001968>

MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. DA. ***Trichoderma* uso na agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, 2019.

MIKHEYEV, A. S.; MUELLER, U. G.; ABBOT, P. Cryptic sex and many-to-one coevolution in the fungus-growing ant symbiosis. **PNAS**, v. 103, n. 28, p. 10702–10706, 2006.

MNYONE, L. L. et al. Anopheline and culicine mosquitoes are not repelled by surfaces treated with the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. **Parasites&Vectores**, v. 3, n. 80, p. 2–7, 2010.

MOLNÁR, B. P. et al. Electrophysiologically-Active Maize Volatiles Attract Gravid Female European Corn Borer, *Ostrinia nubilalis*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 41, n. 11, p. 997–1005, 2015.

MORAL, R. A.; HINDE, J.; DEMÉTRIO, C. G. B. Half-normal plots and overdispersed models in R: The hnp package. **Journal of Statistical Software**, v. 81, n. 10, 2017.

MORALES-REYES, C. et al. Comparison of aerial conidia and blastospores from two entomopathogenic fungi against *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) under laboratory and greenhouse conditions. **Biocontrol Science and Technology**, v. 28, n. 8, p. 737–749, 2018.

MORELOS-JUÁREZ, C. et al. Ant farmers practice proactive personal hygiene to protect their fungus crop. **Current Biology**, v. 20, n. 13, p. R553–R554, 2010.

MOTA FILHO, T. M. M. et al. Contamination routes and mortality of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) by the insecticides fipronil and sulfluramid through social interactions. **Pest Management Science**, v. 77, n. 10, p. 4411–4417, 2021.

MUELLER, U. G. et al. Monoculture of leafcutter ant gardens. **PLoS ONE**, v. 5, n. 9, p. 1–7, 2010.

MUSSI-DIAS, V. et al. Screening of Fungi Isolated from the Brazilian Restinga for Insecticidal Activity. **Microbiology Research Journal International**, v. 30, n. 3, p. 48–63, 2020.

NASCIMENTO, M. O. DO et al. Antagonism of *Trichoderma* isolates against *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. **Journal of Basic Microbiology**, v. 57, n. 8, p. 699–704, 2017.

NILSSON-MØLLER, S.; POULSEN, M.; INNOCENT, T. M. A Visual Guide for Studying Behavioral Defenses to Pathogen Attacks in Leaf-Cutting Ants. **Journal of visualized experiments:JoVE**, n. 140, p. 1–12, 2018.

NOLDUS, L. P. J. J.; SPINK, A. J.; TEGELENBOSCH, R. A. J. Ethovision Video Tracking System. **Behavior Research Methods, Instruments, & Computers**, v. 33, n. 3, p. 398–414, 2001.

OKUNO, M. et al. Plasticity of grooming behavior against entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in the ant *Lasius japonicus*. **Journal of Ethology**, v. 30, n. 1, p. 23–27, 2012.

ORTIZ, A.; ORDUZ, S. In vitro evaluation of *Trichoderma* and *Gliocladium* antagonism against the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. **Mycopathologia**, v. 150, n. 2, p. 53–60, 2001.

PAGNOCCA, F. C.; MASIULIONIS, V. E.; RODRIGUES, A. Specialized fungal parasites and opportunistic fungi in gardens of attine ants. **Psyche (London)**, v. 2012, 2012.

PEREIRA, H.; DETRAIN, C. Pathogen avoidance and prey discrimination in ants. **Royal Society Open Science**, v. 7, n. 2, 2020.

PONTIERI, L. et al. Ant Colonies Prefer Infected over Uninfected Nest Sites. **PLOS ONE**, v. 9, n. 11, 2014.

POULSEN, M.; BOOMSMA, J. J. Mutualistic fungi control crop diversity in fungus-growing ants. **Science**, v. 307, n. 5710, p. 741–744, 2005.

POVEDA, J. *Trichoderma* as biocontrol agent against pests: New uses for a mycoparasite. **Biological Control**, v. 159, p. 104634, 2021.

QIU, H. LONG et al. Fungus Exposed *Solenopsis invicta* Ants Benefit from Grooming. **Journal of Insect Behavior**, v. 27, n. 5, p. 678–691, 2014.
RAJANI, P. et al. Inhibition of plant pathogenic fungi by endophytic *Trichoderma* spp. through mycoparasitism and volatile organic compounds. **Microbiological Research**, v. 242, n. January 2020, p. 126595, 2021.
REBER, A. et al. The expression and impact of antifungal grooming in ants. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 24, n. 5, p. 954–964, 2011.
REHNER, S. A. et al. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. **Mycologia**, v. 103, n. 5, 1055-1073, 2011.
RIBEIRO, M. M. R. et al. Diversity of fungi associated with *Atta bisphaerica* (Hymenoptera: Formicidae): the activity of *Aspergillus ochraceus* and *Beauveria bassiana.* **Psyche (London)**, v. 2012, 2012.
RICHARD, F. J.; ERRARD, C. Hygienic behavior, liquid-foraging, and trophallaxis in the leafcutting ants, *Acromyrmex subterraneus* and *Acromyrmex octospinosus*. **Journal of Insect Science**, v. 9, n. 63, 2009.
RICHARD, F. J.; HUNT, J. H. Intracolony chemical communication in social insects. **Insectes Sociaux**, v. 60, n. 3, p. 275–291, 2013.
ROCHA, S. L. et al. Quality control by leaf-cutting ants: evidence from communities of endophytic fungi in foraged and rejected vegetation. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 8, n. 5, p. 485–493, 2014.
ROCHA, S. L. et al. Recognition of endophytic *Trichoderma* species by leaf-cutting ants and their potential in a Trojan-horse management strategy. **Royal Society Open Science**, v. 4, n. 4, 2017.
RODRIGUES, A. et al. Variability of non-mutualistic filamentous fungi associated with *Atta sexdens rubropilosa* nests. **Folia Microbiologica**, v. 50, n. 5, p. 421–425, 2005.
RODRIGUES, A. et al. Microfungal “weeds” in the leafcutter ant symbiosis. **Microbial Ecology**, v. 56, n. 4, p. 604–614, 2008.
RODRIGUES, A. et al. Filamentous fungi found on foundress queens of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 134, n. 4, p. 342–345, 2010.
RODRIGUES, A. et al. Ecology of microfungal communities in gardens of fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae): a year-long survey of three species of attine ants in Central Texas. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 78, p. 244–255, 2011.
ROHLFS, M.; CHURCHILL, A. C. L. Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 1, p. 23–34, 2011.
SANTOS, A. V. et al. Ocurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 239, n. 2, p. 319–323, 2004.
SCHAEFFER, R. N. et al. Microbial metabolites elicit distinct olfactory and gustatory preferences in bumblebees. **Biology Letters**, v. 15, n. 7, 2019.

SILVA-PINHATI, A. C. O. et al. Low variation in ribosomal DNA and internal transcribed spacers of the symbiotic fungi of leaf-cutting ants (Attini: Formicidae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 10, p. 1463–1472, 2004.

SILVA, A. et al. Susceptibility of the ant-cultivated fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales: Basidiomycota) towards microfungi. **Mycopathologia**, v. 162, n. 2, p. 115–119, maio 2006.

SILVA CAMARGO, R. DA; PUCCINI, C.; FORTI, L. C. Allogrooming, self-grooming, and touching behavior: Contamination routes of leaf-cutting ant workers using a fat-soluble tracer dye. **Insects**, v. 8, n. 2, 2017.

SILVA, D. G. DA et al. Encapsulated baits containing zinc sulfate and *Trichoderma harzianum* reduce fungal garden in *Atta sexdens* colonies. **Journal of Neotropical Agriculture**, v. 7, n. 3, p. 46–52, 2020.

SINHA, K. K.; CHOUDHARY, A. K.; KUMARI, P. Entomopathogenic Fungi. In: I. OMKAR (Ed.). **Ecofriendly Pest Management for Food Security**. Academic Press, 2016. p. 475–505.

SONG, Z. et al. Optimization of culture medium for microsclerotia production by *Nomuraea rileyi* and analysis of their viability for use as a mycoinsecticide. **BioControl**, v. 59, n. 5, p. 597–605, 2014.

SOUZA, L. M. et al. Garnage handling behavior in infected an non-infected *Atta sexdens rubropilosa* (Forel) (Hymenoptera: Formicidae) Colonies with *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuilleman (Moniliales: Moniliaceae) L.M. **Biológico**, v. 69, n. 2, p. 355–357, 2007.

STEFANELLI, L. E. P. et al. Effects of Entomopathogenic Fungi on Individuals as Well as Groups of Workers and Immatures of *Atta sexdens rubropilosa*. **Insects**, v.12, n. 10, 2021.

STEINHAUS, E. A.; MARTIGNONI, M. E. An Abridged Glossary of Terms Used in Invertebrate Pathology. **Society for Invertebrate Pathology**, v. 03, 2006.

SULLIVAN, C. F.; PARKER, B. L.; SKINNER, M. A Review of Commercial *Metarhizium* and *Beauveria* Based Biopesticides for the Biological Control of Ticks in the USA. **Insects**, v. 13, n. 3, 2022.

TEAM, R. C. **R: A language and environment for statistical computingR Foundation for Statistical Computing.** Viena, Austria, 2020. Disponível em: <https://www.r-project.org/>

THEIS, F. J. et al. Opposing effects of allogrooming on disease transmission in ant societies. **Phil Trans R Soc B**, v. 370, n. 1669, 2015.

THERNEAU, T. M. **A Package for Survival Analysis in R**. Disponível em: <https://cran.r-project.org/package=survival>. Acesso em: 20 jul. 2022.

TRANTER, C. et al. Threat detection: Contextual recognition and response to parasites by ants. **Behavioral Ecology**, v. 26, n. 2, p. 396–405, 2015.

TRAVAGLINI, R. V. et al. Mapping the Adhesion of Different Fungi to the External Integument of *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908). **International Journal of Agriculture Innovations and Research**, v. 5, n. 1, p. 118–125, 2016.

TRAVAGLINI, R. V. et al. Leaf-Cutter Ants and Microbial Control. In: VONNIE, D.; SHIELDS, V. (Eds.). **The Complex World of Ants**. London, UK: IntechOpen, 2018. p. 71–84.

TRAVAGLINI, R. V. **BASES PARA O CONTROLE MICROBIANO DE FORMIGAS CORTADEIRAS**. Botucatu: UNESP, 2017.

UGELVIG, L. V.; CREMER, S. Social Prophylaxis: Group Interaction Promotes Collective Immunity in Ant Colonies. **Current Biology**, v. 17, n. 22, p. 1967–1971, 2007.

VAN BAEL, S. A. et al. Two fungal symbioses collide: Endophytic fungi are not welcome in leaf-cutting ant gardens. **Proc R Soc B**, v. 276, n. 1666, p. 2419–2426, 2009.

VEGA, F. E. et al. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. **Fungal Ecology**, v. 2, n. 4, p. 149–159, 2009.

VERZA, S. S. et al. Influence of physical and chemical factors during foraging and culture of the symbiont fungus in *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Insect Science**, v. 14, n. 4, p. 295–300, 2007.

WALKER, T. N.; HUGHES, W. O. H. Adaptive social immunity in leaf-cutting ants. **Biology Letters**, v. 5, n. 4, p. 446–448, 2009.

WILCOXON, F. Individual Comparisons by Ranking Methods. **International Biometric Society**, v. 1, n. 6, p. 80–83, 1945.

WOO, S. L. et al. *Trichoderma*-based Products and their Widespread Use in Agriculture. **The Open Mycology Journal**, v. 8, n. 1, p. 71–126, 2014.

WRIGHT, M.; CONNICK, W.; JACKSON, M. **Use of *Paecilomyces* spp. as pathogenic agents against subterranean termites.** Washington, DC, 2003.

YANAGAWA, A. et al. Odor Aversion and Pathogen-Removal Efficiency in Grooming Behavior of the Termite *Coptotermes formosanus*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1–9, 2012.

XIONG, H. et al. Does Soil Treated with Conidial Formulations of *Trichoderma* spp. Attract or Repel Subterranean Termites? **Journal of Economic Entomology**, v. 111, n. 2, p. 808–816, 2018.

YANAGAWA, A.; YOKOHARI, F.; SHIMIZU, S. Defense mechanism of the termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki, to entomopathogenic fungi. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 97, n. 2, p. 165–170, 2008.

YANAGAWA, A. et al. Musty odor of entomopathogens enhances disease-prevention behaviors in the termite *Coptotermes formosanus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 108, n. 1, p. 1–6, 2011.

ZANETTI, R. et al. An overview of integrated management of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in Brazilian forest plantations. **Forests**, v. 5, n. 3, p. 439–454, 2014.

ZANUNCIO, J. C. et al. The impact of the Forest Stewardship Council (FSC) pesticide policy on the management of leaf-cutting ants and termites in certified forests in Brazil. **Annals of Forest Science**, v. 73, n. 2, p. 205–214, 2016.

ZHU, H. et al. Fitness Consequences of Oviposition Choice by an Herbivorous Insect on a Host Plant Colonized by an Endophytic Entomopathogenic Fungus. **Journal of Pest Science**, 2022.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, n. 6, p. 553–596, 2007.