



**UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL
DA LUSOFONIA AFRO-BRASILEIRA-UNILAB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA-ICEN
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CLCBIO**

JOÃO LUCAS VITÓRIO RIBEIRO CARVALHO

**UTILIZAÇÃO DE FUNGOS DO COMPLEXO *Ophiocordyceps unilateralis* COMO
AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO DE FORMIGAS DA TRIBO
CAMPONOTINI.**

REDENÇÃO

2019



**UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL
DA LUSOFONIA AFRO-BRASILEIRA-UNILAB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA-ICEN
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CLCBIO**

JOÃO LUCAS VITÓRIO RIBEIRO CARVALHO

**UTILIZAÇÃO DE FUNGOS DO COMPLEXO *Ophiocordyceps unilateralis* COMO
AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO DE FORMIGAS DA TRIBO
CAMPONOTINI.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada
ao curso de Ciências Biológicas, como requisito
parcial para obtenção de título de Licenciado
em Ciências Biológicas

ORIENTADOR: PROF. DR. ROBERTH FAGUNDES DE SOUZA

REDENÇÃO

2019

JOÃO LUCAS VITÓRIO RIBEIRO CARVALHO

UTILIZAÇÃO DE FUNGOS DO COMPLEXO *Ophiocordyceps unilateralis* COMO AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO DE FORMIGAS DA TRIBO CAMPONOTINI.

Trabalho de Conclusão de Curso julgado e aprovado para obtenção do Diploma de Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira.

DATA: 02/08/2019

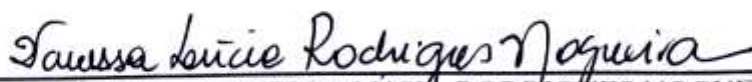
NOTA: 10,0

Banca Examinadora:



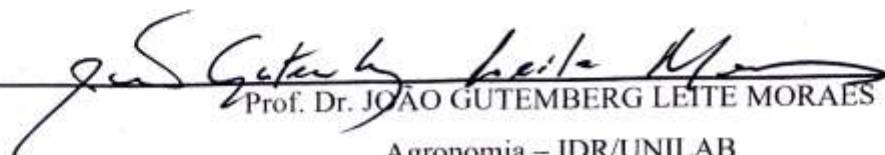
Prof. Dr. ROBERTH FAGUNDES DE SOUZA (Orientador)

Ciências Biológicas – ICEN/UNILAB



Prof. Dra. VANESSA LÚCIA RODRIGUES NOGUEIRA

Ciências Biológicas – ICEN/UNILAB



Prof. Dr. JOÃO GUTEMBERG LEITE MORAES

Agronomia – IDR/UNILAB

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Sistema de Bibliotecas da UNILAB
Catalogação de Publicação na Fonte.

Carvalho, João Lucas Vitorio Ribeiro.

C331u

Utilização de fungos do complexo *ophiocordyceps unilateralis* como agente de controle biológico de formigas da tribo camponotini / João Lucas Vitorio Ribeiro Carvalho. - Redenção, 2019.
49f: il.

Monografia - Curso de Ciências Biológicas, Instituto De Ciências Exatas E Da Natureza, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Redenção, 2019.

Orientador: Prof. Dr. Roberth Fagundes de Souza.

1. Controle biológico. 2. Parasitismo. 3. Entomopatógeno. I.
Titulo

CE/UF/BSCA

CDD 632.96

Aos meus pais, Ricardo e Angela

A Leticia

DEDICO

“Os que confiam no SENHOR serão como o monte de Sião, que não se abala, mas permanece para sempre. ”

(Salmos 125:1)

AGRADECIMENTOS

A Deus todo poderoso que me proveu das forças necessárias para enfrentar cada dia de vida, por toda sabedoria, saúde, proteção e determinação, para que eu pudesse conquistar mais uma vitória em minha vida, a conclusão deste curso. A Ele toda honra e toda glória.

Aos meus pais, Ricardo Ribeiro e Angela Carvalho, todas as palavras de gratidão do mundo são insuficientes para agradecer o auxílio e o amor de vocês, em todas as etapas da minha vida.

À minha amada, Letícia Franco, pelo apoio e convivência durante todo curso.

Ao meu orientador, professor e amigo, Dr. Roberth Fagundes, pelo acolhimento quando eu mais precisei, pelos ensinamentos e auxílio durante todo esse trabalho.

À professora e amiga, Dra. Vanessa Nogueira, pelos ensinamentos e ajuda durante os trabalhos.

Aos colegas Bruno Roberto e a técnica Lívia, que me ajudaram durante meus trabalhos no Laboratório de Microbiologia.

Aos companheiros do Grupo de Pesquisa em Interações Animais, Interzoa.

Aos meus amigos, Gabriel, Vanessa e Hemilly, pelas gargalhadas durante as nossas conversas animadas.

À coordenação do curso de Ciências Biológicas, em especial a Lídia Gomes por seu excelente serviço no apoio à gestão.

Aos meus maravilhosos professores que me transmitiram o conhecimento necessário para a conclusão desse curso, em que tenho muita admiração por todos.

Aos membros da banca de defesa, Prof. Dr. João Gutemberg Leite Moraes e Prof^ª. Dra. Vanessa Lúcia Rodrigues Nogueira, pelas valiosas sugestões e contribuições para o aperfeiçoamento deste documento.

Aos técnicos de laboratório, motoristas, serviços gerais, manutenção, enfim, todos os profissionais que fazem a UNILAB e todo trabalho desenvolvido nela funcionar, o meu muito obrigado.

À Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB) e ao Instituto de Ciências Exatas e da Natureza (ICEN).

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento desse trabalho.

A Unidade de Conservação de Proteção Integral Refúgio da Vida Silvestre Periquito Cara Suja pela permissão para realização desse trabalho na Trilha da Batalha.

A Secretaria do Meio Ambiente do Estado do Ceará (SEMACE) pela permissão para realização desse trabalho na Área de Proteção Ambiental da Serra de Baturité.

Ao Chalé Nosso Sítio na cidade de Pacoti pela permissão para realização desse trabalho em sua propriedade.

À todos que de alguma forma, contribuíram nessa minha jornada acadêmica.



RESUMO

Os fungos entomopatógenos do gênero *Ophiocordyceps* infectam formigas trofobiontes, como a *Camponotus*, que são consideradas prejudiciais quando cuidam de hemípteros sugadores de seiva que se tornam pragas ao removerem nutrientes, prejudicar a fotossíntese e inocular patógenos na planta. Nessa perspectiva, conduziu-se o presente estudo com o objetivo de avaliar a possibilidade da utilização de esporos fúngicos do complexo *Ophiocordyceps unilateralis* como agente de controle biológico de formigas do gênero *Camponotus* sp. Para isso, espécimes de formigas parasitadas foram coletadas em campo e utilizadas para obtenção do fungo. Foram realizados três experimentos para avaliar a eficácia da virulência do *Ophiocordyceps* no controle biológico de formigas. No experimento de infecção com esporos fúngicos obtidos em laboratório, observou-se que existiu mais mortalidade nas formigas expostas ao fungo. No experimento de infecção utilizando um fungo coletado em campo comprovou-se a eficácia da infecção do fungo nas formigas *Camponotus renggeri*. No experimento de campo, a presença do fungo reduziu a atividade de forrageio das formigas nas plantas. Foi demonstrado que os esporos do *Ophiocordyceps* sp. são eficientes em provocar alterações no comportamento das formigas, alterando o comportamento e provocando a morte das mesmas, e que dependendo da qualidade do fungo, os resultados na infecção são diferentes, comprovando o objetivo desse estudo.

Palavras chave: parasitismo, controle biológico, entomopatógeno, trofobiose, formigas.

ABSTRACT

Entomopathogenic fungi of the genus *Ophiocordyceps* infect trophobion ants such as *Camponotus*, which are considered harmful when caring for sap-sucking hemiptera that become pests by removing nutrients, harming photosynthesis and inoculating plant pathogens. From this perspective, this study was conducted to evaluate the possibility of using fungal spores of the *Ophiocordyceps unilateralis* complex as a biological control agent of *Camponotus* sp. For this, specimens of parasitized ants were collected in the field and used to obtain the fungus. Three experiments were performed to evaluate the effectiveness of *Ophiocordyceps* virulence in the biological control of ants. In the infection experiment with fungal spores obtained in the laboratory, it was observed that there was more mortality in ants exposed to the fungus. In the infection experiment using a field-collected fungus, the effectiveness of fungal infection in *Camponotus renggeri* ants was proven. In the field experiment, the presence of the fungus reduced the foraging activity of ants in plants. It has been shown that the spores of *Ophiocordyceps* sp. They are efficient in causing changes in the behavior of ants, altering their behavior and causing their death, and depending on the quality of the fungus, the results in the infection are different, proving the purpose of this study.

Key words: parasitism, biological control, entomopathogenic, trophobiosis, ants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cartograma de localização da APA da Serra de Baturité no Estado do Ceará. Fonte: FREITAS, 2012.	18
Figura 2. Imagem de satélite gerada pelo Google maps mostrando as duas áreas de coleta na APA da Serra de Baturité. Em amarelo a área 1, Refúgio da Vida Silvestre Periquito Cara Suja, e em vermelho a área 2, Chalé Nosso Sítio. Fonte: google.com/maps	19
Figura 3. Área 3, Campus das Auroras na UNILAB.....	20
Figura 4. <i>Camponotus renggeri</i> (Hymenoptera: Formicidae) apresentando um comportamento de cuidado e proteção com afídeos (Hemiptera: Aphididae).	23
Figura 5. Exemplos de como o fungo foi fixado na tampa do pote plástico.	24
Figura 6. Experimento de infecção em laboratório utilizando um fungo natural. À esquerda, pote controle, sem infecção, à direita, pote tratamento, com infecção.....	25
Figura 7. Formigas parasitadas pelo fungo <i>Ophiocordyceps</i> sp. fixadas em galhos do Angico durante o experimento de infecção no campo.	26
Figura 8. Variedade morfológica do fungo <i>Ophiocordyceps</i> sp. e seus variados estágios de desenvolvimento. Espécimes de <i>Camponotus</i> sp. parasitadas pelo fungo <i>Ophiocordyceps</i> sp. coletadas para cultivo.	28
Figura 9. Isolado ISO B-8 duas semanas após a preparação das placas.....	32
Figura 10. A- Estruturas vegetativas e reprodutivas microscópicas presentes na amostra ISO B-8, visualizadas através do microcultivo de fragmentos extraídos da amostra original com um aumento de 100x em óleo de imersão. B- Esporos fúngicos liberados pela amostra ISO B-8 visualizados em um aumento de 40x. C- Estruturas macroscópicas que emergem da superfície do fungo.	33
Figura 11. Número de formigas vivas por dia durante o experimento de infecção com esporos cultivados obtidos a partir das amostras ISO B-1, ISO B-7 e ISO B-10.	34
Figura 12. Número de formigas vivas por dia durante o experimento de infecção com o fungo coletado em campo.	36
Figura 13. Formigas presentes nos potes T-1 e T-2 apresentando crescimento de micélio emergindo da região da mandíbula e das articulações.	37
Figura 14. Comparação entre a quantidade de formigas observadas forrageando nas plantas nos grupos tratamento e controle em cada uma das 10 semanas de experimento. Setas vermelhas: inclusão do fungo.	39

Figura 15. Comparação entre a quantidade de formigas nas plantas que foram expostas ao fungo e as que não foram expostas.....	41
Figura 16. Número médio de formigas encontradas forrageando em cada altura, na presença e ausência do fungo.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados relacionados a primeira semana após a preparação das amostras.	29
Tabela 2. Dados relacionados a segunda semana após a preparação das amostras. Notar a ocorrência de mais de um tipo de fungo crescendo na maioria das amostras.	30
Tabela 3. Dados relacionados a quarta semana após a preparação das amostras.	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 METODOLOGIA	17
2.1 ÁREAS DE ESTUDO	17
2.2 COLETA DOS ESPÉCIMES	20
2.3 PROTOCOLO PARA CULTIVO DO FUNGO	20
2.4 IDENTIFICAÇÃO	21
2.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	22
2.5.1 Experimento de infecção das formigas por meio de esporos obtidos em laboratório	22
2.5.2 Experimento de infecção das formigas utilizando um fungo coletado em campo	22
2.5.3 Experimento de campo utilizando formigas parasitadas	25
2.6 TRATAMENTO DOS DADOS	26
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	27
3.1 OBTENÇÃO DE ESPOROS FÚNGICOS EM LABORATÓRIO	27
3.2 EXPERIMENTO DE INFECÇÃO DAS FORMIGAS POR MEIO DE ESPOROS OBTIDOS EM LABORATÓRIO	34
3.3 EXPERIMENTO DE INFECÇÃO DAS FORMIGAS UTILIZANDO UM FUNGO COLETADO EM CAMPO	35
3.4 EXPERIMENTO DE CAMPO UTILIZANDO FORMIGAS PARASITADAS	38
4 CONCLUSÕES	43
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1 INTRODUÇÃO

Os insetos são os principais organismos pragas de lavouras, atacando todos os tipos de cultivos, e ocasionando prejuízos no desenvolvimento das plantas e produtividade de frutos e grãos (BARROS *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2016; CORRÊA-FERREIRA *et al.*; SILVA *et al.*, 2018). Micro-organismos entomopatogênicos (fungos, bactérias e vírus) são comumente usados no controle de insetos por diminuir a população destes no campo (AZEVEDO & MESSIAS, 1985; ALVES, 1998; VALICENTE, 2009; MORA *et al.*, 2016). Atualmente, essa ferramenta ecológica reduz problemas oriundos do emprego excessivo de inseticidas (GARCIA, 2004). Os fungos são agentes de controle de insetos muito estudados e aplicados por causar 80% das enfermidades observadas nos mesmos e se destacam por infectar todos os estágios de desenvolvimento dos hospedeiros (ALVES, 1998; ALVES *et al.*, 2008). Fungos entomopatogênicos são restritos a determinados grupos, como formigas, besouros, gafanhotos e lagartas. Essa especificidade permite seu uso contra pragas sem risco de afetar outras espécies (OLIVEIRA, 2008).

No Brasil, os principais fungos entomopatogênicos usados em programas de controle biológico são *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*. Vale destacar fungos de ocorrência natural como *Nomuraea rileyi*, que provoca patologias na lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatilis* (VALICENTE, 2009). Além destes, também são utilizados fungos como o *Entomophthora muscae* que infecta espécies de moscas da fruta (BECHER *et al.*, 2018), desenvolvendo-se dentro do corpo de hospedeiros adultos. O fungo *Zoophthora radicans* que afeta um grande número de espécies de artrópodes (LEITE *et al.*, 1996; TORRES ACOSTA *et al.*, 2016) em diferentes estágios de desenvolvimento, e é muito utilizado no controle da cigarrinha verde *Empoasca kraemeri*. O fungo *Neozygites floridana* muito conhecido como agente eficaz contra ácaros tetraniquídeos em geral, destacando-se os gêneros *Panonychus* spp. e os *Tetranychus* spp. (ROGGIA *et al.*, 2009), crescendo sobre os ácaros em forma de pó de cor marrom ou chocolate.

Insetos sugadores de seiva (Hemiptera: Auchenorrhyncha e Sternorrhyncha), como pulgões, cochonilhas, moscas-brancas e soldadinhos, são considerados muito comuns e prejudiciais a lavoura (CAMPOS-FARINHA, 2006). Ao sugar a seiva da planta, podem causar um enrugamento das folhas tornando-as encurvadas e impróprias para a comercialização, paralização do desenvolvimento das plantas, redução na produção de flores e frutos e, conseqüentemente, redução da produção de sementes (CAMPOS-FARINHA, 2006). Esses

problemas são potencializados quando os hemípteros são cuidados por formigas da tribo Camponotini (Hymenoptera: Formicidae) aumentando muito sua população (DELABIE, 2001; DEL-CLARO, 2004), o que os transformam em pragas muito danosas para as lavouras (FLATT; WEINSSER, 2000; RENAULT *et al.*, 2005). Em mutualismo do tipo trofobiose (DELABIE, 2001), essas formigas consomem a excreta do hemíptero (honeydew) enquanto protege-os de seus inimigos naturais, aumentando a sobrevivência e reprodução, levando a super agregações de herbívoros nas plantas (DEL-CLARO, 2004; DEL-CLARO *et al.*, 2016; FAGUNDES *et al.*, 2012). Essa interação altera toda a comunidade associada às plantas (FAGUNDES *et al.*, 2013) incluindo outros herbívoros (ALVES-SILVA *et al.*, 2014), polinizadores (ASSUNÇÃO *et al.*, 2014; BARONIO & DEL-CLARO, 2017) e predadores (STEFANI *et al.*, 2015), o que representam um grande desafio para o uso de técnicas de controle biológico, pois requer o controle da interação ecológica e não apenas dos insetos (MORAES; BERTI FILHO, 2005; ZHANG; SHANG, 2012).

As espécies de formigas mais comuns e efetivas em interações com hemípteros, *Camponotus* spp. (DELABIE, 2001; DEL-CLARO *et al.*, 2016; FAGUNDES *et al.*, 2016), são naturalmente parasitadas por espécies de fungos *Ophiocordyceps* Petch (1931) (Hypocreales: Ophiocordycipitaceae) (ARAÚJO *et al.*, 2014). Infecções por *Ophiocordyceps* são altamente virulentas e matam seus hospedeiros para o desenvolvimento de estruturas aéreas por onde os esporos são dispersados (EVANS, 1982A; ARAÚJO *et al.*, 2014). Desses fungos crescem hifas compactas fora do corpo do hospedeiro (estroma), onde são produzidos os corpos de frutificação (peritécio) com esporos. Os esporos fúngicos invadem os hospedeiros por diversas vias, principalmente, através da cutícula ou pele (tegumento). Uma vez dentro dos insetos, os fungos multiplicam-se rapidamente por todo o corpo. Antes de morrer, o fungo manipula o comportamento da formiga induzindo-a a subir em uma planta até uma altura e orientação que seja favorável para o seu desenvolvimento e, posteriormente, a dispersão dos esporos. A morte é causada pela destruição dos tecidos e, ocasionalmente, pelas toxinas produzidas pelos fungos (EVANS, 1982A; VALICENTE, 2009). O potencial uso desse fungo no controle das formigas trofobiontes se torna uma estratégia no combate aos danos ocasionados às plantas pelos hemípteros, sendo uma alternativa não agressiva para planta e organismos não-alvo, afetando apenas o inseto desejado. No Brasil, *O. unilateralis* foi descoberto como um patógeno fúngico específico das espécies de formigas *Camponotus rufipes*, *C. balzani*, *C. novogranadensis* e *C. melanoticus* (Formicidae: Camponotini) (EVANS *et al.*, 2011).

O entendimento dos processos envolvidos na contaminação de formigas pelo *Ophiocordyceps* sp. pode ser o precursor na utilização desse fungo como agente biológico de controle. O uso do controle biológico dentro de programas de manejo integrado de pragas assume uma crescente importância frente a produção integrada em uma agricultura sustentável, métodos harmoniosos de diferentes técnicas de controle de pragas, em concordância com princípios ecológicos, econômicos e sociais, mantêm os organismos-praga longe de se tornarem um problema econômico sem prejudicar o meio ambiente (MOINO JR., 2000; PARRA *et al.*; VENDRAMIM, 2002; MORAES *et al.*, 2017). Nesse sentido, são crescentes as pesquisas científicas interessadas por organismos capazes de promover esse tipo de controle, sobretudo, por aqueles que podem ser manipulados em laboratórios e/ou em escala industrial (FARIA & MAGALHÃES, 2001; GARCIA, 2004; ORLANDELLI & PAMPHILE, 2011; MORAES *et al.*, 2014; VITAL *et al.*, 2019). Apesar da relativa fácil aplicação desses fungos, o cultivo em laboratório é o principal desafio na criação dessa ferramenta. É preciso elaborar protocolos de prospecção, cultivo, replicação e aplicação dos esporos do fungo de forma fácil, baixo-custosa e eficiente para garantir sua ampla aplicabilidade.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a possibilidade da utilização de esporos fúngicos do complexo *Ophiocordyceps unilateralis* como agente de controle biológico de formigas do gênero *Camponotus* sp., através da viabilização do cultivo do fungo *Ophiocordyceps* sp. em laboratório; do teste da aplicação dos esporos do *Ophiocordyceps* sp. como ferramenta de controle biológico de formigas; e se a presença desse fungo altera o comportamento de forrageio das formigas nas plantas. Para tanto, foram testadas as seguintes hipóteses: i) os esporos cultivados dos fungos entomopatogênicos *Ophiocordyceps* sp. funcionam como controladores biológicos de formigas; ii) esporos aplicados em plantas interferem na atividade das formigas nas mesmas. Portanto, espera-se que o fungo *Ophiocordyceps* sp. possa ser cultivado em laboratório, seus esporos extraídos e, quando aplicados nas formigas, cause alta mortalidade. Além disso, que a presença de seus esporos reduza a quantidade de formigas nas plantas por repelir e matar operárias, reduzindo a ocorrência de interações com hemípteros.

2 METODOLOGIA

2.1 ÁREAS DE ESTUDO

A Área de Proteção Ambiental da Serra de Baturité, local de realização da amostragem dos espécimes de fungos e formigas, foi a primeira APA criada pelo Governo do Estado do Ceará por meio do Decreto Estadual nº 20.956, de 18 de setembro de 1990, sendo a mais extensa do estado, abrangendo uma área de 32.690 ha. Situada a 90 km da Capital Fortaleza, encontra-se localizada na porção Nordeste do Estado, região serrana do Maciço de Baturité, entre as coordenadas (4°08' e 4°27') de latitude sul e (38°50' a 30°05') de longitude oeste (Fig. 1), englobando os municípios de Baturité, Guaramiranga, Aratuba, Mulungu, Capistrano, Redenção, Palmácia e Pacoti (SILVA *et al.*, 2014). Na porção com menor índice pluviométrico na APA, a vegetação é predominantemente de caatinga arbórea. Já na porção mais úmida, encontra-se tipos de vegetações que variam entre espécies de clima tropical e caatinga. As condições ambientais dessa Serra favoreceram a formação de florestas dos tipos Ombrófila Densa Submontana e Montana, em condições de umidade constante, ou Estacional Semidecidual, em áreas onde a distribuição de chuvas é sazonal, como também, podemos encontrar trechos de Florestas Ombrófilas Densas semelhantes às Alto-Montanas encontradas no sudeste (MANTOVANI, 2006; XAVIER *et al.*, 2007).

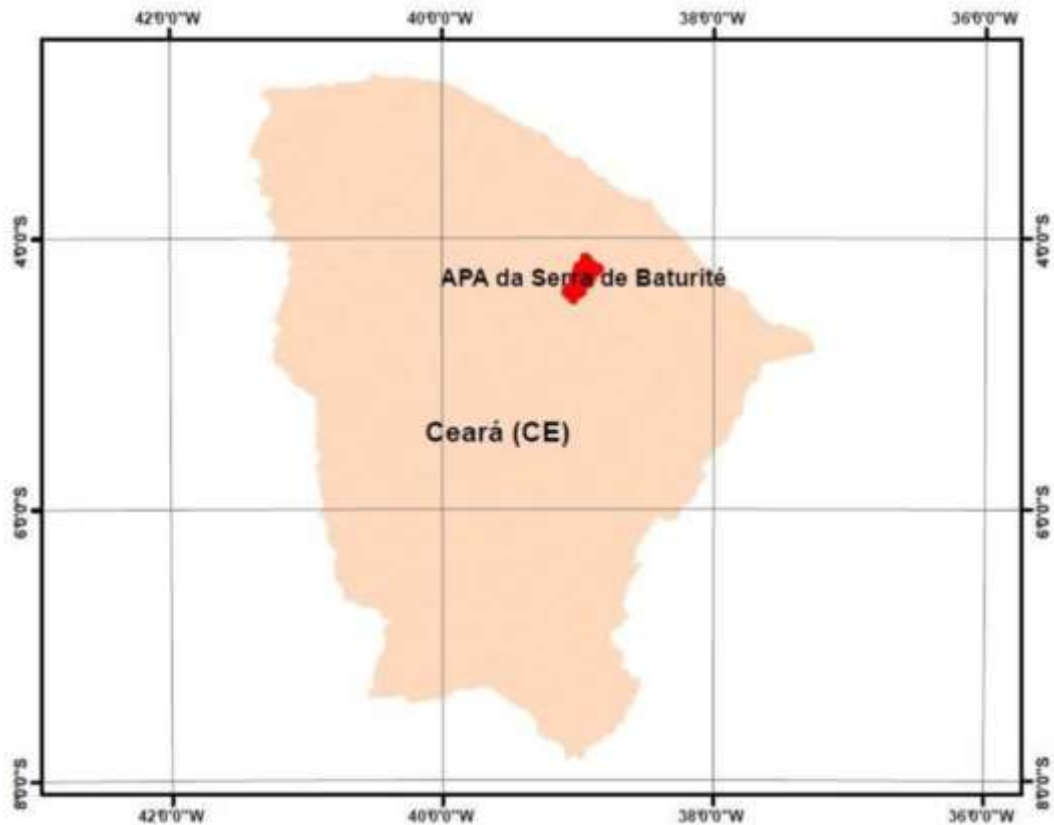


Figura 1. Cartograma de localização da APA da Serra de Baturité no Estado do Ceará. Fonte: FREITAS, 2012.

A referida APA possui a maior porcentagem de fragmentos remanescentes preservados da Mata Atlântica no Ceará. Localizada em meio ao semiárido cearense, este lugar representa um local de importante interesse biológico, tratando-se de um refúgio de espécies provenientes de habitats úmidos, como a Floresta Amazônica e a Mata Atlântica (FIGUEIREDO e BARBOSA, 1990). A temperatura média anual nessa região varia entre 20°C e 21°C e a precipitação média é de 1221 mm, com maior concentração de chuvas entre os meses de novembro à abril. Foram escolhidas duas áreas dentro da APA da Serra de Baturité (Fig. 2) para a coleta dos espécimes de formigas contaminadas pelo *Ophiocordyceps unilateralis*. As áreas foram selecionadas com base no tipo de vegetação, alta umidade do ar e temperaturas amenas na maior parte do dia. Segundo Evans (1974), as condições de alta umidade e temperatura por longos períodos do ano nas florestas tropicais são pré-requisitos ideais para as infecções fúngicas. Uma terceira área, também dentro da APA da Serra de Baturité, foi utilizada para construção de um experimento de campo, e foi escolhida por conta da proximidade com a Universidade para que houvesse um acompanhamento periódico do trabalho.

A área 1, conhecida como Campo do Batalha, é uma região de Mata Atlântica Relictual que está inserida na Unidade de Conservação de Proteção Integral Refúgio da Vida Silvestre Periquito Cara Suja, localizada na cidade de Guaramiranga.

A área 2 está inserida nas dependências do Chalé Nosso Sítio, uma propriedade privada localizada na cidade de Pacoti que abriga 150 ha de Mata Atlântica antropizada e que possui alta ocorrência de formigas contaminadas por espécies de *Ophiocordyceps*. Ambas as áreas estão situadas a cerca de 800 m de altitude em relação ao nível do mar.

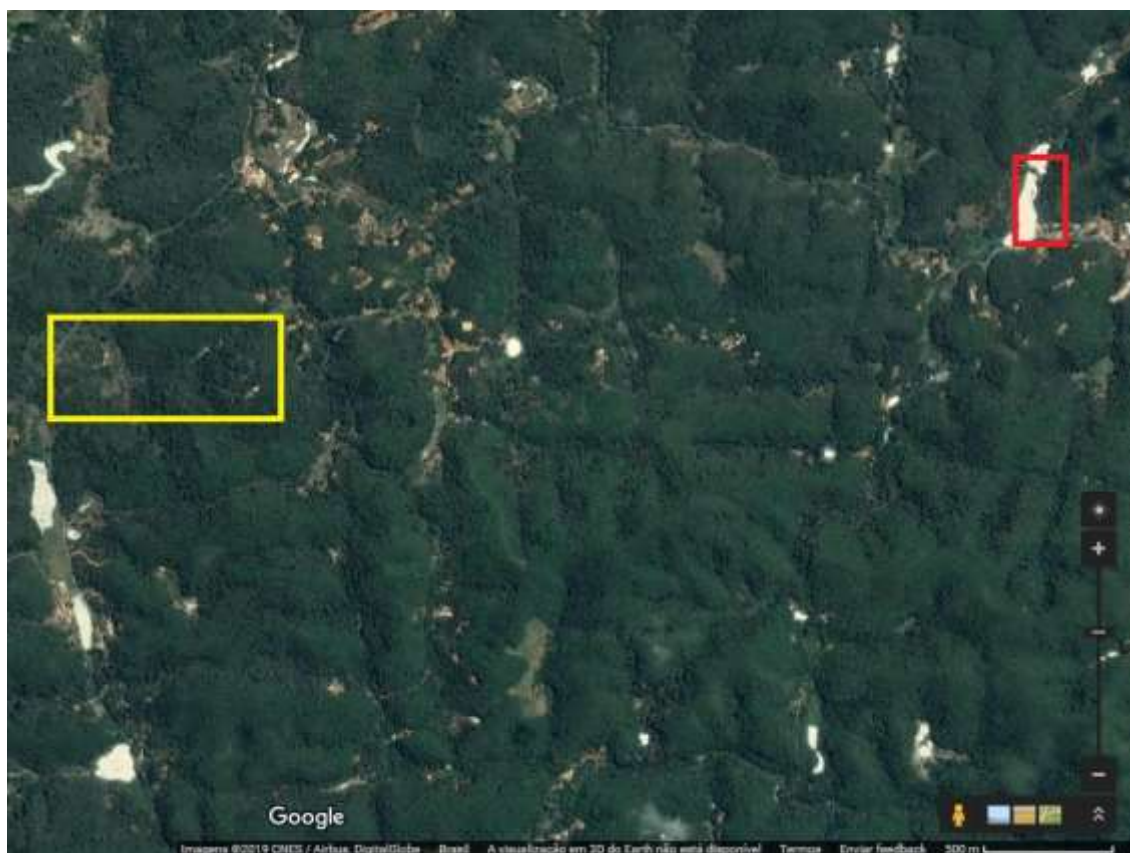


Figura 2. Imagem de satélite gerada pelo Google maps mostrando as duas áreas de coleta na APA da Serra de Baturité. Em amarelo a área 1, Refúgio da Vida Silvestre Periquito Cara Suja, e em vermelho a área 2, Chalé Nosso Sítio. Fonte: google.com/maps

A área 3 foi delimitada em um fragmento de vegetação de transição de caatinga arbustiva densa, mata seca (Floresta Subcaducifólia Tropical Pluvial) e mata úmida (Floresta Subperenifólia) da Serra de Redenção, localizado atrás do Campus das Auroras (Fig. 3) na Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB), situada a cerca de 88 m de altitude em relação ao nível do mar.



Figura 3. Área 3, Campus das Auroras na UNILAB.

2.2 COLETA DOS ESPÉCIMES

Os fungos foram coletados a partir de espécimes de formigas infectadas em diferentes estágios de desenvolvimento. Através de busca ativa dos espécimes, todas as ocorrências foram coletadas em transectos que variaram entre um e dois quilômetros de extensão. As formigas foram coletadas com pinça metálica esterilizada e acondicionada em tubos tipo Eppendorf Tubes[®] estéreis de 5 mL, e depois levadas ao laboratório de Microbiologia na UNILAB, mantidas isoladas em recipientes plásticos com temperatura média de 18°C e 60% de umidade relativa, para cultivo e posterior identificação. Foram registrados dados relacionados ao local, coletor, data, formiga hospedeira, coloração e outras características macroscópicas do corpo de frutificação dos fungos. Para evitar uma possível contaminação do fungo por algum parasita, o estroma contendo o corpo de frutificação maduro foi retirado de algumas formigas e armazenado em um tubo de vidro estéril individual até o momento do cultivo. As formigas e os corpos de frutificação foram fotografados.

2.3 PROTOCOLO PARA CULTIVO DO FUNGO

O cultivo foi realizado no Laboratório de Microbiologia da UNILAB. Estromas contendo um corpo de frutificação maduro foram fixados na tampa interna de uma placa de

Petri com vaselina, suspensos sobre batata dextrose ágar – BDA (Difco, USA) e incubados entre 24°C e 26°C. Para a descarga dos esporos sobre o BDA, foram submetidos a fotoperíodo de 12 horas, criando assim um estímulo luminoso semelhante ao encontrado no campo. As culturas obtidas foram isoladas em ágar BDA e ágar Sabouraud (Difco, USA) (ALVES, 2010) para visualização das estruturas de reprodução, utilizadas para identificação morfológica e monitorado o desenvolvimento. Os espécimes coletados em campo foram catalogados, e os seus estromas removidos cuidadosamente no interior de uma câmara de fluxo laminar, utilizando um bisturi estéril. O monitoramento do crescimento nas amostras foi realizado em intervalos de dois dias. As placas foram dispostas sobre a bancada do laboratório, abaixo de uma janela por onde entrava luminosidade solar, a uma temperatura média de 24°C. Cada placa foi envolta por filme PVC para evitar a desidratação do ágar e manter a esterilidade do meio, identificada com o número da amostra, nome do coletor e data de cultivo. Para o isolamento de cada micro-organismo, de cada amostra foi retirado um fragmento do micélio e inoculado em duas placas, uma contendo ágar BDA e na outra, ágar Sabouraud. As placas contendo os isolados foram identificadas com o prefixo ISO, nome do responsável pelo experimento e data. As mesmas foram envoltas em filme de PVC e mantidas em um ambiente claro, a uma temperatura de 24,5°C. Todo procedimento de cultivo e isolamento foi realizado dentro de uma câmara de fluxo laminar, os materiais utilizados nesses procedimentos foram esterilizados através da radiação UV e chama.

2.4 IDENTIFICAÇÃO

Para visualização das estruturas de reprodução, utilizadas para identificação morfológica, hifas e estruturas reprodutivas dos fungos foram observados com a ajuda de um estereomicroscópio Nikon® SMZ 800/1000 para as partes macroscópicas, e um microscópio biológico Nikon® Eclipse E100 em aumentos de 40x e 100x para as estruturas microscópicas, que eram comparadas com literaturas que mostram algumas características específicas para identificação de algumas espécies de *Ophiocordyceps*. Ao fim desses processos, as culturas obtidas foram armazenadas em geladeira a aproximadamente 8°C e 30% de umidade. Para identificação das formigas, foi utilizado o Guia para gêneros de Formigas do Brasil (BACCARO *et al.*, 2015).

2.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

2.5.1 Experimento de infecção das formigas por meio de esporos obtidos em laboratório

A partir da obtenção de esporos fúngicos através do cultivo, foi induzida a infecção de formigas em laboratório. Para isso, foram coletadas vinte formigas não infectadas do gênero *Camponotus* que forrageavam longe das plantas onde estavam presentes espécimes parasitados pelo fungo *Ophiocordyceps* sp. As formigas foram dispostas em cinco potes plásticos transparentes de 1000 mL com tampa, cada pote contendo cinco formigas. Em todos os potes foi adicionado uma porção de algodão embebido em água com açúcar para alimentação das formigas. Os potes foram mantidos em um local com fotofase e escotofase de 12h, umidade controlada, e a uma temperatura de aproximadamente 25°C. As formigas foram acompanhadas diariamente, a fim de se observar alguma mudança comportamental induzida pelos esporos fúngicos. O algodão foi trocado a cada dois dias para que mantivessem alimentadas durante todo o experimento. O experimento teve uma duração de 17 dias, até a morte da última formiga.

2.5.2 Experimento de infecção das formigas utilizando um fungo coletado em campo

As formigas parasitadas portando um corpo de frutificação maduro do *Ophiocordyceps* sp. coletadas para esse experimento foram armazenadas individualmente em tubos tipo Eppendorf Tubes® de 5.0 mL estéreis, para que não houvesse contaminação após a coleta. Todas as formigas saudáveis coletadas se encontravam distantes de plantas onde haviam formigas infectadas pelo *Ophiocordyceps* sp. e no geral, apresentavam o comportamento de cuidado e proteção de hemípteros sugadores de seiva, em sua totalidade, afídeos (Fig. 4). Todas as formigas, tanto as saudáveis quanto as parasitadas, foram identificadas como *Camponotus renggeri* Emery (1894).



Figura 4. *Camponotus renggeri* (Hymenoptera: Formicidae) apresentando um comportamento de cuidado e proteção com afídeos (Hemiptera: Aphididae).

Para testar a possibilidade de infecção da *C. renggeri* pelo fungo *Ophiocordyceps* sp. em laboratório, foram utilizados quatro potes plásticos de 1000 mL com tampa. No pote T-1, foram inseridas 13 formigas saudáveis e uma formiga infectada portando um corpo de frutificação fúngico maduro foi fixada na parte inferior da tampa, pela parte adaxial da folha (Fig. 5), de modo que o corpo de frutificação do fungo apontasse para as formigas, facilitando assim a dispersão dos esporos sobre as formigas saudáveis.



Figura 5. Exemplos de como o fungo foi fixado na tampa do pote plástico.

No pote T-2, foram inseridas 10 formigas saudáveis, e duas formigas infectadas pelo fungo foram dispostas no pote da mesma forma que na Figura 5. Nos potes C-1 e C-2, foram inseridos 13 e 10 formigas em cada, respectivamente, e não foram expostas ao fungo em nenhuma etapa do experimento, sendo utilizadas apenas como controle (Fig. 6). Todas as tampas dos potes foram furadas para entrada de ar, adicionando-se porções de algodão embebido em água com açúcar para alimentação das formigas, que eram substituídos a cada dois dias.



Figura 6. Experimento de infecção em laboratório utilizando um fungo natural. À esquerda, pote controle, sem infecção, à direita, pote tratamento, com infecção.

O período entre o início do experimento e a morte da última formiga foi de 26 dias, após esse período, os potes continuaram em observação por mais duas semanas, a fim de acompanhar o crescimento dos fungos nas formigas mortas.

2.5.3 Experimento de campo utilizando formigas parasitadas

Um transecto de aproximadamente 120 metros foi delimitado em uma área de mata de borda localizada na área 3. Nele foram marcadas 30 árvores de Angico (*Anadenanthera colubrina*) separadas por 4 metros entre elas. Entre essas 30 plantas, foram designados de modo alternado, três grupos controle (C1, C2 e C3) e três grupos tratamento (T1, T2 e T3) cada um com cinco plantas identificadas. Todas as plantas foram marcadas em 3 pontos distintos de observação, a 80 cm (T1 e C1), a 120 cm (T2 e C2) e a 160 cm do solo (T3 e C3). Em cada planta tratamento, fixamos uma formiga infectada em um dos pontos de observação, mas mantivemos o grupo controle inalterado. Essa diferença da altura na aplicação do tratamento nas plantas foi para que fosse observado se existe diferença na influência do fungo em diferentes extratos da planta. Nas duas primeiras semanas após a marcação das plantas houveram duas

observações do comportamento das formigas e quantificação dos espécimes presentes nelas, com um intervalo de sete dias entre cada observação. Na terceira semana após o início das observações, houve a primeira aplicação do fungo. Nesse mesmo dia, 15 formigas portando um corpo de frutificação maduro e com aspecto de recém infectadas foram coletadas em tubos tipo Eppendorf Tubes® de 5.0 mL estéreis, na área 1. Essas formigas portando o fungo foram fixadas nos galhos anteriormente marcados com uma fita adesiva de alta aderência (Fig. 7). Os locais de fixação das formigas parasitadas foi pensado para que ficasse na rota de forrageio onde se observava um maior trânsito de formigas.



Figura 7. Formigas parasitadas pelo fungo *Ophiocordyceps* sp. fixadas em galhos do Angico durante o experimento de infecção no campo.

Após a formiga parasitada ser fixada na planta, as observações ocorreram em média, a cada dois dias, até que o fungo se decompôs, por volta de quatro semanas após a fixação na planta. Para dar prosseguimento ao experimento, mais 15 fungos foram coletados na área 1, e fixados nas mesmas plantas, utilizando os mesmos métodos descritos anteriormente, e foram observados por mais quatro semanas.

2.6 TRATAMENTO DOS DADOS

A fase inicial da análise dos dados envolveu a tabulação dos resultados utilizando o programa Microsoft® Excel 2013. Para as análises estatísticas, utilizou-se o Past® version 2.17c e o Statistica® v.13.3. Para testar se existe diferença entre os grupos em relação as culturas fúngicas utilizadas no experimento de infecção das formigas por meio dos esporos obtidos em laboratório, foi realizada uma análise de covariância (ANCOVA) com distribuição de Poisson.

Foram feitas regressões combinadas com uma ANOVA entre os tratamentos e o tempo em que as formigas permaneceram vivas. No teste do experimento de infecção das formigas utilizando um fungo natural, foi realizada uma ANCOVA para avaliar se existe diferença na mortalidade das formigas com relação ao tempo e entre os tratamentos. Para testar a eficiência do fungo em repelir as formigas no experimento de campo utilizando formigas parasitadas, os dados foram logaritizados e foi feito uma ANOVA para medidas repetidas. Os fatores utilizados nessa análise foram os grupos, as alturas, o tempo e a interação entre todos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 OBTENÇÃO DE ESPOROS FÚNGICOS EM LABORATÓRIO

Através de uma análise de caracteres morfológicos mais abrangentes como coloração, quantidade de segmentos isolados ou reduzidos (pecíolos), estrutura do mesossoma e do gáster e utilizando o Guia para gêneros de Formigas do Brasil (BACCARO *et al.*, 2015), afirma-se que todas as formigas parasitadas pelo fungo *Ophiocordyceps unilateralis* coletadas pertencem ao gênero *Camponotus* (Fig. 8).



Figura 8. Variedade morfológica do fungo *Ophiocordyceps* sp. e seus variados estágios de desenvolvimento. Espécimes de *Camponotus* sp. parasitadas pelo fungo *Ophiocordyceps* sp. coletadas para cultivo.

Os espécimes coletados foram encontrados fixados na face abaxial das folhas de árvores ou em galhos, entre 0,8 e 2 metros de altura em relação ao solo. Foi observado que em ambas as áreas visitadas nesse trabalho, havia uma preferência pelas formigas parasitadas a morrerem fixadas na face abaxial das folhas de cafeeiro (*Coffea* sp.).

Após cinco dias da montagem das amostras, observou-se o crescimento de um micro-organismo filamentososo sobre o meio de cultura em algumas Placas de Petri. Uma semana após o cultivo, 70% delas já apresentavam um micélio se desenvolvendo, que variava em forma, coloração e tamanho (Tabela 1). As amostras foram identificadas com o mesmo número de identificação da formiga parasitada coletada em campo.

Tabela 1. Dados relacionados a primeira semana após a preparação das amostras.

Número da amostra	Pigmentação	Diâmetro da colônia
1	Amarelo claro	~ 0,7 cm
2	Branca	~ 4 cm
3	ND	ND
4	ND	ND
5	Cinza claro	~ 0,5 cm
6	Cinza claro	~ 0,8 cm
7	Amarelo	~ 0,6 cm
8	ND	ND
9	Amarelo nas bordas/Branca no centro	~ 1 cm
10	Amarelo claro	~ 1,1 cm

*ND – Não desenvolveu

Na segunda semana após o cultivo, observou-se mudanças significativas em todas as amostras em relação a pigmentação, tamanho da colônia e morfologia do micélio. Nas amostras 3 e 4 um hiperparasita fúngico de coloração branca e aspecto aveludado tomou conta dos corpos de frutificação fixados sobre os meios de cultura. Os fungos entomopatogênicos, como o *Ophiocordyceps*, podem ser infectados por outros fungos, chamados de hiperparasitas, sendo que estes, podem desempenhar um papel crucial no controle da interação parasita-hospedeiro. Além disso, a presença desse hiperparasita torna-o estéril, impedindo a dispersão dos seus esporos e, conseqüentemente, a contaminação de outros hospedeiros (MOROZOV *et al.*, 2007, ANDERSEN *et al.*, 2012). Geralmente, observa-se a ocorrência desse hiperparasita em formigas que foram parasitadas a algum tempo em campo nas matas úmidas do Maciço de Baturité. Por conta disso, ambas as amostras foram descartadas do experimento. As informações referentes à segunda semana após o cultivo seguem descritas na (Tabela 2).

Tabela 2. Dados relacionados a segunda semana após a preparação das amostras. Notar a ocorrência de mais de um tipo de fungo crescendo na maioria das amostras.

Número da amostra	Pigmentação	Diâmetro da colônia
1	Marrom	~ 4 cm
2	Branca	~ 9 cm
3	ND	ND
4	ND	ND
5	Marrom no centro/Branca nas bordas	~ 0,6 cm
6	Amarelo no centro/Branca nas bordas	~ 3 cm
7	Amarelo no centro/Branca nas bordas	~ 2 cm
8	Marrom no centro/Branca nas bordas	~ 2,3 cm
9	Branca por cima/Amarelo por baixo	~ 3,5 cm
10	Cultura 1 – Amarelo Cultura 2 – Branca por cima/Amarelo por baixo	~ 2 cm

*ND – Não desenvolveu

Ao compararmos as informações contidas nas tabelas 1 e 2, observa-se que durante o crescimento, as colônias mudam de forma e de coloração. A amostra 2 foi a única que apresentou um micro-organismo com aspecto e coloração uniforme e cresceu sobre toda a superfície do meio de cultura. Porém, através de uma análise morfológica e da visualização de suas partes vegetativas e reprodutivas utilizando um microscópio estereoscópio, concluiu-se que esse espécime pertence ao gênero *Penicillium*. Diante disso, essa amostra foi retirada do experimento e depositada no Laboratório de Microbiologia da UNILAB para posteriores estudos.

A partir da quarta semana após o cultivo (Tabela 3), observou-se uma diminuição no desenvolvimento dos micro-organismos filamentosos que cresceram sobre o meio de cultura em cada amostra. Nesse momento, realizou-se o isolamento de cada micro-organismo presente nas Placas de Petri.

Tabela 3. Dados relacionados a quarta semana após a preparação das amostras.

Número da amostra	Pigmentação	Diâmetro da colônia
1	Branca por cima/Marrom por baixo	9 cm
5	Branca	9 cm
6	Amarelo no centro/Branca nas bordas	~ 6 cm
7	Branca por cima/Marrom por baixo/Cinza nas bordas	9 cm
8	Marrom	~ 6 cm
9	Branca	~ 5,5 cm
10	Branca por cima/Marrom por baixo	9 cm

A amostra 8 apresentou um micro-organismo filamentosos de pigmentação escura e ausência de hiperparasitas competindo pelo substrato. Uma cultura com aproximadamente 6 cm de diâmetro e coloração marrom. O corpo de frutificação fixado sobre o meio permanecia intacto, sem a presença de um hiperparasita. Existe uma dificuldade em identificar o *Ophiocordyceps* sem a utilização de técnicas moleculares, pois como Evans (2011) mesmo relata, a taxonomia de *Ophiocordyceps unilateralis* ainda não está clara, pois a espécie-tipo parecia ser imatura e as principais características morfológicas como o ascomata, asco e ascósporos (somente observados no estágio maduro) não foram incluídas na descrição original (TULASNE & TULASNE, 1865). Por conta disso, escolhemos as amostras que possuíam um menor grau de contaminação por outros micro-organismos e isolamos a fim de testá-la nos experimentos. O isolado da amostra 8 foi identificado com o código ISO B-8 (Fig. 9) e os das amostras 1, 5, 6, 7, 9 e 10 como ISO B-1, ISO B-5, ISO B-6, ISO B-7, ISO B-9 e ISO B-10, respectivamente. Após duas semanas, observou-se um crescimento significativo das colônias em todos os isolados.

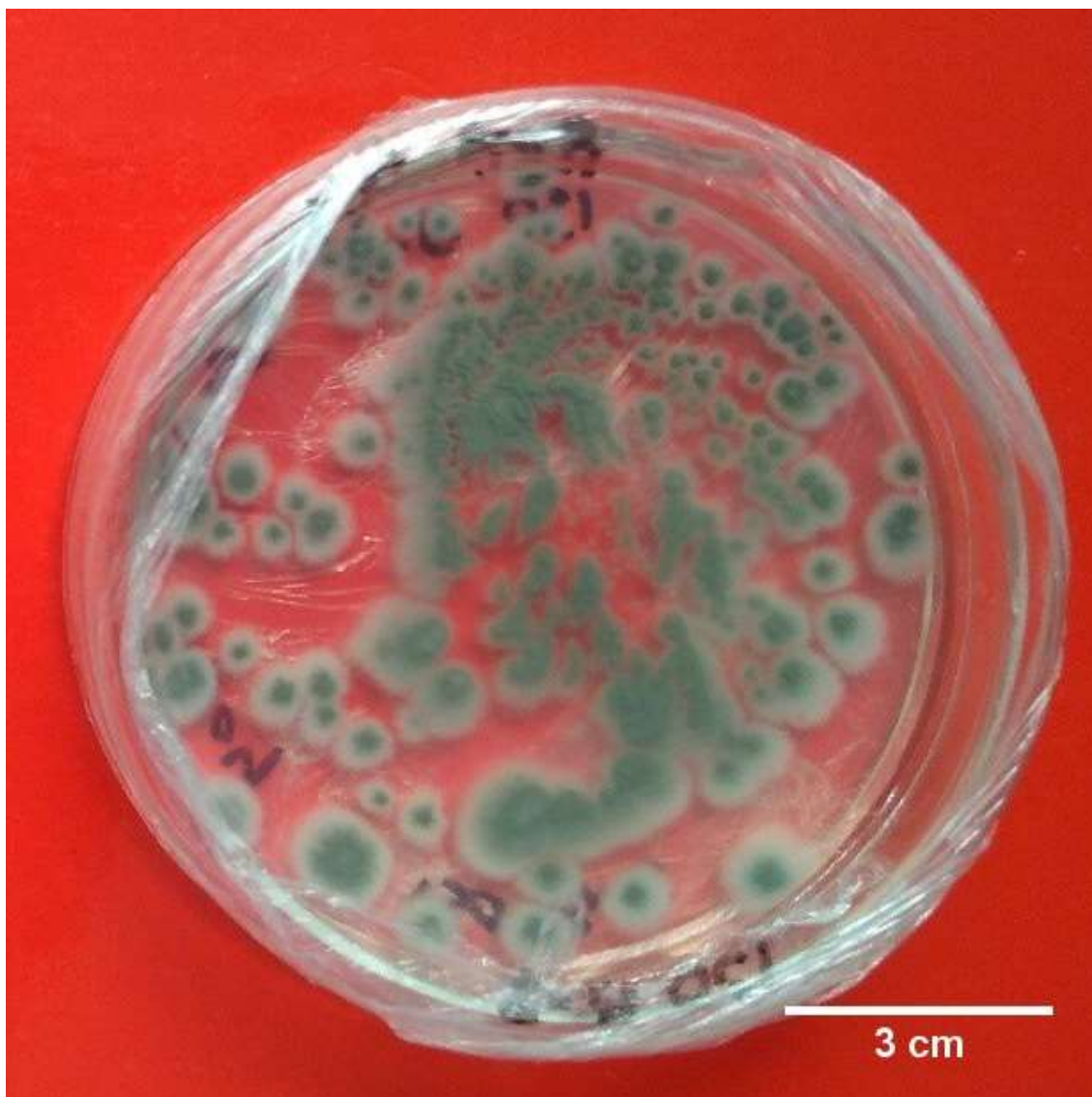


Figura 9. Isolado ISO B-8 duas semanas após a preparação das placas.

Três semanas após o isolamento, fragmentos da amostra ISO B-8 foram submetidos a um microcultivo sobre a superfície de lâminas cobertas com uma lamínula. Quatro lâminas foram cultivadas com o objetivo de acompanhar o crescimento do fungo através da observação de suas estruturas vegetativas e de reprodução a partir de um microscópio. O crescimento foi acompanhado a cada três dias. As Fig. 10A-B mostram uma micrografia do ISO B-8, mostrando aspectos microscópicos das hifas, conidióforos e esporos. A Fig. 10C foi visualizada através de uma lupa para observação das estruturas macroscópicas.

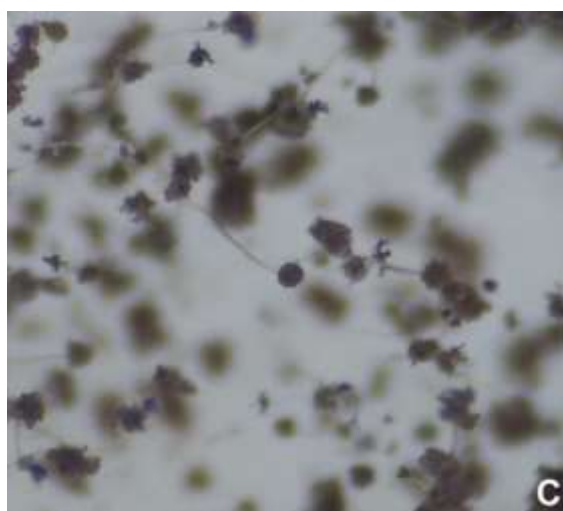
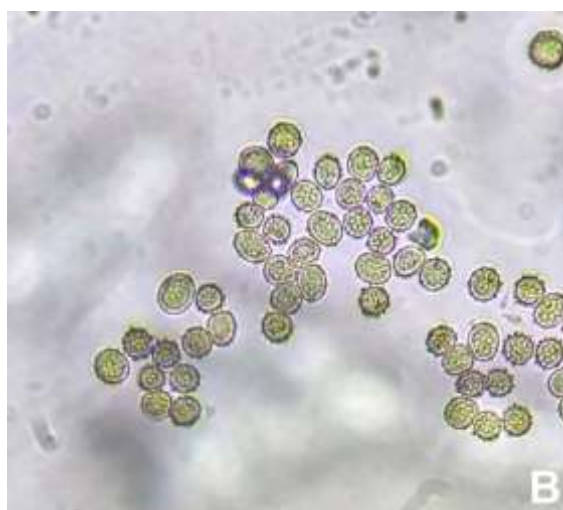


Figura 10. A- Estruturas vegetativas e reprodutivas microscópicas presentes na amostra ISO B-8, visualizadas através do microcultivo de fragmentos extraídos da amostra original com um aumento de 100x em óleo de imersão. B- Esporos fúngicos liberados pela amostra ISO B-8 visualizados em um aumento de 40x. C- Estruturas macroscópicas que emergem da superfície do fungo.

Esporos dos fungos que cresceram nas amostras ISO B-1, ISO B-7 e ISO B-10 foram coletados e armazenados em tubos tipo Eppendorf Tubes® de 5 mL estéreis, e guardados em um local escuro, com temperatura em torno de 28°C e umidade de 40%, para serem aplicados no experimento de infecção das formigas em laboratório.

3.2 EXPERIMENTO DE INFECÇÃO DAS FORMIGAS POR MEIO DE ESPOROS OBTIDOS EM LABORATÓRIO

Nos potes identificados como T-ISO B-1, T-ISO B-7 e T-ISO B-10 foram aplicados esporos dos fungos obtidos nas amostras ISO B-1, ISO B-7 e ISO B-10, respectivamente. No pote identificado como controle, as formigas não foram expostas a nenhum esporo fúngico. A partir da análise do experimento, constatou-se que houve uma diferença na mortalidade de formigas dependendo do grupo experimental e da cultura utilizada (ANOVA: $F_{2,60} = 4.9$, $p = 0.01$). O tratamento T-ISO B-1 foi mais eficiente na morte das formigas, comparado aos demais tratamentos e ao grupo controle. Observou-se também que a sobrevivência das formigas diminuiu ao longo do tempo, com quedas diferentes dependendo da cultura original da infecção ($F_{2,60} = 10.9$, $p < 0.01$). Os grupos de formigas infectados pela cultura T-ISO B-1 morreram mais rápido que o controle e as demais culturas (Fig. 11).

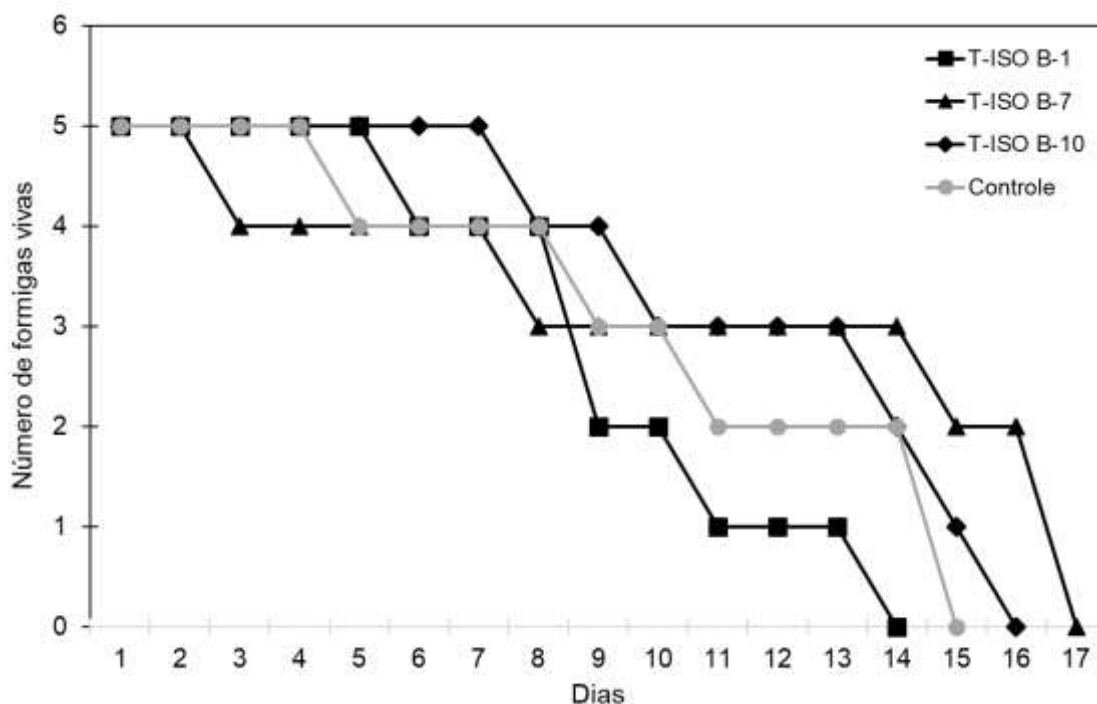


Figura 11. Número de formigas vivas por dia durante o experimento de infecção com esporos cultivados obtidos a partir das amostras ISO B-1, ISO B-7 e ISO B-10.

Como o intuito desse experimento era testar se os esporos fúngicos obtidos em laboratório apresentavam algum efeito no comportamento das formigas em geral, foram utilizadas espécimes dos gêneros mais comuns encontrados no dia-dia. Não foi observado nenhuma característica que aparentasse um crescimento fúngico nas formigas em nenhum dos grupos durante o período de observação do experimento. Pode-se dizer que no geral, as formigas que foram expostas aos esporos fúngicos obtidos em laboratório morreram mais rapidamente e a possibilidade da cultura em que os esporos ISO B-1 foram extraídos serem de um fungo entomopatogênico é maior com relação as outras culturas. Porém, não pode-se afirmar que nenhum desses esporos fúngicos são eficazes no controle biológico de formigas, pois não foi confirmado que as amostras nas quais os esporos utilizados nesse experimento foram extraídos eram de *Ophiocordyceps* sp. Para posteriores experimentos, sabe-se que o tempo de mortalidade das formigas varia entre as amostras obtidas através do cultivo. Contudo, se as formigas saudáveis utilizadas tivessem sido identificadas e fossem todas pertencentes ao gênero *Camponotus*, a probabilidade de infecção seria maior, pois existem trabalhos que afirmam que esse fungo é específico para certas espécies de formigas.

3.3 EXPERIMENTO DE INFECÇÃO DAS FORMIGAS UTILIZANDO UM FUNGO COLETADO EM CAMPO

Foram coletadas três formigas identificadas como pertencendo a espécie *Camponotus renggeri* parasitadas pelo fungo *Ophiocordyceps* sp., apresentando um corpo de frutificação maduro em um estágio aparentemente recente de infecção, e 46 formigas pertencentes a mesma espécie das parasitadas (*C. renggeri*) vivas e saudáveis, através de busca ativa. As formigas saudáveis que foram confinadas junto as formigas parasitadas morreram mais rapidamente comparado as que não foram expostas a nenhum fungo (Fig. 12). Além disso, as formigas que foram expostas ao fungo (T-1 e T-2) apresentaram um comportamento mais vagaroso ao se locomoverem no pote, comparado as formigas do grupo controle (C-1 e C-2). Valicente (2009) explica esse comportamento afirmando que quando infectados por fungos entomopatogênicos, os insetos param de se alimentar e tomam-se mais lentos. Consequentemente, acabam morrendo relativamente rápido, às vezes em uma posição ereta, característica essa que também foi observada em nosso experimento.

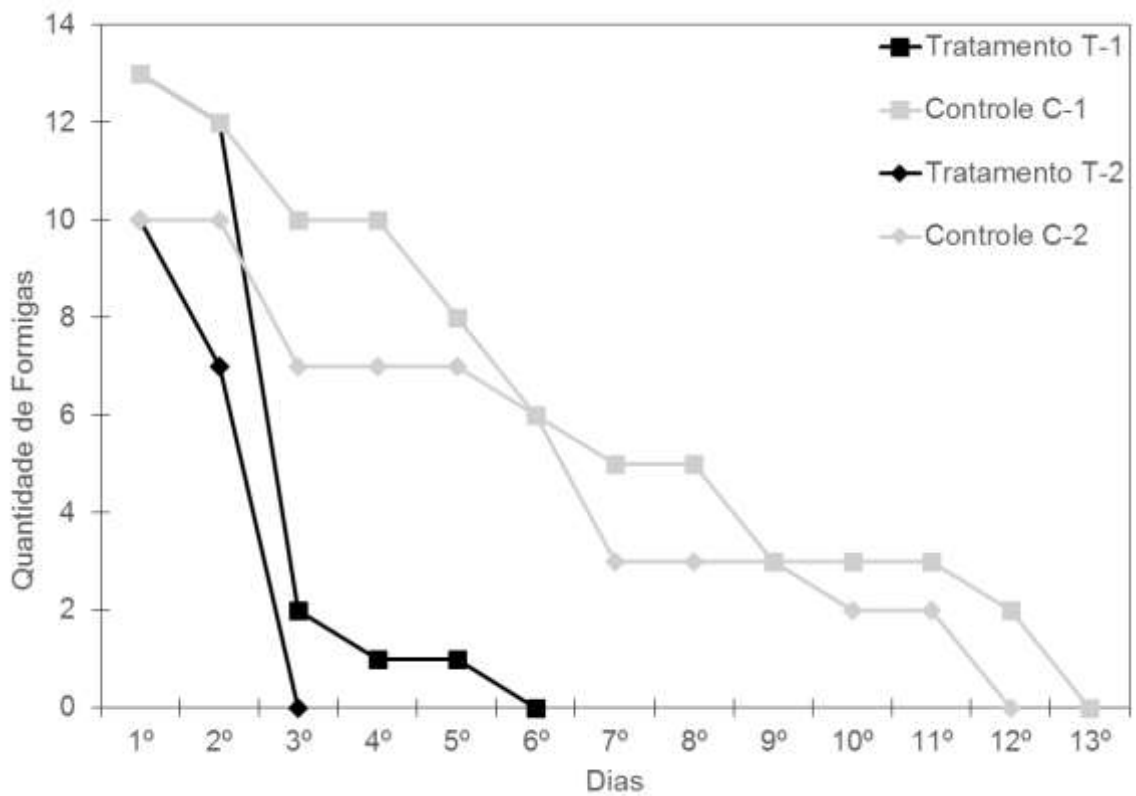


Figura 12. Número de formigas vivas por dia durante o experimento de infecção com o fungo coletado em campo.

Foi observado uma diferença na mortalidade das formigas em relação aos grupos tratamento e controle (ANCOVA: $p= 0,00$). Observou-se também que em algumas formigas mortas nos potes que foram expostas ao fungo, seus corpos aparentavam estarem ocos, e em outras, um micélio claro cresceu brotando da região da mandíbula e das articulações do corpo (Fig. 13). Essas características também são citadas no trabalho de Valicente (2009), e não foram observados nas formigas do grupo controle.

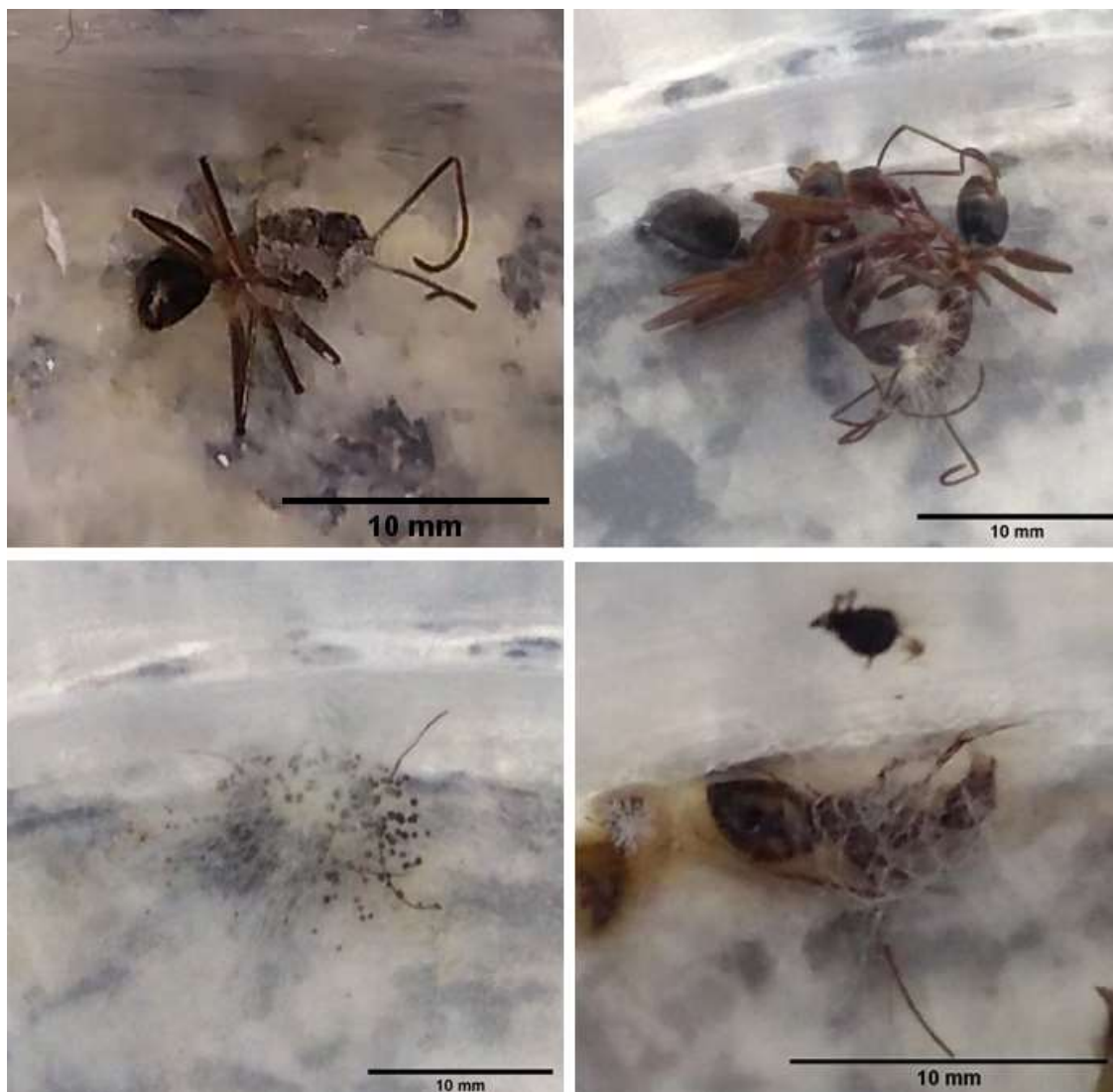


Figura 13. Formigas presentes nos potes T-1 e T-2 apresentando crescimento de micélio emergindo da região da mandíbula e das articulações.

Como esse experimento foi realizado utilizando somente formigas saudáveis e parasitadas da espécie *C. renggeri*, podemos afirmar que a presença desse fungo promove um controle biológico dessas formigas, provocando uma infecção em todos os indivíduos que foram expostos a ele. As formigas da espécie *C. renggeri* que foram escolhidas para esse experimento foram encontradas interagindo com afídeos, sendo essa interação formiga-afídeo um dos objetos de estudo desse trabalho. Quando essa interação está presente em sistemas de cultivo agrícolas, pode gerar diversos problemas às plantas e ao controle biológico natural, pois as formigas mantêm o crescimento da população dos afídeos durante todo o ciclo de vida das plantas causando danos na produtividade da mesma. Além do mais, Araújo (2018) descreveu o fungo *Ophiocordyceps camponoti-renggeri* Araújo, H.C. Evans & D.P. Hughes (2018) parasitando espécimes de *C. renggeri* no Brasil, corroborando as expectativas em obter êxito

na modificação comportamental, ou até mesmo na infecção dessas formigas nesse experimento. Como essa infecção foi realizada em laboratório, em uma condição climática e alimentar totalmente diferente do que é visto em campo, onde essa infecção ocorre de forma natural, esperava-se que não houvesse uma manifestação do *Ophiocordyceps* sp. como no seu local natural de ocorrência, construindo um corpo de frutificação conspícuo que emerge dos seus hospedeiros. Observa-se também que no tratamento T-2, onde foram inseridas duas formigas parasitadas, as formigas saudáveis foram infectadas mais rapidamente em relação ao tratamento T-1. A ideia de dobrar o número de formigas infectadas no T-2 foi para avaliar se existia alguma diferença no comportamento das formigas saudáveis ou uma possível melhora na capacidade de infecção das mesmas, comparado ao T-1.

3.4 EXPERIMENTO DE CAMPO UTILIZANDO FORMIGAS PARASITADAS

Foram identificados quatro gêneros de formigas que forrageavam nas árvores de angico, *Camponotus* sp., *Cephalotes* sp., *Pseudomyrmex* sp. e *Pheidole* sp., sendo *Camponotus crassus* Mayr (1862) a espécie mais abundante nessa planta. Essas formigas sobem nessas plantas para se alimentarem nos seus nectários extraflorais (NEFs) e, em contrapartida, promovem a proteção contra herbívoros. Além de formigas, observou-se também a presença de aracnídeos, coleópteros, lepidópteros e uma grande quantidade de proscopídeos (Orthoptera: Proscopiidae). O período de execução do experimento foi de dez semanas, este teve o objetivo de testar se a presença do fungo *Ophiocordyceps* reduz a quantidade de formigas que forrageiam na planta, e se existe diferença desse comportamento em diferentes alturas (Fig. 14).

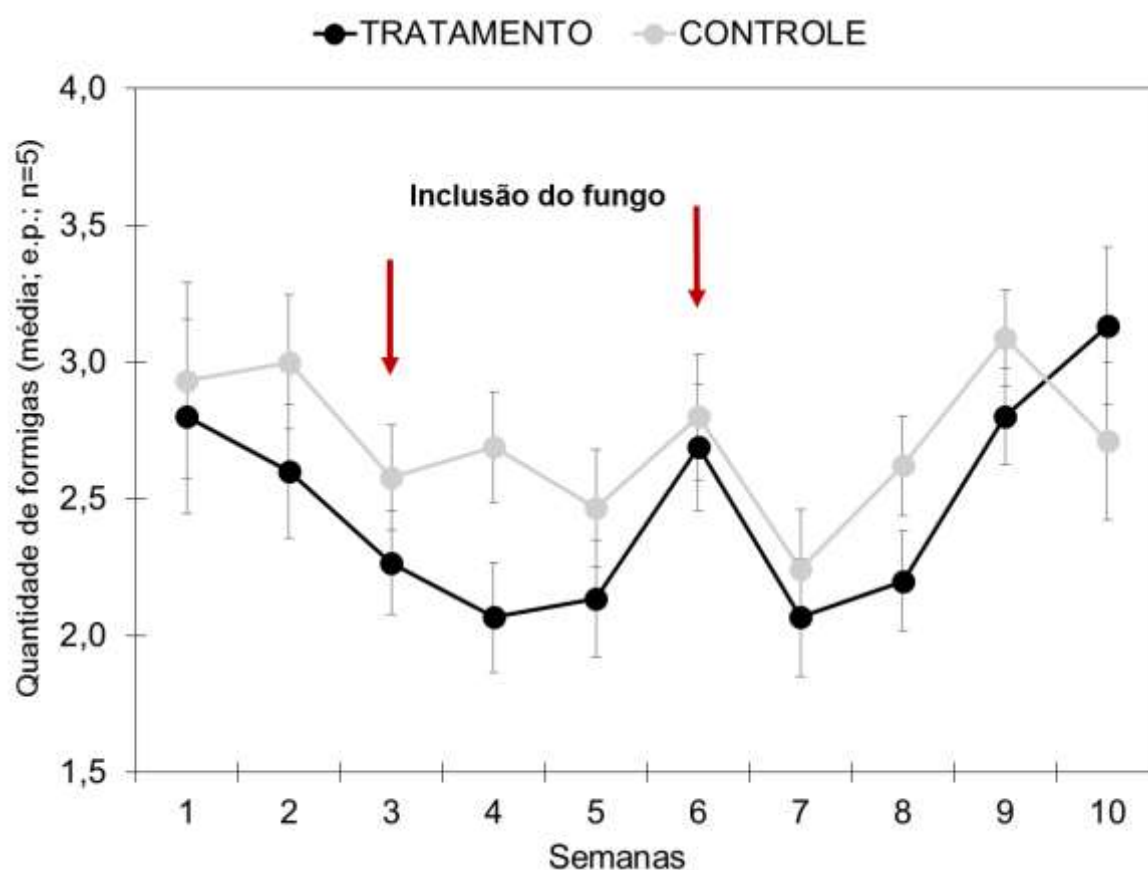


Figura 14. Comparação entre a quantidade de formigas observadas forrageando nas plantas nos grupos tratamento e controle em cada uma das 10 semanas de experimento. Setas vermelhas: inclusão do fungo.

Foram observadas 778 formigas forrageando nas plantas durante as dez semanas de experimento. Houve grande variação na quantidade de formigas forrageando ao longo do tempo (ANOVA: $F_{4, 104} = 5.6$, $p < 0.01$), em todos os grupos (ANOVA: $F_{4, 104} = 0.73$, $p = 0.06$). Nas primeiras duas semanas de observação, notou-se uma variação na quantidade de formigas nos grupos tratamento e controle que se mantém durante todo o experimento. Essas variações se justificam pelo comportamento de forrageio das formigas ser inconstante, devido a fatores climáticos, disponibilidade de alimento, horário ou presença de predadores. Entretanto, a partir da inclusão do fungo no grupo tratamento na terceira semana, observou-se um decréscimo acentuado no número de formigas nessas plantas, comparado as duas semanas anteriores. Essa queda foi bastante elevada quando comparado ao grupo controle. Na quinta semana, observou-se que o número de formigas forrageando nas plantas do grupo tratamento ainda se manteve baixo, mesmo existindo uma variação no grupo controle em relação à semana anterior. Na sexta semana os fungos se encontravam deteriorados, alguns deles já haviam se degradado por inteiro, esse fato se deu principalmente por fatores climáticos como temperatura elevada e baixa

umidade. Percebe-se que nessa mesma semana, ocorreu um aumento considerável na quantidade de formigas no grupo tratamento, e uma alta no grupo controle.

Por conta da deterioração dos fungos, foi realizada uma nova inclusão de formigas infectadas, e foi observado que na semana seguinte ocorreu mais uma vez um decréscimo acentuado na quantidade de formigas no grupo tratamento. Apesar da quantidade de formigas em ambos os grupos terem diminuído abruptamente na sétima semana, a recuperação no grupo controle foi mais rápida, comparado ao grupo tratamento, que se manteve com um baixo quantitativo de formigas em suas plantas nas duas semanas que sucederam o pulso. A partir da nona semana de experimento é que se observa uma alta na quantidade de formigas no grupo tratamento, semana essa em que já se podia observar um grau acentuado de degradação em muitas das amostras de fungos que foram fixados nas plantas. Na décima e última semana do experimento, percebe-se que a maioria das formigas tiveram preferência pelas plantas que haviam sido incluídas o fungo, acredita-se que esse comportamento ocorreu devido a maior disponibilidade de alimento nessas plantas, visto que na presença do fungo, elas estavam sendo menos visitadas pelas formigas, portanto, houve um aumento na quantidade de alimento disponível nelas, já as plantas do grupo controle, por não haver nenhuma interferência que comprometesse o forrageio natural das formigas, o alimento estava sendo consumido normalmente por elas.

A Fig. 15 contém a quantidade média de formigas encontradas nas plantas do grupo tratamento e do grupo controle. Percebe-se que nas plantas que não foram expostas ao fungo, houve uma maior preferência de forrageio por parte das formigas.

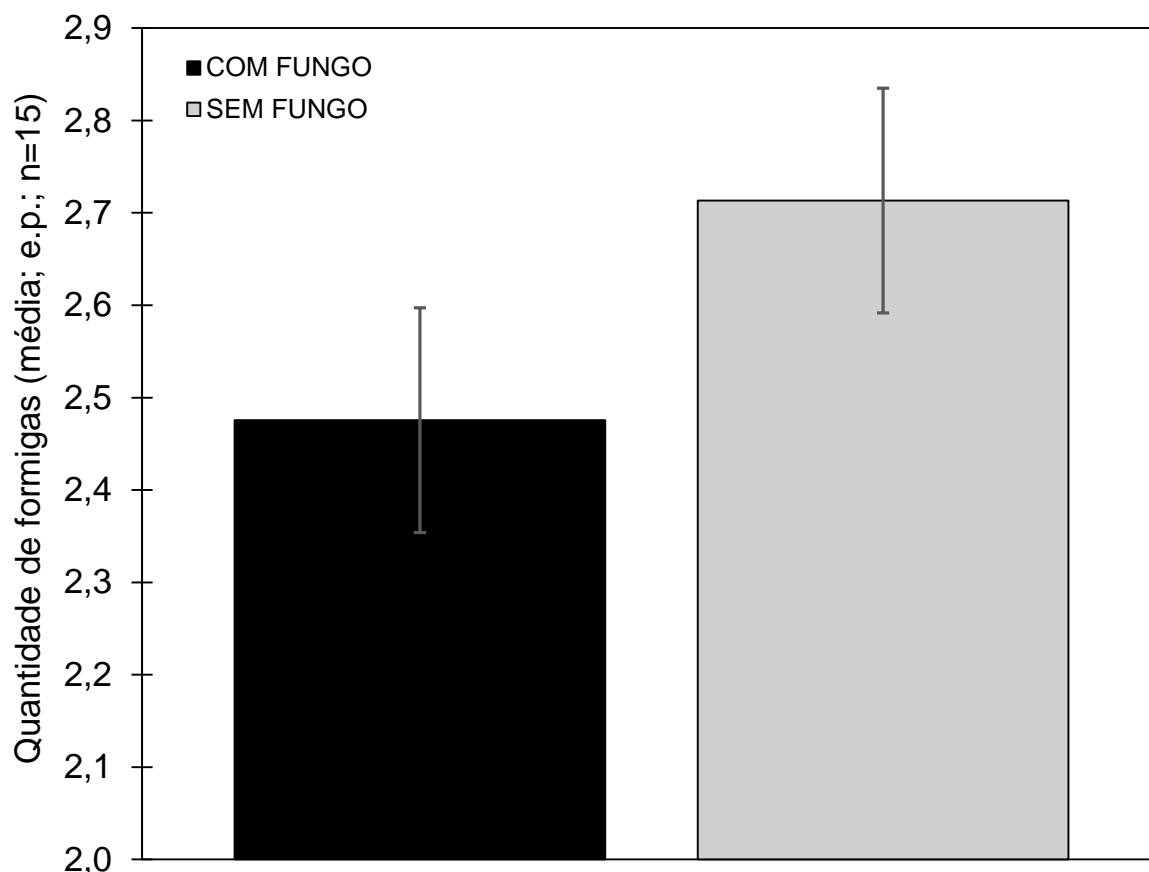


Figura 15. Comparação entre a quantidade de formigas nas plantas que foram expostas ao fungo e as que não foram expostas.

No geral, a presença do fungo reduziu a atividade das formigas nas plantas (ANOVA: $F_{1,26} = 3.9$, $p = 0.06$) durante todo o experimento (ANOVA: $F_{4,104} = 0.8$, $p = 0.6$) e em todas as partes das plantas (ANOVA: $F_{8, 104} = 1.3$, $p = 0.24$). Fatores como temperatura e umidade podem diminuir a atividade do fungo e levá-lo a morte. Acredita-se que se esse experimento estivesse sido executado no ambiente natural onde o fungo se desenvolve, os resultados seriam mais significativos. Também, o fungo *Ophiocordyceps* sp. é um parasita específico de algumas espécies de formigas, mais comumente encontrado parasitando espécimes de *Camponotus* sp. Os dados coletados nesse experimento foram para todas as formigas que se encontravam nas plantas, sem distinção de gênero. Existe a possibilidade de que os fungos inclusos no experimento tenham repellido apenas as formigas pertencentes ao gênero *Camponotus*, hipótese que não pode ser comprovada por esse experimento.

Houve diferença na quantidade de formigas forrageando nas diferentes alturas da planta ($F_{2,26} = 65$, $p < 0.001$), e todas as alturas foram afetadas pela presença do fungo ($F_{1,26} = 4$, $p < 0.01$) (Fig. 16). A 80 cm, existe uma tendência maior de se encontrar uma população maior de

formigas forrageando, já a 120 cm, observa-se uma tendência menor na quantidade de formigas na planta, e a 160 cm, uma tendência ainda menor. Observa-se também que nas plantas que não foram inseridas o fungo, existe uma quantidade maior de formigas forrageando por toda a planta comparado as que foram expostas ao fungo. Nota-se, também, que o fungo conseguiu diminuir o número de formigas nas plantas independentemente da altura que foi exposto. A 120 cm, observamos que o fungo foi mais eficiente em repelir as formigas, pois a diferença da média das formigas entre as plantas do grupo tratamento e as do grupo controle é maior a 120 cm, em segundo lugar a 80 cm, e por último, a 160 cm. O próximo passo pra esse experimento é conhecer qual a concentração do fungo é necessária para que o efeito de repelência nas formigas seja maior e duradouro.

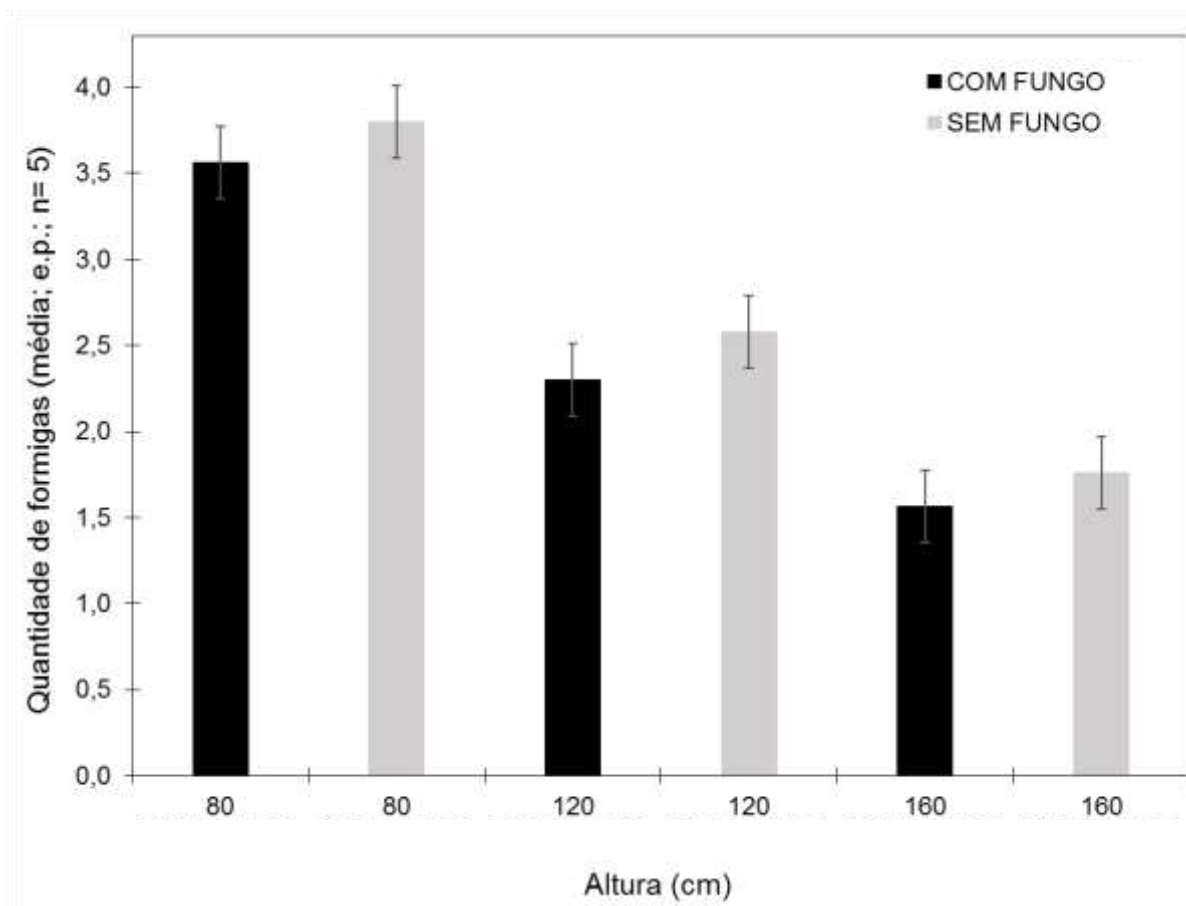


Figura 16. Número médio de formigas encontradas forrageando em cada altura, na presença e ausência do fungo.

4 CONCLUSÕES

Através dos experimentos, foi demonstrado que os esporos de fungos entomopatogênicos são eficientes em provocar alterações no comportamento das formigas, alterando a frequência de atividade e provocando a morte das formigas, comprovando o objetivo desse estudo. Além disso, dependendo da qualidade do fungo, podem ser mais virulentos na infecção. Observou-se que o fungo *Ophiocordyceps* sp. encontrado parasitando a formiga *Camponotus renggeri* em campo, é eficiente no controle de formigas da mesma espécie, apesar de haver uma variação dependendo da origem do fungo. Esse resultado foi comprovado pelo experimento de laboratório utilizando um fungo natural e se torna importante para criar metodologias de produção desse fungo em larga escala para o controle das formigas. Além de comprovar o fato de que é possível a aplicação dos esporos do *Ophiocordyceps* sp. como ferramenta de controle biológico de formigas.

Pensando no seu possível uso na lavoura, o *Ophiocordyceps* sp. mostrou eficácia em repelir as formigas nas plantas, visto durante o experimento de campo, o que indica o uso no controle biológico de formigas-praga da lavoura, especialmente, *Camponotus* sp. que protege herbívoros sugadores de seiva. Através desse resultado foi possível comprovar a hipótese de que os esporos aplicados em plantas interferem na atividade das formigas, reduzindo a sua quantidade nas plantas.

Estudos complementares devem ser conduzidos para determinar qual a concentração ideal que o fungo deve ser aplicado nas plantas para que seu poder de atuação seja duradouro. Além disso, experimentos de campo envolvendo a interação formiga-hemíptero precisam ser realizados para comprovar se os esporos do *Ophiocordyceps* possuem a mesma eficiência em infectar essas formigas como teve em laboratório, reduzindo a ocorrência dessa interação.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S.B. (Coord). **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ. 1163p, 1998.

Alves, Roberto Teixeira. **Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos** / Roberto Teixeira Alves, Marcos Faria – Palatina, DF : Embrapa Cerrados, 2010.

ALVES-SILVA, E. BACHTOLD, A. BARÔNIO, G.J., TOREZAN-SILINGARDI H.M. & DEL-CLARO, K. **Ant-herbivore interactions in an extrafloral nectaried plant: are ants good plant guards against curculionid beetles?** Journal Natural History. doi:10.1080/00222933.2014.954020. 2014

ANDRADE, C.F.S. **Epizootia natural causada por *Cordyceps unilateralis* (Hypocreales, Euascomycetes) em adultos de *Camponotus* sp. (Hymenoptera, Formicidae) na região de Manaus, Amazonas, Brasil**. Acta Amazônica. 10(3): 671-677, 1980.

ARAÚJO, J.P.M. & HUGHES, D.P. **Diversity of entomopathogen fungi: Which groups conquered the insect body?**. bioRxiv doi: 10.1101/003756. 2014.

Araújo J.P.M, Evans H.C, Geiser D.M, Mackay W.P, Hughes D.P. **Unravelling the diversity behind the *Ophiocordyceps unilateralis* complex: Three new species of zombie-ant fungi from the Brazilian Amazon**. 2014.

Araújo, J.P.M., Evans, H.C., Kepler, R., Hughes, D.P. **Zombie-ant fungi across continents: 15 new species and new combinations within *Ophiocordyceps***. I. Myrmecophilous hirsutelloid species. Studies in Mycology 90: 119–160. 2018.

ASSUNÇÃO, M.A.; TOREZAN-SILINGARDI, H.M. & DEL-CLARO, K. **Do ant visitors to extrafloral nectaries of plants repel pollinators and cause an indirect cost of mutualism?** FLORA. <http://dx.doi.org/10.1016/j.flora.2014.03.003> - Flora 209. 244–249. 2014.

AZEVEDO, J.L.; MESSIAS, C.L. **Aspectos genéticos do controle biológico de insetos por fungos**. Genética de micro-organismos em biotecnologia e engenharia genética. Piracicaba: Fealq, 1985.

BACCARO, Fabricio B. et al. **Guia para gêneros de formigas do Brasil**. Manaus: Inpa, 2015. 388 p.

BARÔNIO, G.J & DEL-CLARO, K. **Increase in ant density promotes dual effects on bee behaviour and plant reproductive performance.** Arthropod-Plant Interactions. DOI 10.1007/s11829-017-9573-x. 2017.

BARROS, E.M.; TORRES, J.B.; BUENO, A.F. **Oviposição, Desenvolvimento e Reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em Diferentes Hospedeiros de Importância Econômica.** Neotropical Entomology 39(6). 996-1001. 2010.

Becher, P.G., Jensen, R.E., Natsopoulou, M.E. et al. **Infection of *Drosophila suzukii* with the obligate insect-pathogenic fungus *Entomophthora muscae*.** J Pest Sci (2018) 91: 781.

CAMPOS-FARINHA, Ana Eugênia de C. **INSETOS SUGADORES PRAGAS DAS PLANTAS ORNAMENTAIS.** Pariquera-açu: Instituto Biológico, 2006.

CORRÊA-FERREIRA, B.S.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; SCHOAVENGERST, C.C.; OLIVEIRA, M.C.N. de. **População de percevejos e danos causados às culturas de soja e milho em sucessão.** VIII Congresso Brasileiro de Soja. Goiânia, GO. 150-153. 2018

Delabie, J. H. **Trophobiosis between Formicidae and Hemiptera (Sternorrhyncha and Auchenorrhyncha): an overview.** Neotropical Entomology, 30(4), 501-516. 2001.

Del-Claro, K. **Multitrophic relationships, conditional mutualisms, and the study of interaction biodiversity in tropical savannas.** Neotropical Entomology, 33(6), 665-672. 2004.

Emery, C. **Viaggio del dottor Alfredo Borelli nella Repubblica Argentina e nel Paraguay.** VIII. Formiche. Boll. Mus. Zool. Anat. Comp. R. Univ. Torino 9. 1 186: 1-4. 1894. (page 3, worker, queen described).

Evans CH. **Natural control of arthropods, with special reference to ants (Formicidae) by fungi in the tropical high forest of Ghana.** Journal of Applied. Ecology. 11: 37- 49, 1974.

Evans, H.C. **Entomogenous fungi in the tropical forest ecosystems: an appraisal.** Ecol. Entomol. 7, 47-60. 1982A.

Evans H.C., Samson R.A. ***Cordyceps* species and their anamorph pathogenic on ants (Formicidae) in tropical forest ecosystems. I. The *Cephalotes* (Myrmicinae) complex.** Transactions of the British Mycological Society. 79: 431–453, 1982B.

EVANS, H.C., ELLIOT, S.L. & HUGHES, D.P. **Hidden Diversity Behind the Zombie-Ant Fungus *Ophiocordyceps unilateralis*: Four New Species Described from Carpenter Ants in Minas Gerais, Brazil.** Plos One. 6(3): 17024. doi:10.1371/journal.pone.0017024. 2011.

Fagundes, R., Del-Claro, K., & Ribeiro, S. P. **Effects of the trophobiont herbivore *Calloconophora pugionata* (Hemiptera) on ant fauna associated with *Myrcia obovata* (Myrtaceae) in a montane tropical forest.** Psyche: A Journal of Entomology, 2012.

FAGUNDES, R., RIBEIRO, S.P. & DEL-CLARO, K. **Tending-Ants Increase Survivorship and Reproductive Success of *Calloconophora pugionata* Drietch (Hemiptera, Membracidae), a Trophobiont Herbivore of *Myrcia obovata* O.Berg (Myrtales, Myrtaceae).** Sociobiology, 60(1): 11-19. 2013.

FAGUNDES, R., DÁTILLO, W., RIBEIRO, S.P., RICO-GRAY, V. & DEL-CLARO, K. **Food source availability and interspecific dominance as structural mechanisms of ant-plant-hemipteran multitrophic networks.** Arthropod Plant Interactions. 2016. DOI 10.1007/s11829-016-9428-x

FARIA, M.R. & MAGALHÃES, B.P. **O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil.** Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, n. 22. 2001.

FIGUEIREDO, M. A.; BARBOSA, M. A. **A vegetação e flora na serra de Baturité.** Coleção Mossoroense. Série B, n.747. 1990.

FLATT, T.; WEINSSER, W. W. **The Effects of Mutualistic Ants on Aphid life History traits.** Ecology, Basel, Switzerland, 81: 12, 2000.

Freitas, Ivan Araripe de Paula. **Análise da dinâmica de ocupação e uso da terra utilizando técnicas de sensoriamento remoto e geoprocessamento: o caso da área de proteção ambiental (AP) da Serra de Baturité (CE).** Dissertação (mestrado) – Universidade Católica de Brasília. Brasília – DF, 2012.

GARCIA, M.O. **Utilização de fungos entomopatogênicos para o controle de *Orthezia praelonga* (Sternorrhyncha: Ortheziidae).** Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP. 2004.

Leite, L.G., et al. **Comportamento de isolados do fungo *Zoophthora radicans* sobre *Empoasca Kraemeri*.** ECOSSISTEMA. ESPIRITO SANTO DO PINHAL, SP. vol. 2. n. 1. 16-22. 1996

MANTOVANI, W. **Conservação de biodiversidade: importância das serras úmidas no nordeste semi-árido brasileiro.** In: OLIVEIRA, T. S. & ARAÚJO, F.S. (Org.). *Diversidade e Conservação da Biota na Serra de Baturité, Ceará.* Fortaleza: Edições UFC, COELCE, 2006. p. 3-15.

Mayr, G. **Myrmecologische Studien.** Verh. K-K. Zool.-Bot. Ges. Wien 12: 649-776. 1862.

Mora et al. **Fungos entomopatogênicos: enzimas, toxinas e fatores que afetam a diversidade.** *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande*, v.18, n.3, p.335-349, 2016.

MORAES, G. J. de; BERTI FILHO, E. **Controle biológico de pragas no Brasil.** *Rev. USP, São Paulo*, 64, 2005.

MORAES, J.G.L. et al. **Flutuação populacional do pulgão e seus inimigos naturais na cultura do algodoeiro.** *Revista de Ciências Agroambientais, Alta Floresta, MT*, v.12, n.1, p.1-5, 2014.

MORAES et al. **Distribuição espacial do pulgão em algodoeiro e cálculo do número de amostras.** *Acta Iguazu, Cascavel*, v.6, n.3, p. 91-97, 2017.

Oliveira, Iuri Montandon de. **Aspectos biológicos do fungo entomopatogênico *Aschersonia* sp. cultivado em diferentes meios de cultura.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 47 p. 2008.

ORLANDELLI, R.C. & PAMPHILE, J.A. **Fungo entomopatogênico *Metarhizium Anisopliae* como agente de controle biológico de Insetos Pragas.** *SaBios: Rev. Saúde e Biol.*, vol. 6, n.2, p.79-82. 2011.

PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.M.S.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Ed). **Controle Biológico no Brasil: parasitoides e predadores.** São Paulo: Ed. Manole, 635p, 2002.

RENAULT, C. K.; BUFFA, L. M.; DELFINO, M. A. **An aphid-ant interaction: effects on diferente trophic levels.** *Ecol Res.*, Tsukuba, Japão, 20: 71-74, 2005.

ROGGIA, Samuel et al. **Ácaros predadores e o fungo *Neozygites floridana* associados a tetraniquídeos em soja no Rio Grande do Sul.** *Pesq. agropec. bras.* Brasília, v. 44, n. 1, p. 107-110, Jan. 2009 .

SANTOS, Christiane Almeida dos. et al. **Desenvolvimento de *Helicoverpa* spp. em milho Bt com expressão de diferentes proteínas.** Pesq. agropec. bras., Brasília, v. 51, n. 5, p. 537-544, May 2016.

SILVA, Rafael Azevedo da. et al. **Phytophagous insects in cotton crop residues during the fallow period in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 53, n. 8, p. 875-884, 2018.

Silva, Jaqueline, Vieira, Maria das Graças, Veras, Gustavo. **Gestão de Unidades de Conservação: um estudo de caso na Área de Proteção Ambiental da Serra de Baturité-CE.** Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade. 1(1): 23-33 ISSN 2359-1412. 2014.

STEFANI, V., PIRES, T.L., TOREZAN-SILINGARDI, H.M. & DEL-CLARO, K. **Beneficial Effects of Ants and Spiders on the Reproductive Value of *Eriotheca gracilipes* (Malvaceae) in a Tropical Savanna.** PLoS ONE. 10(7): e0131843. doi:10.1371/journal.pone.0131843. 2015.

SUNG, G.H., HYWEL-JONES, N.L., SUNG, J.M., LUANGSA-ARD, J.J., SHRESTHA, B. & SPATAFORA, J.W. **Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi.** *Studies in Mycology*. 57(1)(1): 5-59, 2007.

Tulasne, LR, Tulasne C. **Selecta Fungorum Carpologia III.** Paris Museum, 221 p. Underwood E, Fisher B. 2006. The role of ants in conservation monitoring: If, when, and how. *Biological Conservation*, 132: 166-182, 1865.

Torres Acosta R.I., Humber R.A., Sánchez-Peña S.R. ***Zoophthora radicans* (Entomophthorales), a fungal pathogen of *Bagrada hilaris* and *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Pentatomidae and Triozidae): Prevalence, pathogenicity, and interplay of environmental influence, morphology, and sequence data on fungal identification.** *J Invertebr Pathol.* Sep; 139:82-91. 2016.

VALICENTE, Fernando Hercos. **Controle biológico de pragas com entomopatogênicos.** Sete Lagoas - Mg: Embrapa Milho e Sorgo, 30v, 2009.

VENDRAMIM, J.D. **O controle biológico e a resistência de plantas.** In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.M.S.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Ed). *Controle Biológico no Brasil: parasitoides e predadores.* São Paulo: Ed. Manole, P.511-528, 2002.

VITAL et al. **Efeito da azadiractina sobre artrópodes no cultivo do feijão-verde [*Vigna unguiculata* L. (Walp.)]**. Acta Iguazu, Cascavel, v.8, n.2, p. 69-80, 2019.

XAVIER, F. A. et al. **Manejo da vegetação sob linhas de transmissão de energia elétrica na Serra de Baturité**. Ciência Florestal, v. 17, n. 4, p.351-364, nov. 2007.

ZHANG, S; SHANG, Y.; MA, K. **The ecological effects of the ant-hemipteran mutualism: A meta-analysis**. Basic and Applied Ecology, Gesellschaft für Ökologie, Alemanha, 13, 116-124, 2012.