



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE GURUPI
MESTRADO EM PRODUÇÃO VEGETAL**

MARIELA OTONI DO NASCIMENTO

**INTERAÇÃO ENTRE FUNGOS DE SOLOS E A FORMIGA-CORTADEIRA
Atta sexdens (LINNAEUS, 1758)**

GURUPI – TO

2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE GURUPI
MESTRADO EM PRODUÇÃO VEGETAL**

MARIELA OTONI DO NASCIMENTO

**INTERAÇÃO ENTRE FUNGOS DE SOLOS E A FORMIGA-CORTADEIRA
Atta sexdens (LINNAEUS, 1758)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal do Tocantins, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Danival José de Souza

GURUPI – TO

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

D676i Do Nascimento, Mariela Otoni.

INTERAÇÃO ENTRE FUNGOS DE SOLOS E A FORMIGA-
CORTADEIRA *Atta sexdens* (LINNAEUS, 1758). / Mariela Otoni Do
Nascimento. – Gurupi, TO, 2015.

54 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins
– Câmpus Universitário de Gurupi - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em
Produção Vegetal, 2015.

Orientador: Danival José De Souza

1. Controle Biológico. 2. Trichoderma. 3. Leucoagaricus gongylophorus.
4. Fungo Antagonista. I. Título

CDD 635

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

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Universidade Federal do Tocantins

Campus de Gurupi

Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal

ATA nº 12/2015

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MARIELA OTONI DO NASCIMENTO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS

Aos 30 dias do mês de Julho do ano de 2015, às 08:30 horas, no(a) Sala 05 do Bloco C, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Orientador Dr. Danival José de Souza do *Campus* Universitário de Gurupi / Universidade Federal do Tocantins, Prof. Dr. Gil Rodrigues dos Santos do *Campus* Universitário de Gurupi / Universidade Federal do Tocantins, Prof. Dr. Renato de Almeida Sarmiento do *Campus* de Gurupi / Universidade Federal do Tocantins, Dr. Marçal Pedro Neto do *Campus* Universitário de Gurupi / Universidade Federal do Tocantins, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a argüição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de Mariela Otoni do Nascimento, intitulada "*INTERAÇÃO ENTRE FUNGOS DE SOLOS E A FORMIGA-CORTADEIRA *Atta sexdens* (LINNAEUS, 1758)*". Após a exposição, a discente foi argüida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo parecer FAVORÁVEL à aprovação, habilitando-a ao título de Mestre em Produção Vegetal.

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

Dr. Danival José de Souza
Universidade Federal do Tocantins
Orientador e presidente da banca examinadora

Dr. Gil Rodrigues dos Santos
Universidade Federal do Tocantins

Dr. Renato de Almeida Sarmiento
Universidade Federal do Tocantins

Dr. Marçal Pedro Neto
Universidade Federal do Tocantins

Gurupi, 30 de Julho de 2015.

Dr. Rodrigo Ribeiro Fidelis
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal

À **Deus**, autor e consumidor da vida.

Ao meu esposo **Hélio** e minha filha **Maria Clara**.

Aos meus pais **Luís Otoni** e **Maria Nasaré**.

DEDICO.

*“Sabemos que Deus age em todas as coisas para o bem daqueles que o amam,
dos que foram chamados de acordo com o seu propósito”.*

Romanos 8,28.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me guia e me guarda. Minha fortaleza e socorro bem presente. Cheguei até aqui graças a ele.

Ao meu esposo abençoado Hélio Gonçalves Reis, que por vezes teve que desmarcar compromissos para me auxiliar em coletas no campo ou mesmo ficar com a nossa filha, para que eu pudesse finalizar algumas atividades no laboratório. E também à minha linda filha Maria Clara “minha companheirinha” e esteve presente na execução de cada parte desta dissertação. Obrigada pela compreensão de vocês.

Ao meu pai Luís Otoni, que sempre incentivou suas filhas a estudarem e dizia “Que o estudo é algo que ninguém pode tirar de vocês”, obrigada pai. A minha mãe Maria Nasaré que está sempre presente e me auxiliando, graças a Deus!

Às minhas irmãs Mirela e Marcele e meu cunhado Elmadã. Meus sobrinhos Luís Henrique, Iara e Rodrigue, por compartilhar bons momentos.

Ao meu orientador Dr. Danival José de Souza, por quem tenho admiração e respeito e através de parceria e amizade compartilhou seus conhecimentos. Obrigada pela paciência nas correções dessa dissertação!

Ao professor Dr. Raimundo Wagner de Souza Aguiar, pela paciência e compreensão nesse período que me dediquei ao mestrado.

À Universidade Federal do Tocantins, que me permitiu flexibilizar a minha carga horária de trabalho com a pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal do Tocantins, pela oportunidade de desenvolvimento intelectual e profissional.

Ao professor Dr. Gil Rodrigues dos Santos que me auxiliou na identificação dos fungos, sem deixar de mencionar a técnica do laboratório de Fitopatologia Dalmácia Carlos Mourão, que é também companheira de mestrado.

Aos colegas de pesquisa do Laboratório de Controle Microbiano de insetos: Júnior Cesar, Rodrigo Domingos, Daniela Gonçalves, Aldemir Júnior e Cléia de Almeida. Agradeço também à Ms. Aline Silvestre Pereira e Ms. Aline da Silva Sachet.

A todos do Laboratório de Ecologia Funcional e aplicada, pelo suporte. Ao bolsista PNP Dr. Marçal Pedro Neto e a todos os alunos colaboradores do setor. Aos colegas do Casadinho – UFT, que muito colaboraram com os momentos de descontração, fornecendo palavras amigas e motivadoras. Em especial ao bolsista PNP Dr. José Iran Cardoso da Silva e a Dona Fátima da empresa Fênix.

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

As formigas-cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae), gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, são as pragas mais importantes da silvicultura, encontradas exclusivamente nas Américas. Sua importância econômica se deve ao seu hábito alimentar de cortar material vegetal fresco – sendo algumas importantes espécies cultivadas - que serve de substrato para o fungo simbiote mutualista *Leucoagaricus gongylophorus* (Basidiomycota: Agaricales) o qual é cultivado em câmaras subterrâneas. As fêmeas fecundadas são responsáveis pela fundação de uma nova colônia e sofrem influência direta de microrganismos presentes no solo, assim existem evidências que fêmeas de *Atta* spp. recém-fecundadas evitam solos férteis, com alta carga microbiana e mesmo as áreas de matas para fundação dos seus ninhos. Os fungos entomopatogênicos e fungos antagonistas de *L. gongylophorus*, presentes naturalmente no solo, podem ser usados no controle biológico de formigas-cortadeiras. Os objetivos deste trabalho foram avaliar em laboratório o desenvolvimento de colônias jovens de *Atta sexdens* em contato com solos de área de mata e de área desnuda, realizar a bioprospecção de isolados de fungos antagonistas de *L. gongylophorus* (*Trichoderma* spp.), em solos da região de Gurupi - TO, e testar o efeito antagônico desses fungos contra *L. gongylophorus*. Após 106 dias da revoada, as operárias de *A. sexdens* das 36 colônias, logo que iniciado o experimento, removeram o solo em todos os tratamentos, e esse comportamento favoreceu a sobrevivência das colônias, apresentando uma taxa de sobrevivência de 91,67% durante as 13 semanas. Verificou-se que, após as colônias terem passado pelo período crítico de fundação, o tipo de solo parece exercer pouca influência na sobrevivência das operárias e das colônias. O solo de área de mata apresenta maior quantidade e diversidade de fungos filamentosos que o solo de área desnuda; A utilização de *Tenebrio molitor* como isca-viva é eficiente para bioprospecção por fungos entomopatogênicos. Todos os isolados de *Trichoderma* foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* de *L. gongylophorus*; *Trichoderma spirale* isolado 2 apresentou crescimento micelial lento em placa de Petri e inibição contra *L. gongylophorus*, podendo este ser um isolado promissor em testes em campo.

Palavras-chave: Controle microbiano, Antagonismo e *Leucoagaricus gongylophorus*.

ABSTRACT

The leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae), *Atta* and *Acromyrmex* genera, are the most important forest pests. They are found exclusively in Americas. Its economic importance is due to behavior to cut fresh plant material that serves as a substrate for the mutualistic symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Basidiomycota: Agaricales) that are grown in underground chambers. Fertilized females are responsible for the founding of a new colony and they suffer direct influence of soil microorganisms. Therefore, newly fertilized females of *Atta* spp. should avoid fertile soils with high microbial load and even forested areas to found their nests. Entomopathogenic fungi and antagonists of *L. gongylophorus* are naturally present in the soil and they could be used in biological control of leaf-cutting ants. The objectives of this study were to evaluate and to compare the developing of young colonies of *Atta sexdens* in contact with soil from forested area and in contact with bare soils. Also, this and others procedures served to bioprospect antagonistic fungi of *L. gongylophorus* (*Trichoderma* spp.) from Gurupi region soil, and test the antagonistic effect of *Trichoderma* spp. against *L. gongylophorus*. In the first hours of start of experiments, *Atta* workers removed soil from colony recipients. This behavior could have favored colony survival, with a survival rate of 91,67 % during the 13 weeks. It was found that after the colonies have passed the critical period of foundation, the soil appears to exert little influence on the survival of workers and colonies. The soil from forested area had greater quantity and diversity of filamentous fungi than that from bare soil. The use of *Tenebrio molitor* as bait alive is efficient for bioprospecting by entomopathogenic fungi. All isolates of *Trichoderma* were able to inhibit *in vitro* growth of *L. gongylophorus*. *Trichoderma spirale* isolated 2 showed slow mycelial growth in Petri dish and strong level of inhibition against *L. gongylophorus in vitro*. So, this isolate is promising and should be tested in field.

Keywords: Microbial control, antagonism and *Leucoagaricus gongylophorus*.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| LISTA DE FIGURAS | 08 |
| LISTA DE TABELAS..... | 09 |
| REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 10 |
| CAPÍTULO I - A Influência do solo no desenvolvimento de colônias incipientes de <i>Atta sexdens</i> (Hymenoptera: Formicidae) | 14 |
| RESUMO | 14 |
| ABSTRACT | 15 |
| INTRODUÇÃO..... | 16 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 18 |
| RESULTADOS | 20 |
| DISCUSSÃO | 25 |
| CONCLUSÕES | 27 |
| CAPÍTULO I – Antagonismo de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. à <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> (Singer) Moller | 28 |
| RESUMO | 28 |
| ABSTRACT | 29 |
| INTRODUÇÃO..... | 30 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 33 |
| RESULTADOS | 36 |
| DISCUSSÃO | 43 |
| CONCLUSÕES | 46 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 47 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Fases da fundação do ninho de formigas-cortadeiras <i>Atta sexdens</i> (adaptado de DELLA LUCIA, 2011) | 12 |
| Figura 2 – Colônia de <i>Atta sexdens</i> desenvolvendo sobre o solo e arena destinada para forrageamento | 19 |
| Figura 3 – Peso médio do lixo de cada tratamento durante 13 semanas | 21 |
| Figura 4 – Produção média de lixo de cada tratamento, exceto semanas 1 e 2 | 21 |
| Figura 5 – Produção média de lixo de todos os tratamentos, exceto semana 1 e 2 | 22 |
| Figura 6 – Valores médios de formigas mortas em cada tratamento, durante 13 semanas | 23 |
| Figura 7 – crescimento médio (em mm) do jardim de fungo de <i>Atta sexdens</i> em quatro tratamentos durante 13 semanas, \pm o erro padrão. A = solo desnudo autoclavado; B = Solo de mata autoclavado; C = Solo desnudo e D = solo de mata | 23 |
| Figura 8 – Árvore evolutiva mostrando similaridade de <i>T. spirale</i> isolado 1 (Trd1) - 150518-33_A01_TCD1_ITS1; <i>T. spirale</i> isolado 2 (Trd2) - 150518-33_E01_TCD2_ITS1; <i>T. strigosellum</i> (Trd3) - 150518-33_I01_TCD3_ITS1; <i>Trichoderma asperellum</i> (Trd6) - 150518-33_M01_TCD6_ITS1 e dois grupos externos constando o número de acesso: FN859451 <i>Hypomyces samuelsii</i> ; HM534894.1 <i>Nectria cinnabarina</i> | 37 |
| Figura 9 – Fungo <i>L. gongylophorus</i> mostrando em detalhe os gongilídios nas extremidades das hifas. (aumentado 400x) | 39 |
| Figura 10 – Crescimento médio (em mm) de <i>L. gongylophorus</i> (L.g) na presença de sete isolados de <i>Trichoderma</i> spp. Trd1= <i>Trichoderma spirale</i> isolado 1; Trd2= <i>Trichoderma spirale</i> isolado 2; Trd3= <i>Trichoderma strigosellum</i> ; Trd4= <i>Trichoderma</i> spp1; Trd5= <i>Trichoderma</i> spp2; Trd6= <i>Trichoderma asperellum</i> ; Trd7= <i>Trichoderma harzianum</i> | 42 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Valor médio de UFC.g ⁻¹ de fungos filamentosos em diferentes solos | 36 |
| Tabela 2 – Equações de regressão e valores de R ² correspondente ao crescimento radial do fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> e sete isolados de <i>Trichoderma</i> spp. | 39 |
| Tabela 3 – Crescimento (em mm ± desvio padrão) e taxa de inibição de <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> , após oito dias na presença de diferentes isolados de <i>Trichoderma</i> spp. | 40 |
| Tabela 4 – Valores de <i>P</i> , na comparação 2 a 2 das médias do crescimento relativo de <i>L. gongylophorus</i> em crescimento pareado com sete isolados de <i>Trichoderma</i> sp. | 41 |

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As formigas-cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae), gêneros *Atta* Fabricius e *Acromyrmex* Mayr, conhecidas como saúvas e quenquéns, respectivamente, são encontradas exclusivamente nas Américas (MAYHÉ-NUVES & JAFFÉ, 1998; MEHDIABADI & SCHULTZ, 2009) e estão presentes em todos os ecossistemas brasileiros. Sua importância econômica é destacada pelo fato delas cortarem material vegetal fresco que serve de substrato para o fungo simbionte mutualista *Leucoagaricus gongylophorus* (Basidiomycota: Agaricales) (DELLA LUCIA & SOUZA, 2011). Elas são consideradas as pragas mais importantes da silvicultura, atacando de maneira constante em qualquer fase do desenvolvimento das plantas (ZANETTI et al., 2003c) e causando prejuízos a múltiplas culturas agrícolas e pastagens (DELLA LUCIA, 2003)

A desfolha por esses insetos ocasiona grandes perdas econômicas, sendo que os danos podem ser irreversíveis e até causar a morte da planta (ZANETTI et al., 2003a; ZANETTI et al., 2003b; ZANETTI et al., 2003c). Embora as formigas-cortadeiras sejam destacadas pelos prejuízos econômicos causados por meio de sua herbivoria, elas também traz benefício ecológico como na ciclagem de nutrientes dos ecossistemas (SOUSA-SOUTO et al., 2007), principalmente as espécies do gênero *Atta*. Devido à estrutura interna do formigueiro, que contém diversas câmaras subterrâneas interligadas por túneis e com presença de lixo, os solos de áreas com incidência de saúveiros possuem alterações positivas na sua estrutura física e química (FARJI-BRENER & GHERMANDI, 2008).

As formigas-cortadeiras apresentam o hábito de cultivar fungo e pertencem à tribo Attini, um clado que antes incluía apenas as formigas cultivadoras de fungo, mas que passou a incluir gêneros de formigas com outros hábitos alimentares, de acordo com uma revisão taxonômica recente (WARD et al., 2015). Os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* se diferenciam das demais cultivadoras de fungo por utilizarem, quase que exclusivamente, partes verdes de plantas para o cultivo do fungo mutualista. A associação fungo-inseto evoluiu até ao ponto em que as formigas e o fungo mutualista não podem viver isoladamente (BRANDÃO et al., 2011). Nessa associação, as formigas obtêm seus nutrientes por meio da degradação de polissacarídeos como pectinas, amido e celulose (MARTIN & WEBER, 1969; SILVA et al, 2006a) e, ao mesmo tempo, o

fungo encontra um ambiente favorável ao seu desenvolvimento, onde há recursos acessíveis e livres de competidores e patógenos, além de ser propagado pela própria formiga. *Leucoagaricus gongylophorus* é um fungo filamentoso e possui na porção terminal das suas hifas estruturas de reserva nutritivas, ricas em glicogênio, chamadas gongilídios, os quais são sugados pelas formigas (CHAPELA, 1994).

As formigas-cortadeiras, como todas as formigas, são insetos eussociais, pois apresentam cuidados com a prole, sobreposição de gerações e divisão de trabalho (WILSON, 1971 *apud* DELLA LUCIA, 2011). As operárias do gênero *Atta* apresentam polimorfismo acentuado (indivíduos morfologicamente distintos), o que permite a realização de diversas tarefas dentro da colônia. Esse polimorfismo está diretamente relacionado à noção de casta, em que diferentes categorias de indivíduos executam tarefas distintas dentro da colônia, sendo que esses indivíduos podem ser identificados pela sua aparência física (SOUZA et al., 2011). Podemos encontrar nitidamente duas castas permanentes em *Atta* spp. e *Acromyrmex* spp.: a casta reprodutiva (a rainha) e a casta de operárias. De acordo com Wilson (1980), a casta de operárias de *A. sexdens* é diferenciada morfologicamente em quatro grupos: 1) jardineiras, com largura da cápsula cefálica 0,8 a 1,0 mm, são as operárias mínimas; 2) generalistas, tendo largura da cápsula cefálica em média de 1,4 mm; 3) forrageadoras, com largura da cápsula cefálica 2,0 a 2,2 mm e 4) soldados, com largura da cápsula cefálica em média de 3 mm.

Os ninhos das cortadeiras são encontrados geralmente sob o solo e são compostos por câmaras ou painéis interligadas por túneis (DELLA LUCIA, 1993). A fundação de uma nova colônia se inicia com a revoada, a qual ocorre a cada ano nos saueiros adultos (38 meses após a fundação em *Atta sexdens*), sendo liberadas formigas reprodutivas aladas (AUTUORI, 1950). As fêmeas aladas, antes de saírem do ninho, retiram um fragmento do fungo *L. gongylophorus* e o armazenam na cavidade infrabucal. Durante o voo ocorre o acasalamento, e a fêmea fecundada (futura rainha) desce ao solo, retira suas asas e busca um local adequado para instalação do ninho e o macho morre logo após a cópula (ARAÚJO et al., 2011). Em condições de laboratório, a rainha do gênero *Atta* pode viver até 20 anos (AUTUORI, 1941). As formigas possuem metamorfose completa passando pelos estágios de ovo, larva, pupa e adulto. As fases de fundação do ninho de *Atta sexdens* estão resumidas na Figura 1.

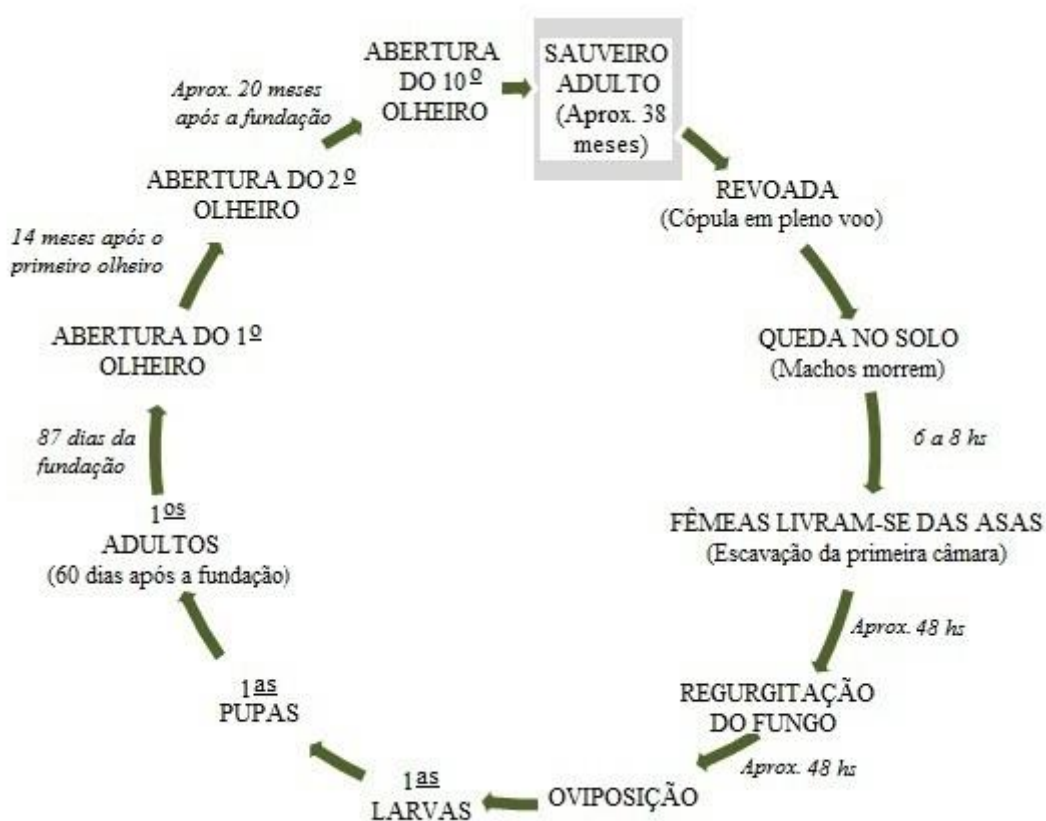


Figura 1 – Fases da fundação do ninho de formigas-cortadeiras *Atta sexdens* (adaptado de DELLA LUCIA, 2011).

Em espécies de *Atta* spp., a fêmea fecundada escava um túnel de 8,5 a 18 cm de profundidade com uma pequena câmara na porção terminal, onde será regurgitado o fungo e iniciada a postura dos ovos, e poderá ficar enclausurada por até 90 dias nesta câmara (AUTUORI, 1941; 1942). Inicialmente, a rainha cultivará o fungo através de lambadura e deposição de fluídos fecais e o surgimento dos adultos só ocorrerão 60 dias após a revoada (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990).

Há diversos entraves para o controle de formigas-cortadeiras, haja vista que várias estratégias são usadas por esses insetos a fim de neutralizar os microrganismos invasores, como a limpeza da colônia e da superfície corporal, o uso de secreções e também o evitamento de contato com o patógeno (OI & PEREIRA, 1993). O controle químico é a forma mais utilizada para o combate de cortadeiras, ocorrendo por meio de iscas granuladas contendo o princípio ativo tóxico (sulfluramida ou fipronil (i.a), dentre outros) adicionado à base de polpa cítrica (ZANUNCIO et al., 2002; ZANETTI et al.,

2003a, 2003b, 2003c). Mesmo representando um avanço na substituição do dodecloro que anteriormente era utilizado e o qual apresenta maior toxicidade, a sulfluramida não é livre de efeitos nocivos ao ambiente e à saúde humana. Devido aos efeitos negativos das iscas tóxicas, como eliminação de inimigos naturais e surgimento de resistências, é que têm surgido novas linhas de pesquisas alternativas para o controle de cortadeiras.

O controle de insetos por agentes biológicos é uma opção na busca de produtos mais específicos e de menor impacto ao meio ambiente. Os fungos entomopatogênicos e antagonistas do jardim de fungo, encontrados naturalmente no solo, já são estudados no controle de cortadeiras, pois apresentam a capacidade de infectar ninhos e são adaptados ao microclima dentro do formigueiro (LOPEZ & ORDUZ, 2003a). Estudos em laboratórios com fungos entomopatogênicos como *Metarhizium* spp. e *Beauveria* spp. e também fungos antagonistas de *L. gongylophorus* como *Trichoderma* spp. (ORTIZ & ORDUZ, 2001; LOPEZ & ORDUZ, 2003a; SILVA et al., 2006b; LOPEZ & ORDUZ, 2003b) demonstraram que eles são capazes de causar a morte da colônia, mas em experimentos de campo a ação dos microrganismos é menos expressiva.

Capítulo 1 – A influência do solo no desenvolvimento de colônias incipientes de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae)

RESUMO

Considerando que fêmeas de *Atta* spp. recém-fecundadas rejeitam solos férteis e com alta carga microbiana para fundação de seus ninhos, este trabalho teve por objetivo avaliar em laboratório o desenvolvendo de colônias jovens de *A. sexdens* em contato com solos de área de mata e de área desnuda, do *campus* universitário de Gurupi-TO. Foram coletadas fêmeas fecundadas após a revoada para o desenvolvimento das colônias em laboratório. Após 106 dias da revoada, as colônias (n= 9) foram distribuídas em quatro tratamentos: (1) solo desnudo; (2) solo desnudo autoclavado; (3) solo de mata e (4) solo de mata autoclavado. Foram quantificadas as unidades formadoras de colônias por grama de solo. Após 13 semanas de avaliação, quando as colônias passaram pelo período crítico da fundação, conclui-se que o tipo de solo exerce pouca influência na sobrevivência das operárias e da colônia. Provavelmente, a remoção do solo feita pelas formigas-cortadeiras favoreceu a sobrevivência das colônias em laboratório. A taxa de mortalidade das colônias foi de 33,9%, após seis meses da revoada. O solo de área de mata apresenta maior quantidade e diversidade de fungos filamentosos que o solo de área desnuda.

PALAVRAS-CHAVE: Formigas-cortadeiras; sobrevivência de colônias e fungos filamentosos.

ABSTRACT

Considering that newly mated females of *Atta* spp. reject fertile soils - with high microbial load - to found their nests, this study aimed to evaluate the developing of incipient colonies of *Atta sexdens* in contact with two soil types in laboratory: (1) soil from forested area and (2) bare soil. Mated females were collected after they had lost their wings and started colony founding. They were kept in plastic container during 106 days. Thereafter, when the colonies had some workers and brood, they were transferred to other containers of each of the following treatments (n= 9): (1) with bare soil; (2) with autoclaved bare soil; (3) with soil from forested area and (4) with autoclaved soil from forested area. Colony forming units per gram of soil (CFU/g of soil) were quantified to determine the total fungal load in these soils. Thirteen weeks after starting the trial period, when the colonies passed through the critical period of foundation, the soil appears to exert little influence on the survival of workers and the colony; probably, soil removal by workers favored the survival of colonies mortality rate of the colonies was 33.9 % after six months of nuptial flight. Finally, it was confirmed that soil from forested area has greater quantity and diversity of filamentous fungi than bare soil.

KEYWORDS: Leaf-cutting ants; Survival colonies and filamentous fungi.

INTRODUÇÃO

As saúvas, formigas-cortadeiras do gênero *Atta* (Hymenoptera: Formicidae), são pragas importantes das Américas, pois elas cortam e transportam para seu ninho grande volume de material vegetal fresco, incluindo as plantas cultivadas (DELLA LUCIA, 2011). Essas formigas cultivam em câmaras subterrâneas o fungo simbiote mutualista *Leucoagaricus gongylophorus* misturado ao material vegetal, que é chamado jardim de fungo ou esponja fúngica. O fungo simbiote é responsável pela degradação dos polissacarídeos - como pectina, amido e celulose - presentes no material vegetal (SILVA et al., 2006a) – e os transformam em glicogênio que é armazenado em estruturas de reservas chamadas gongilídeos. Esses últimos, por sua vez, são sugados pelas formigas (CHAPELA, 1994).

A fundação de uma nova colônia nos insetos sociais é de responsabilidade de pelo menos uma fêmea fecundada e a nova colônia se inicia com a revoada, que ocorre a cada ano nos saúveiros adultos (38 meses após a fundação em *Atta sexdens*), momento em que são liberadas formigas reprodutivas aladas (AUTUORI, 1950). Antes de saírem do ninho, as fêmeas aladas guardam um fragmento do fungo simbiote em sua cavidade infrabucal. O acasalamento ocorre durante o voo, e a fêmea fecundada (futura rainha) desce ao solo na busca de um local adequado para escavação, retira suas asas e o macho morre logo após (ARAÚJO et al., 2011).

Em formigas-cortadeiras do gênero *Atta*, com poucas exceções, apenas uma fêmea será responsável pelo sucesso da fundação do ninho e o sucesso nessa fase dependerá da influência direta de fatores ambientais, como as condições climáticas da área escolhida para escavação (FERNANDEZ-MARIN et al., 2004). Observações feitas em campo por Autuori (1950) mostraram uma taxa de sobrevivência de rainhas de *Atta* spp. em torno de 2,5% após 100 dias da revoada e 0,05% após 15 meses. A elevada mortalidade pode ser explicada pelas condições adversas do ambiente, pelo ataque de predadores (MARICONI, 1970) e pela ação de microrganismos patogênicos que estão presentes naturalmente no solo (BENTO et al., 1991).

O local de fundação dos ninhos é variável dentre as espécies do gênero *Atta*. Vasconcelos et al. (2006) observaram que fêmeas de *Atta laevigata* preferem áreas

limpas à beira de estradas do que áreas da vegetação adjacente. *Atta sexdens* constroem ninhos em áreas limpas, mas preservadas da insolação direta (MARICONI, 1970; PRETTO, 1996). Araújo et al. (2003) observaram que *Atta bisphaerica* optaram escavar seus ninhos em áreas que sofreram queimadas em plantio de cana de açúcar, possivelmente porque a superfície desses solos estejam expostas. Essas características do local escolhido para nidificação se somam a fatores físicos e biológicos do local.

Tem sido observado que fêmeas de *Atta* sp. tendem a procurar solos pobres em nutrientes e com baixa carga microbiana para fundação de ninhos. Em razão disso, ocorre maior taxa de viabilidade das suas colônias (BENTO et al., 1991; VAN GILS, 2011), provavelmente, em parte, ao menor ataque por fungos entomopatogênicos e antagonistas do seu fungo mutualista. Em outro gênero de formigas-cortadeiras também foi verificado comportamento semelhante. Em laboratório, fêmeas recém-fecundadas de *Acromyrmex striatus* rejeitaram o solo fértil para a fundação de seu ninho, preferindo solos argilosos e arenosos (DIEHL-FLEIG & ROCHA, 1998).

Considerando que as fêmeas de *Atta* sp. recém fecundadas evitam solos férteis, com alta carga microbiana e mesmo as áreas de matas, preferindo áreas livres de vegetação para fundação dos seus ninhos, este trabalho teve por objetivo avaliar em laboratório o desenvolvimento de colônias jovens de *Atta sexdens* em contato com solos de área de mata e de área desnuda.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenvolvimento inicial de colônias em laboratório

Foram coletadas 56 fêmeas recém-fecundadas da espécie *Atta sexdens* durante a revoada que ocorreu em sete de novembro de 2013, no *Campus* Universitário de Gurupi, Gurupi - TO. Cada espécime foi individualizado em pote plástico de 200 mL com uma camada de gesso de 1 cm no fundo (com função de conservar a umidade do recipiente) e a tampa perfurada para permitir a ventilação. Os potes foram mantidos em escotofase total e em temperatura de 25 ± 2 °C. Após a emergência das primeiras operárias, o fotoperíodo foi alterado para 12:12 (Luz: Escuro) e foram fornecidas folhas de *Mangifera indica*, *Citrus* sp. e *Tecoma stans*.

Desenvolvimento da colônia em diferentes solos

Amostras de solo de área de mata oriundo de fragmento de Cerrado *stricto sensu*, com densa camada de serrapilheira e solo de área desnuda, com ausência de vegetação e alta incidência de irradiação solar, ambos no *Campus* Universitário de Gurupi, foram coletadas no mês de fevereiro de 2014. Realizou-se uma amostragem composta em cada área na profundidade de 0 a 20 cm. Uma alíquota de cada solo foi mantida sob refrigeração para isolamento de fungos filamentosos. O experimento foi conduzido no Laboratório de Controle Microbiano de Insetos, sendo constituído de quatro tratamentos: (1) solo desnudo; (2) solo desnudo autoclavado; (3) solo de mata e (4) solo de mata autoclavado. Para cada tratamento houve nove repetições. Decorridos 106 dias da revoada, as colônias foram transferidas para potes plásticos de 250 mL conectados com mangueira de 1,9 mm a outro pote plástico de 200 mL sendo este destinado á arena de forrageamento e depósito do lixo produzido pela colônia (Figura 2). A escolha das colônias para cada tratamento ($n = 9$) foi feita de forma aleatória. A umidade da colônia era mantida através de um algodão molhado na tampa do pote com o fungo e foram mantidas na temperatura de 25 ± 2 °C. Semanalmente, durante 13 semanas, foi pesada a produção de lixo e contadas as operárias mortas. O desenvolvimento do fungo simbionte foi avaliado mediante a pesagem do pote plástico contendo o jardim de fungo no início e no final do experimento. Foram realizadas testes de comparações de médias da produção de lixo, operárias mortas e volume do jardim de

fungo para cada tratamento durante 13 semanas, no programa Statistica 7. Em todos os testes estatísticos, considerou-se um nível de significância de 5%.

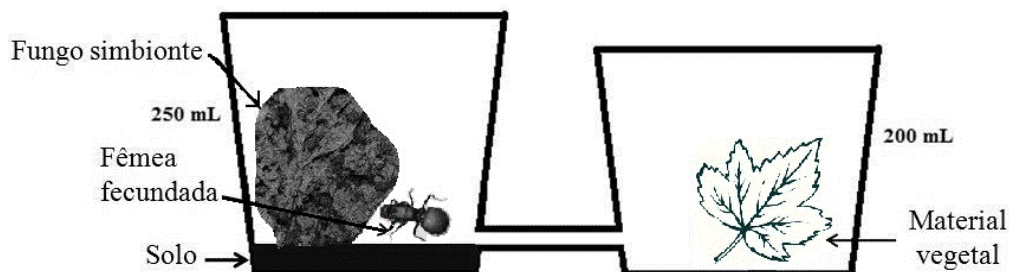


Figura 2 – Colônia de *Atta sexdens* desenvolvendo sobre o solo e arena destinada para forrageamento.

Isolamento de fungos filamentosos de solos

O isolamento dos fungos filamentosos foi realizado através do método de diluição decimal seriada, sendo que uma alíquota de 1 g de solo foi diluída em 9 mL de solução salina 0,9% (p/v) estéril, mantida em agitador vórtex por 15 min. Em placas de Petri contendo meio batata dextrose ágar (BDA, HIMEDIA) + Cloranfenicol (150 mg/L), espalhou-se 0,1 mL da suspensão de solo e as placas foram mantidas em escotofase total com temperatura de 25° C por sete dias. Após esse período, quantificaram-se as unidades formadoras de colônias (UFC.g⁻¹) por grama de solo, e os fungos foram identificados em nível de gênero através de observações do crescimento micelial em microscópio óptico, com o auxílio do setor de Fitopatologia do *Campus* Universitário de Gurupi – UFT.

RESULTADOS

Desenvolvimento da colônia em diferentes tipos de solos

Das fêmeas de *Atta sexdens* coletadas e mantidas em desenvolvimento no laboratório, 28,57% morreram até os 106 dias iniciais da colônia. Durante as 13 semanas do experimento apenas em três colônias houve a morte da rainha, sendo uma no tratamento de solo desnudo, uma no solo desnudo autoclavado e uma no solo de mata autoclavado. Desde o dia da coleta das rainhas até o fim do experimento, já havia passado mais de seis meses e ocorreu uma taxa de mortalidade de 33,9%.

Na primeira semana do experimento, não foi verificado forrageamento pelas operárias, sendo que estas se ocuparam da remoção do solo do pote com o jardim de fungo, apresentando então um alto valor médio no peso do lixo entre os quatros tratamentos (19,20 g). A comparação das médias do peso dos rejeitos da colônia apresentou variação ao longo do tempo do experimento (Figura 3), mas não apresentou variação entre os tratamentos se forem desconsideradas as duas semanas iniciais, pois, a partir da terceira semana do experimento, as operárias já apresentaram o comportamento de forrageamento e remoção de lixo do pote de jardim de fungo, apresentando o valor médio dos quatros tratamentos na semana três de 641,52 mg. Realizada avaliação desconsiderando os valores da primeira e segunda semana, verifica-se então que a retirada de rejeitos da colônia não variou ao longo do tempo ($P = 0,362$) (Figura 4).

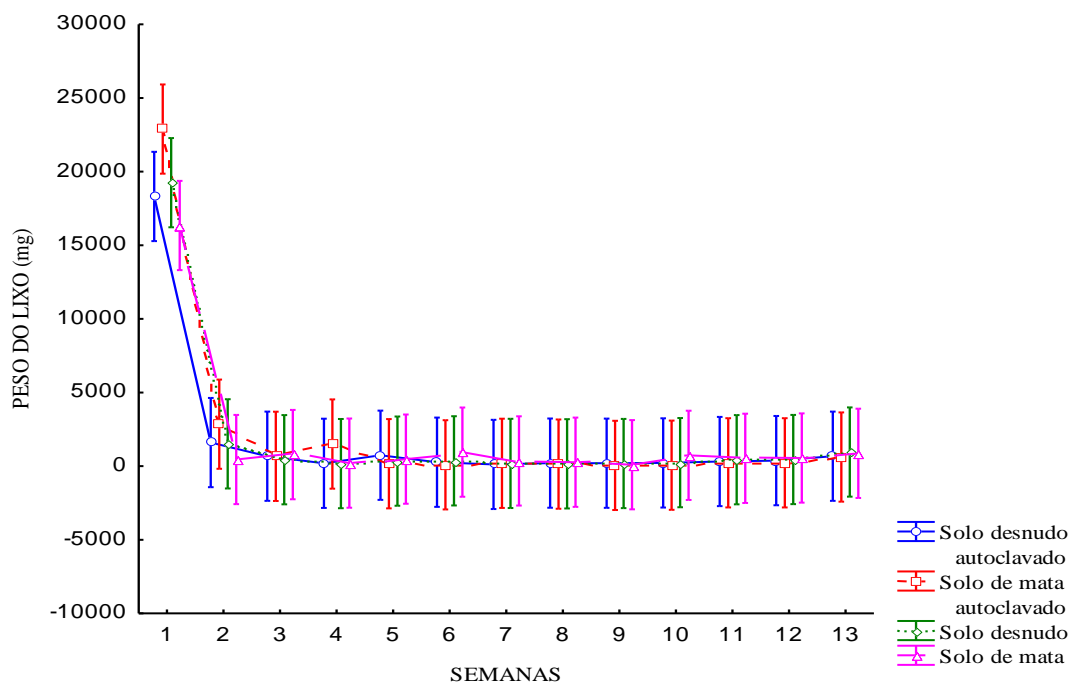


Figura 3 – Peso médio do lixo de cada tratamento durante 13 semanas.

Barras verticais representam intervalo de confiança de 0,95

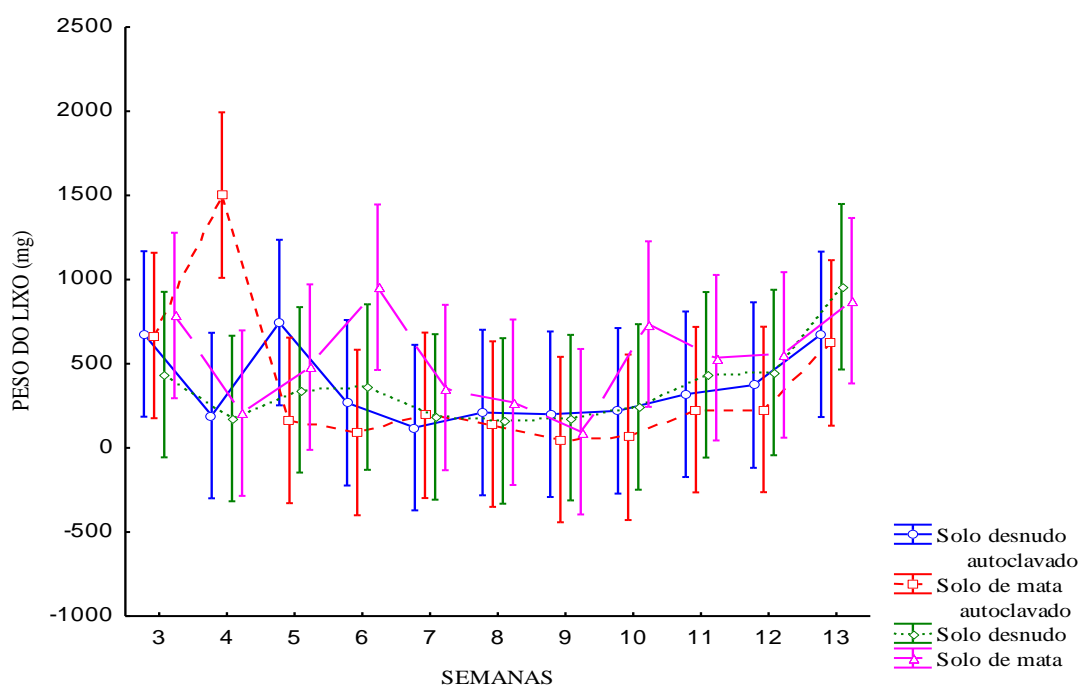


Figura 4 – Produção média de lixo de cada tratamento, exceto semanas 1 e 2.

Barras verticais representam intervalo de confiança de 0,95

Quando se comparou a produção de lixo somando-se os quatros tratamentos, verifica-se uma tendência de decréscimo de produção média do lixo até a nona semana

131,24 mg e posteriormente é aumentado gradativamente até a décima terceira semana 782,37 mg e através de análise de comparação de médias, verificou-se que houve diferença significativa durante as 11 semanas finais do experimento $P < 0,001$ (Figura 5).

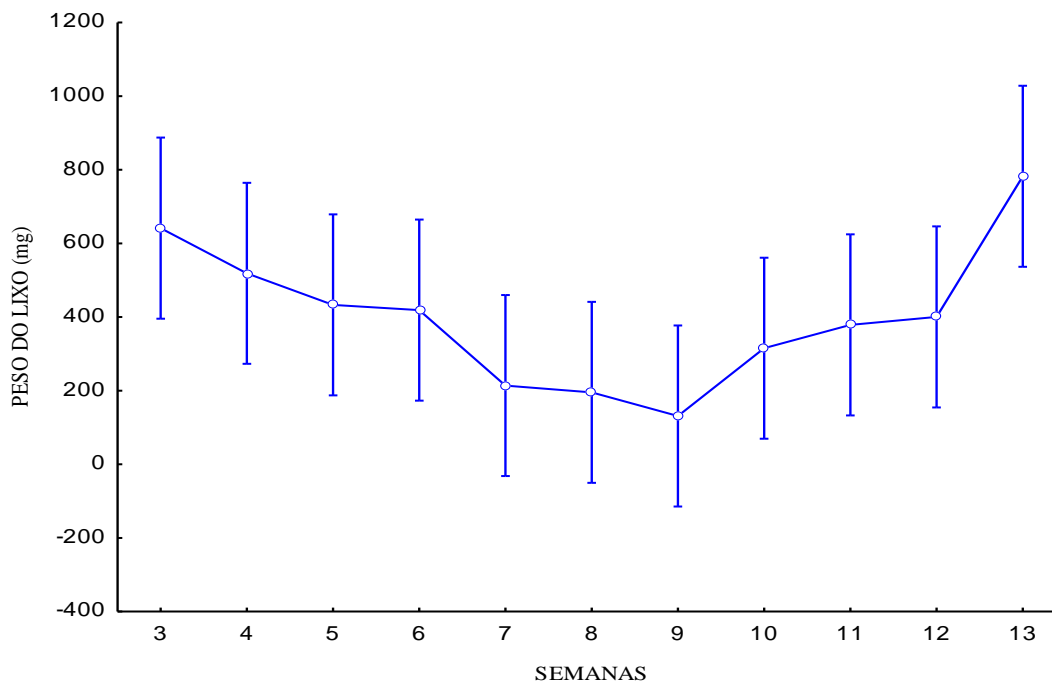


Figura 5 – Produção média de lixo de todos os tratamentos, exceto semana 1 e 2. Barras verticais representam intervalo de confiança de 0,95

A média dos valores de formigas mortas durante as 13 semanas do experimento, apresentou diferença significativa $P < 0,001$ (Figura 6), visto que na segunda semana houve um valor médio de 20,1 formigas mortas no tratamento de solo desnudo, sendo bem mais alto que os demais tratamentos.

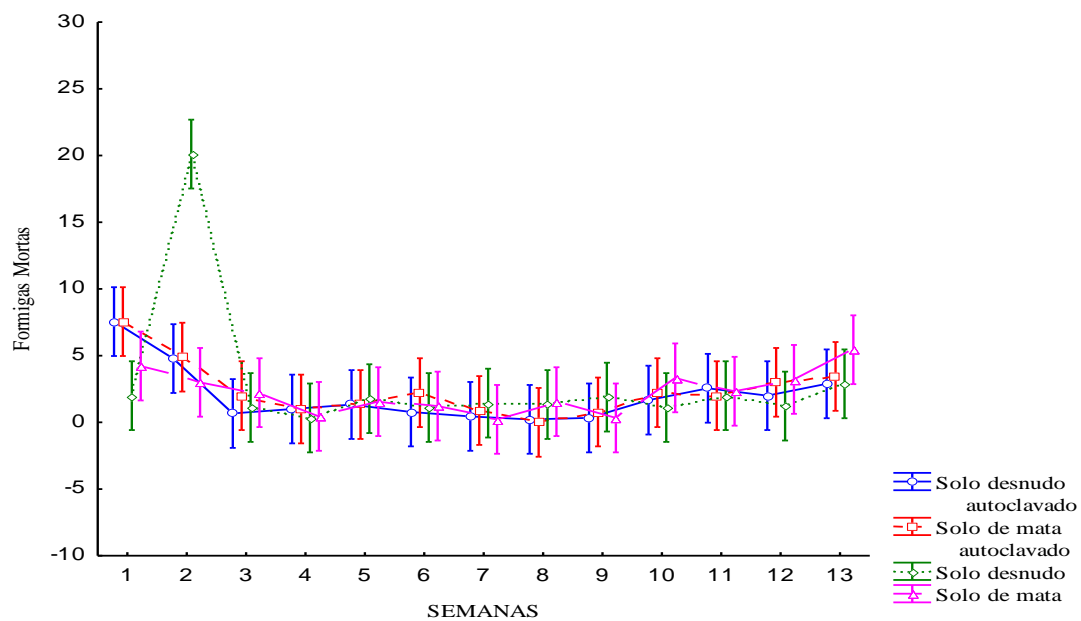


Figura 6 – Valores médios de formigas mortas em cada tratamento, durante 13 semanas. Barras verticais representam intervalo de confiança de 0,95.

O desenvolvimento do jardim de fungo foi avaliado através da pesagem no início e no final do experimento, e nos indicou que não foi encontrada diferença estatística significativa no peso médio do jardim de fungo entre os quatro tratamentos através do ANOVA não-paramétrica ($\chi^2 = 2,47$ GL = 3 $P = 0,48$) (Figura 7).

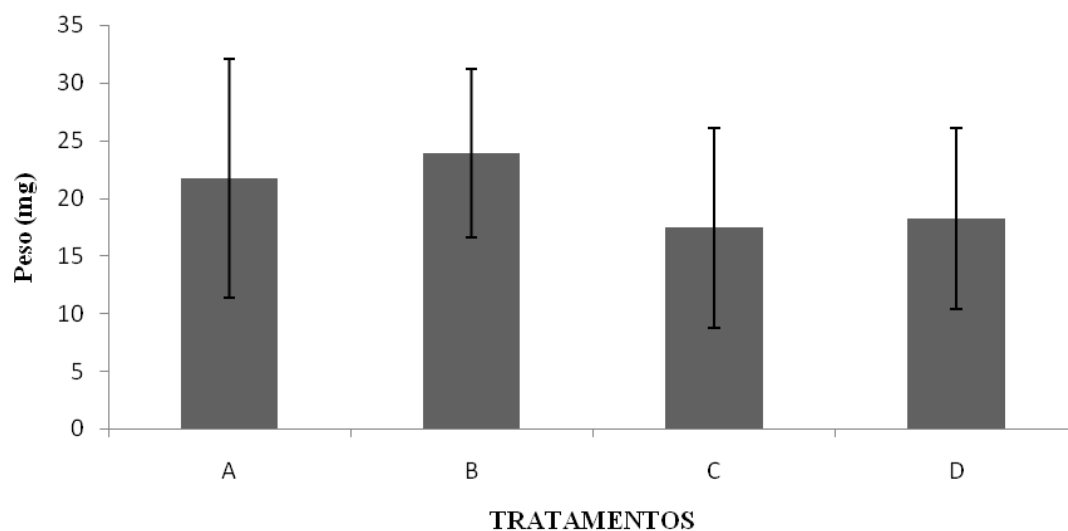


Figura 7 – crescimento médio (em mg) do jardim de fungo de *Atta sexdens* em quatro tratamentos durante 13 semanas, \pm desvio padrão. A = solo desnudo autoclavado; B = Solo de mata autoclavado; C = Solo desnudo e D = solo de mata.

Isolamento de fungos filamentosos de solos

Nos solos analisados foram realizados 18 isolamentos de fungos filamentosos, pertencentes a quatro gêneros distintos, sendo: 11 *Penicillium* spp., dois *Aspergillus* spp., dois *Fusarium* spp., um *Verticillium* sp. e dois fungos não identificados. No solo de área desnuda houve um menor número de UFC.g⁻¹ médio por grama de solo, apresentando $0,35 \times 10^3$ e o solo de mata $0,75 \times 10^3$. No solo de mata foram feitos 14 isolamentos, sendo encontrados os mesmos quatro gêneros descritos anteriormente e no solo desnudo encontraram-se apenas os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*.

DISCUSSÃO

Segundo Alves (1998), os solos são considerados um reservatório natural de microrganismos. As formigas-cortadeiras estão constantemente em contato com o solo e a densidade populacional dos microrganismos presentes no solo varia com a procedência do mesmo. As bactérias e fungos presentes nos solos exercem um papel importante no desenvolvimento das colônias de formigas-cortadeiras podendo até limitar sua sobrevivência (BENTO et al., 1991).

Passados aproximadamente sete meses da revoada, com o fim do experimento no laboratório, observou-se uma taxa de sobrevivência de colônias de *A. sexdens* de 66,1%, sendo bastante elevado este número quando comparada com Autuori (1950) que observou em campo uma taxa de sobrevivência de rainhas de *Atta* sp. de 2,5% com 100 dias da revoada. Essa alta taxa de sobrevivência, provavelmente, se deve ao fato de que as colônias permaneceram pouco tempo em contato com o solo, sendo que as colônias tão logo foram colocadas no tratamento, fizeram a remoção do solo na primeira semana do experimento, mantendo então o pote livre de possíveis contaminantes.

O solo de mata apresentou a maior quantidade de UFC.g⁻¹ por grama de solo de fungos filamentosos, quando comparado com o solo desnudo. Este parâmetro pode estar associado à quantidade de serrapilheira presente na mata e conseqüentemente intensa atuação de microrganismos na decomposição desses materiais vegetais e em contrapartida no solo desnudo pela ausência de vegetação e alta incidência de irradiação solar.

A fim de verificar a influência do solo no desenvolvimento de colônias iniciais de *Atta leavigata*, Bento et al. (1991) testaram diferentes horizontes do solo (A, B e C) e verificam que houve maior sobrevivência das colônias que estavam em contato com solo mais pobre em nutrientes e com menor carga microbiana (horizonte C). Entretanto, em nosso experimento no laboratório não houve diferença significativa na mortalidade das colônias que permaneceram em contato com os diferentes solos, sendo que as colônias apresentaram sobrevivência superior a 91% em todos os tratamentos.

Na primeira semana do experimento foi notado que as operárias cessaram o forrageamento e ocuparam-se da remoção de terra, o que contribuiu para o maior valor

médio no peso do lixo. Esse grande volume de solo retirado fez com que a média do peso dos rejeitos da colônia variasse significativamente ao longo das semanas $P=0,0002$ (Figura 3) em razão desse maior valor na primeira semana. Na terceira semana, os potes possuíam pouca ou nenhuma quantidade de solo e foi realizada então uma segunda avaliação estatística das médias do peso do lixo excluindo os dados da primeira e segunda semana. Assim, verificou-se que não houve diferença significativa entre as médias do peso de lixo durante as 11 semanas seguintes do experimento (Figura 4). Uma vez que não houve diferença entre os tratamentos, eles foram agrupados com a finalidade de verificar o comportamento de produção de lixo durante as 11 semanas finais e, nessa situação verificou-se que não houve diferença estatística (Figura 5), ou seja, a produção de lixo foi pequena, constante e invariável ao longo das semanas.

Os números médios de formigas mortas foram bem próximos nos quatro tratamentos no decorrer do experimento. Apenas na segunda semana do experimento, o tratamento de solo desnudo, apresentou um valor muito distinto, não havendo relação definida com os tratamentos estabelecidos (Figura 6). O crescimento médio do jardim de fungo durante as 13 semanas do experimento não apresentou diferenças estatísticas entre os quatro tratamentos, tendo então um padrão de crescimento semelhante nos quatro tratamentos.

CONCLUSÕES

A remoção de todo o solo presente no pote promoveu um ambiente livre de patógenos e parece ter favorecido a sobrevivência das colônias nesse período do experimento. Podemos concluir que:

- 1- A taxa de mortalidade das colônias foi de 33,9%, após seis meses da revoada;
- 2- O solo de área de mata apresenta maior quantidade e diversidade de fungos filamentosos que o solo de área desnuda;
- 3- Após as colônias terem passado pelo período crítico de fundação, o tipo de solo parece exercer pouca influência na sobrevivência das operárias e das colônias.

Capítulo 2 – Antagonismo de isolados de *Trichoderma* spp. à *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Moller

RESUMO

Trichoderma é um gênero de fungo filamentosos, micoparasita facultativo, encontrado naturalmente em solos. São considerados antagonistas de outros fungos e podem inibir o crescimento do fungo mutualista *Leucoagaricus gongylophorus* das formigas-cortadeiras. Este trabalho teve por objetivo realizar a bioprospecção de isolados de *Trichoderma* spp., em diferentes solos na região de Gurupi - TO, e testar o efeito antagonista sobre o fungo mutualista de *A. sexdens*. Para isolamento de fungos filamentosos, foram coletados amostras de seis localidades no *campus* universitário de Gurupi e os isolados de *Trichoderma* sp. encontrados foram enviados para a Macrogen - Coreia do Sul, a fim de ser seqüenciado a região ITS do rDNA, e posterior identificação da espécie. Foi isolado *L. gongylophorus* de colônia de *A. sexdens* mantida em laboratório. Verificou-se o efeito antagonista de sete isolados de *Trichoderma* sp. contra *L. gongylophorus* através de discos pareados em placas de Petri com meio BDA. Conclui-se que todos os isolados de *Trichoderma* utilizados neste trabalho foram capazes de inibir o crescimento de *L. gongylophorus* em placa de Petri; O isolado de *Trichoderma spirale* isolado 2 apresentou um crescimento micelial lento em placa de Petri e elevada taxa de inibição contra *L. gongylophorus*, podendo este ser um favorito em testes em campo.

PALAVRAS-CHAVE: Formigas-cortadeiras; fungo antagonista e controle microbiano.

ABSTRACT

Filamentous fungi in the genus *Trichoderma* are commonly found in the soil. They are considered optional mycoparasite and antagonists of other fungi. It has been verified that they can inhibit the growth of the fungal cultivar of leaf-cutting ants (*Leucoagaricus gongylophorus*). The aim of the present study was to bioprospect *Trichoderma* spp. in different soils collected in Gurupi, Tocantins state, and to test their antagonistic effects against the mutualistic fungus of the leaf-cutting ants. To isolate filamentous fungi, samples were collected from six locations. Based on morphological characters, all *Trichoderma* spp. had their ITS region of the rDNA sequenced to confirm species level. Also, it was isolated *L. gongylophorus* from *Atta sexdens* colonies kept in laboratory. Antagonistic properties of seven isolates of *Trichoderma* against *L. gongylophorus* were measured by paired disks in Petri dishes with PDA medium. All *Trichoderma* isolates inhibited the growth of *L. gongylophorus* in Petri dishes. *Trichoderma spirale* isolated 2 showed a slow mycelial growth in Petri dish and high rate of inhibition against *L. gongylophorus*, which may be a promising fungus in field tests objecting the development of biological control methods of leaf-cutting ants.

KEYWORDS: Leaf-cutting ants; antagonistic fungi; microbial control.

INTRODUÇÃO

As formigas-cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae) cultivam o fungo simbiote mutualista *Leucoagaricus gongylophorus* (Basidiomycota: Agaricales) do qual se alimentam, sendo que a sobrevivência de ambos depende dessa relação que se iniciou há ~ 50 milhões de anos (MEHDIABADI & SCHULTZ, 2009). As formigas-cortadeiras são pragas de grande importância na região neotropical, pois consomem grande volume de material vegetal fresco e isto inclui as florestas plantadas e diversas espécies cultivadas (DELLA LUCIA, 2011). O fungo simbiote mutualista é cultivado por elas em câmaras subterrâneas misturado com o material vegetal, tendo o aspecto esponjoso, chamado de jardim de fungo ou esponja fúngica.

O fungo *L. gongylophorus* funciona como um estômago externo para as formigas-cortadeiras, sendo que este realiza a degradação de polissacarídeos de origem vegetal como pectinas, amido e celulose (SILVA et al., 2006a). Em troca, as formigas provêm proteção contra patógenos e fazem a dispersão do mesmo. Os fragmentos vegetais levados para o ninho são primeiramente raspados pelas operárias, para remoção de ceras e microrganismos. Posteriormente, são inoculadas hifas do fungo mutualista (MOREIRA et al., 2011) misturados com o líquido fecal, o qual é rico em enzimas digestivas provenientes do próprio fungo (MARTIN et al., 1975).

Diferente de outros insetos da família Hymenoptera, as formigas possuem um par de glândulas metapleurais que produzem compostos com propriedades antibióticas, o que diminui a incidência de patógenos (BOT et al., 2001). As cortadeiras utilizam também secreções salivares na acidificação do jardim de fungo, o que limita o estabelecimento de patógenos (PAPA & PAPA, 1982 *apud* PAGNOCCA et al., 2011) e minimiza a ação de compostos tóxicos de origem vegetal. Apesar das diversas estratégias de defesas das cortadeiras, os fungos *Escovopsis* spp. se tornaram parasitas especializados do jardim de fungo, sendo altamente virulentos, e capazes de diminuir a taxa de crescimento do fungo simbiote, reduzir a quantidade de operárias, larvas e pupas, e até mesmo levar a morte da colônia (PAGNOCCA et al., 2011).

Diversas técnicas de controle de cortadeiras são empregadas, sendo que o uso de iscas químicas contendo Sulfluramida (i.a) ou Fipronil (i.a), adicionada à base de polpa

de citros é a mais utilizada (ZANUNCIO et al., 2002; ZANETTI et al., 2003a). Entretanto, existem efeitos nocivos das iscas tóxicas ao homem e meio ambiente, como contaminação de corpos d'água, eliminação de inimigos naturais e surgimento de resistências. Neste contexto é que têm surgido novas linhas de pesquisas visando o controle alternativo de cortadeiras.

O controle biológico de insetos pragas através da utilização de fungos ocorre no Brasil desde 1964 sendo utilizados diversos gêneros como *Metarhizium*, *Beauveria*, *Paecilomyces* e *Aspergillus* (ALVES, 1998). Em testes preliminares para controle de formigas-cortadeiras, o uso de fungos tem se destacado por ser uma alternativa na substituição do uso de iscas químicas e os experimentos têm se intensificado. Um dos objetivos é repetir em campo com a mesma eficiência os resultados encontrados em condições de laboratório. Os principais fungos entomopatogênicos testados são *Metarhizium anisoplae*, *Beauveria bassiana* e *Lecanicilium lecanii* (LOPEZ & ORDUZ, 2003a; FOLGARAIT et al., 2011), e fungos antagonistas e parasitas de *L. gongylophorus*: *Trichoderma* spp. (ORTIZ & ORDUZ, 2001; LOPEZ & ORDUZ, 2003a; SILVA et al., 2006b; LOPEZ & ORDUZ, 2003b) e *Escovopsis* spp. (SILVA et al., 2006b; FOLGARAIT et al., 2011), respectivamente.

As formigas podem detectar a presença de microrganismos entomopatogênicos dentro da colônia. Observações realizadas por Machado et al. (1988) em diferentes colônias de *Acromyrmex* que tiveram contato com esporos de *M. anisoplae* e *B. bassiana*, constataram que houve o abandono de olheiros e abertura de novos, remoção de formigas mortas para fora da colônia e diminuição do forrageamento. Semelhantemente, em colônias de *Solenopsis invicta*, as operárias removem materiais e outras operárias contaminadas e ou mortas para fora do ninho, após o contato com esporos de *B. bassiana* (OI & PEREIRA, 1993).

Trichoderma (Ascomycota: Hypocreaceae) é um gênero de fungos filamentosos micoparasitas facultativos, sendo comumente encontrados em solos ricos em matéria orgânica de diferentes regiões do mundo (SAMUELS, 2006). Fungos desse gênero são capazes de induzir à resistência da planta contra fitopatógenos na região rizosférica (HERMOSA et al., 2012) e são eficientes no controle de *Rhizoctonia solani* (PANDEY et al., 2010), *Fusarium* spp. e *Alternaria alternata* (MISHRA et al., 2011; YANG,

2011) e inibir o crescimento de *L. gongylophorus*. No entanto, o sucesso no controle de fitopatógenos varia com a espécie de *Trichoderma* utilizada, o fungo alvo e as condições do meio em que estão se desenvolvendo.

Este trabalho teve por objetivo realizar a bioprospecção por isolados de *Trichoderma* sp. em solos com diferentes coberturas vegetais na região de Gurupi – TO, e testar o efeito antagônica sobre o fungo mutualista de *A. sexdens*.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de solos e isolamento de fungos filamentosos

Foram coletados amostras de solos em seis localidades no *Campus* Universitário de Gurupi – TO, sendo: (1) solo de mata, em fragmento de Cerrado *stricto sensu* com densa camada de serrapilheira; (2) solo de área desnuda, com ausência de vegetação e alta incidência de irradiação solar em duas profundidades e (3,4,5,6) solo da câmara de jardim de fungo de quatro ninhos de *Atta sexdens*. Os solos de área desnuda e de área de mata foram coletados em novembro de 2014 em amostragem composta na profundidade de 0-10 e 10-20 cm. Ninhos de *Atta sexdens* localizados em área de mata nativa (MN) denominados MN 01 e MN 02 foram escavados no dia 03 de Fevereiro de 2015 e os ninhos localizados em área de plantio de mangueiras (*Mangifera indica*) (PM) denominados PM 01 e PM 02 foram escavados no dia 04 de Fevereiro de 2015. Foram selecionados ninhos que apresentavam aspectos de poucos meses de fundação e a escolha foi feita através de observações da estrutura externa do ninho (diâmetro do olheiro, depósito de terra e tamanho de operárias forrageando). Conforme descrito por Rodrigues et al. (2013), retirou-se a terra em trincheira circular ao orifício até atingir a câmara de jardim de fungo. Em seguida, com uma espátula estéril, retirou-se amostra de solo na parede da câmara para posterior isolamento de fungos. Ambos os solos foram mantidos sob refrigeração para isolamento de fungos.

O isolamento de fungos foi realizado através do método de diluição decimal seriada. Uma alíquota de 1g de solo foi diluída em 9 mL de solução salina 0,9% (p/v) estéril, e mantida em agitador vórtex por 15 min e transferidos 0,1 mL para placa de Petri contendo meio batata dextrose Agar (BDA, HIMEDIA) + Cloranfenicol (150 mg/L) e as placas foram mantidas em escotofase total em temperatura de 25° C por sete dias. Foram quantificadas as unidades formadoras de colônias (UFC.g⁻¹) por grama de solo. Os fungos foram identificados em nível genérico através de observações do crescimento micelial em microscópio óptico, com o auxílio do setor de Fitopatologia do *Campus* Universitário de Gurupi – UFT. Cinco isolados fúngicos do gênero *Trichoderma* sp. encontrados nos solos estudados e um isolado fúngico do gênero *Trichoderma* sp. cedido pelo laboratório de Fitopatologia do *Campus* Gurupi foram enviados para sequenciamento das regiões ITS (Macrogen, Coreia do Sul), usando os

primers ITS 1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') e ITS 4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'), a fim de ajudar na identificação das espécies.

Prospecção de fungos entomopatogênicos usando *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) como iscas-vivas

Foram utilizadas larvas de *Tenebrio molitor* criadas no Laboratório de Controle Microbiano de insetos do *Campus* Universitário de Gurupi como iscas de fungos entomopatogênicos, com metodologia adaptada de MEYLING (2007). A utilização de *T. molitor* se deve à facilidade de sua criação em laboratório e ao fato de suas larvas serem suscetíveis a fungos entomopatogênicos do solo. As larvas foram colocadas em potes plásticos com solo de área de mata e solo de área desnuda e em cada tratamento na proporção de 10 larvas para cada 100g de solos. Os potes foram mantidos em escotofase total e, diariamente, durante 20 dias, os solos eram revirados, mantidos úmidos e quantificada a mortalidade das larvas. Para confirmar a mortalidade por fungos, os insetos mortos eram desinfetados com hipoclorito de sódio 1%, álcool 70%, lavados em água destilada esterilizada por três vezes e secos em papel toalha estéril e mantidos em câmara úmida por 10 dias para que ocorra a extrusão do fungo. Os fungos encontrados foram enviados para identificação da espécie pelo sequenciamento das regiões ITS (Macrogen, Coreia do Sul), usando os primers ITS 1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') e ITS 4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3').

Isolamento de *Leucoagaricus gongylophorus*

Foi isolado o fungo simbiote mutualista de formigas-cortadeiras *L. gongylophorus* de ninho de *Atta sexdens* mantido em laboratório, de onde foi retirada uma pequena porção do fungo com pinça estéril, principalmente da parte mais clara, e colocada em placa de Petri contendo meio batata dextrose ágar BDA (HIMEDIA) + Cloranfenicol (150 mg/L). Após sete dias foi realizada repicagem das hifas em placas de Petri com BDA. Foram mantidas na temperatura de 26° C em escotofase total. A confirmação do fungo se deu através de observação dos gongilídios na porção terminal das hifas, em microscópio ótico, após 21 dias da repicagem.

Curvas de crescimento de *Leucoagaricus gongylophorus* e *Trichoderma* spp.

As taxas de crescimento micelial de sete isolados de *Trichoderma* spp. (5 isolados provenientes dos solos estudados – Trd1 ao Trd5; 1 isolado encontrado em grãos, cedido pelo laboratório de fitopatologia – Trd6 e 1 *Trichoderma harzianum* (ESALQ 1306), solução comercial com conídios - TRICHODERMIL (Koppert Brasil) - Trd7 e de *L. gongylophorus* foram determinadas na temperatura de 26° C. Para isso, discos de 5 mm contendo micélio de cada fungo foram colocados no centro da placa de Petri com meio BDA. Os isolados do fungo antagonístico foram medidos diariamente com paquímetro analógico até que o crescimento radial do fungo completasse toda a placa e *L. gongylophorus* foi medido diariamente em estereomicroscópio (LEICA) por um período de 21 dias. Foram construídas curvas de regressão (diâmetro x tempo) e expressas as suas equações de regressão e o R^2 para cada isolado.

Efeito antagonístico de isolados de *Trichoderma* sp. em *Leucoagaricus gongylophorus*

Verificou-se o efeito antagonístico de sete isolados de *Trichoderma* spp. (Trd1 ao Trd7) contra *L. gongylophorus* através de crescimento de discos pareados. Houve seis repetições para cada tratamento (*L. gongylophorus* - *Trichoderma* spp.) e controle (*L. gongylophorus* - *L. gongylophorus*). Em placa de Petri contendo meio BDA, foi colocado um disco de cinco milímetros de diâmetro do micélio de *L. gongylophorus* e, a 3 cm de distância, um disco de igual tamanho de um dos sete isolados de *Trichoderma* spp. As placas foram incubadas por oito dias em escotofase total na temperatura de 26° C, sendo medido diariamente o crescimento do *L. gongylophorus* em estereomicroscópio modelo (LEICA). Para mensurar os efeitos do fungo antagonístico sobre o *L. gongylophorus*, primeiramente foi estimado a eficiência de crescimento micelial do *L. gongylophorus* dividindo-se o diâmetro médio final pelo diâmetro médio inicial $C_1 = DF/DI$. Em cada teste pareado com *Trichoderma* sp. foi calculado a eficiência de crescimento do *L. gongylophorus* (C). Posteriormente, o crescimento relativo (CR) na presença do antagonístico foi expresso por $CR = C/C_1$. A taxa de inibição do *L. gongylophorus* foi calculada com base no tratamento controle. As médias do crescimento relativo do *L. gongylophorus*, pareadas com *Trichoderma* spp., foram

comparadas pelo teste *t*. Os pares de médias obtidos, foram comparados 2 a 2 pelo teste de FISHER LSD. As análises estatísticas foram realizadas no programa Statistica 7 com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Isolamento e identificação de fungos filamentosos

Nos solos analisados foram encontrados 54 isolados de fungos filamentosos, sendo oito gêneros (19 *Penicillium* sp.; 13 *Mucor* sp.; oito *Aspergillus* sp.; cinco *Trichoderma* sp.; três *Cladosporium* sp.; um *Acremonium* sp.; um *Verticillium* sp.; um *Colletotrichum* sp.) e quatro não identificados (N.I.). Em solo desnudo, na profundidade de 0 – 10 cm, foi verificado o menor valor de UFC.g⁻¹ por grama de solo 0,63 x 10³, enquanto o solo de mata na profundidade de 0 – 10 cm apresentou o maior valor, 5,66 x 10³ (Tabela 1). Dentre os cinco isolados de *Trichoderma* sp. encontrados, dois provenientes do solo de mata na profundidade 0 – 10 cm, dois provenientes do solo de mata profundidade 10 – 20 cm e um da câmara do jardim de fungo do ninho MN 02. Através da comparação das seqüências da região ITS dos isolados de *Trichoderma* sp. com outras seqüências conhecidas usando a ferramenta BLAST encontraram-se espécies com elevada similaridade e a árvore evolutiva foi construída com seqüências similares e dois grupos externos (*Hypomyces samuelssi* e *Nectria cinnabarina*) (Figura 8). Esta análise evolutiva mostrou que as espécies agrupavam-se com as seguintes identificações: Trd1 com *T. spirale* isolado 1, apresentando 99% de similaridade; Trd2 com *T. spirale* isolado 2, apresentando 99% de similaridade; Trd3 com *T. strigosellum*, apresentando 100% de similaridade; Trd6 com *T. asperellum*, apresentando 100% de similaridade. Devido a problemas técnicos com as amostras, apontado pela Macrogen, não foi possível realizar o seqüenciamento dos isolados Trd4 e Trd5.

Tabela 1 - Valor médio de UFC.g⁻¹ de fungos filamentosos em diferentes solos.

| Solo desnudo | | Solo de mata | | Câmara de jardim de fungo | | | |
|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
| 0 -10 cm | 10 -20 cm | 0 -10 cm | 10 -20 cm | MN* 01 | MN 02 | PM** 01 | PM 02 |
| 0,63 x 10 ³ | 1,63 x 10 ³ | 5,66 x 10 ³ | 2,66 x 10 ³ | 4,33 x 10 ³ | 4,33 x 10 ³ | 3,0 x 10 ³ | 3,66 x 10 ³ |

*MN= área de mata nativa; **PM= área de plantio de mangueiras.

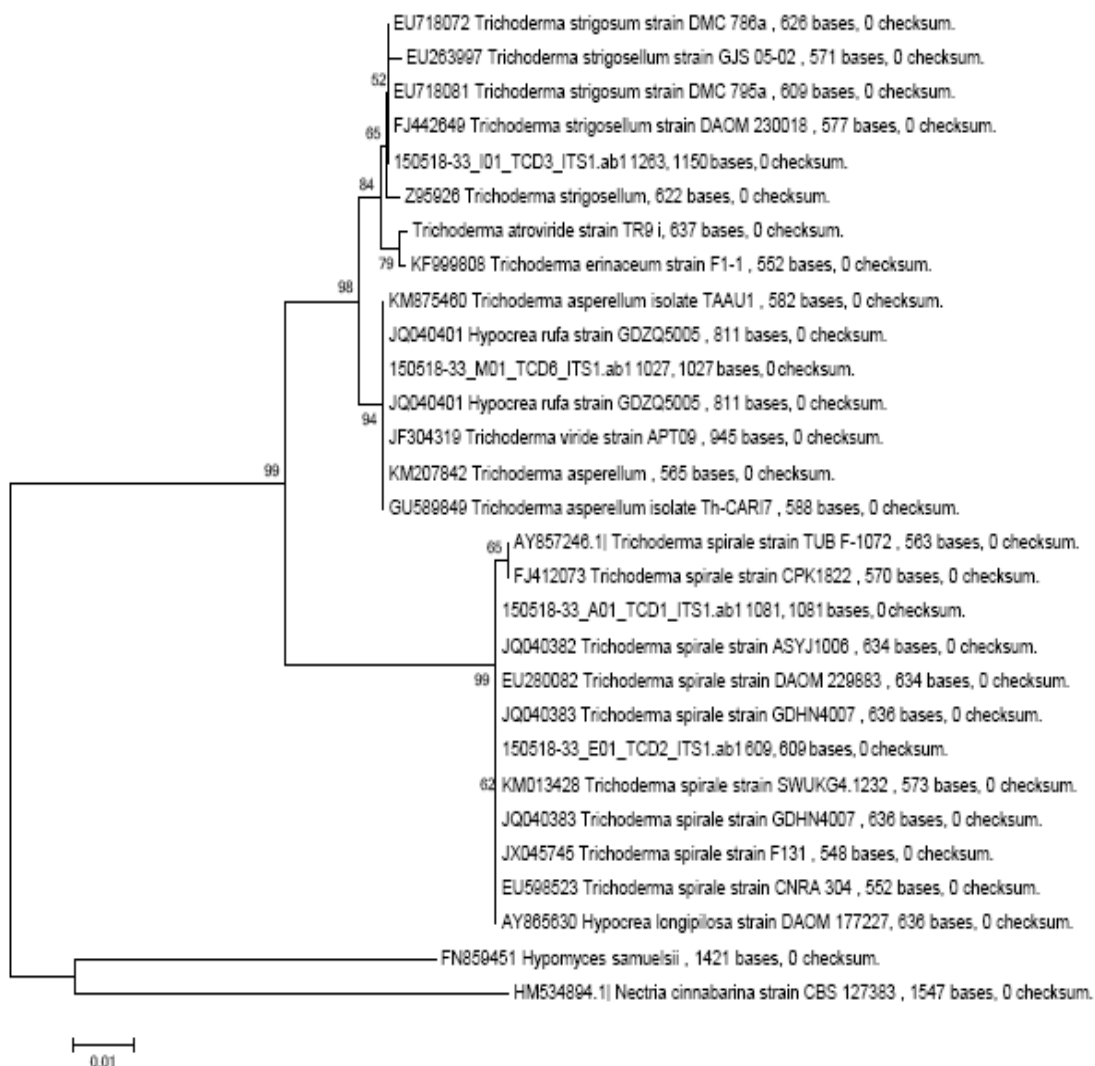


Figura 8 – Árvore evolutiva mostrando similaridade de *T. spirale* isolado 1 (Trd1) - 150518-33_A01_TCD1_ITS1; *T. spirale* isolado 2 (Trd2) - 150518-33_E01_TCD2_ITS1; *T. strigosellum* (Trd3) - 150518-33_I01_TCD3_ITS1; *Trichoderma asperellum* (Trd6) - 150518-33_M01_TCD6_ITS1 e dois grupos externos constando o número de acesso: FN859451 *Hypomyces samuelsii*; HM534894.1 *Nectria cinnabarina*.

A árvore evolutiva foi inferida usando o método de Neighbor-Joining (SAITOU & NEI, 1987). A árvore ótima está mostrada com o somatório do comprimento do ramo = 0,2541354. As porcentagens de árvores replicadas nas quais os táxons associados se agrupam no teste de bootstrap (1000 réplicas) são mostradas próximas aos ramos (FELSENSTEIN, 1985). A árvore está desenhada na escala, com o comprimento dos ramos na mesma unidade como as distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram computadas usando o método de Jukes-

Cantor (JUKES & CANTOR, 1969) e estão na unidade do número de substituições de bases por sítio. Todas as posições contêm gaps e os dados perdidos foram eliminados. A análise envolveu 29 seqüências nucleotídicas. Houve um total de 474 posições no conjunto final de dados. As análises evolutivas foram conduzidas no programa MEGA6 (TAMURA, 2013).

Prospecção de fungos entomopatogênicos usando *Tenebrio molitor* como iscas-vivas

Foram utilizadas 45 larvas de *T. molitor* em cada tratamento (solo desnudo e solo de mata) e verificamos uma maior taxa de mortalidade nos indivíduos que estavam em contato com o solo de mata (78%), destes apenas em dois indivíduos ocorreu extrusão de fungo filamentososo em seu tegumento. Os dois isolados tiveram a região ITS seqüenciados (primers ITS-1 e ITS-4) e por comparação com outras sequencias conhecidas (BLAST), foram identificadas as espécies: isolado 1 com 99% de similaridade com *Fusarium solani* e isolado 2 com 100% de similaridade com *Metarhizium anisopliae*.

Isolamento de *Leucoagaricus gongylophorus*

O fungo *L. gongylophorus* foi isolado em meio BDA, pH= 6,0, contendo cloranfenicol (150 mg/L) e após verificar o desenvolvimento das hifas do fungo, este foi repicado para placas de Petri contendo BDA, mantidos em escotofase total com temperatura de 26 °C. Para confirmação do fungo foram feitas observações em microscópio óptico dos gongilídeos nas terminações das hifas, após 21 dias de crescimento da cultura pura (Figura 9).

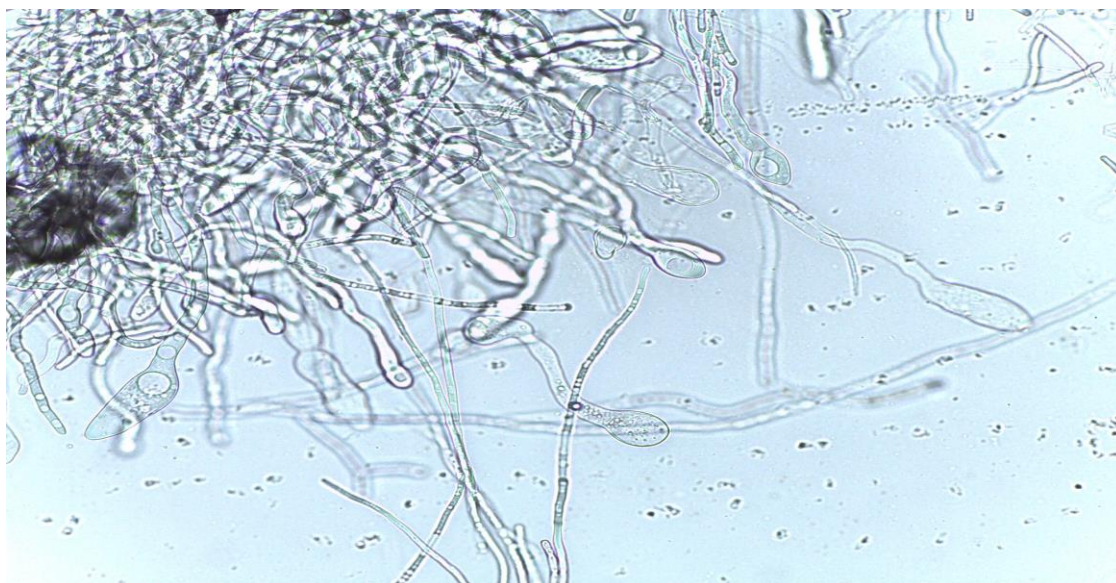


Figura 9 – Fungo *L. gongylophorus* mostrando em detalhe os gongilídios nas extremidades das hifas. (aumentado 400x).

Curvas de crescimento de *Leucoagaricus gongylophorus* e *Trichoderma* spp.

O tamanho inicial de todos isolados era de 5 mm de diâmetro. Ao final dos 21 dias, *L. gongylophorus* apresentava em média 31,8 mm de diâmetro, enquanto a maioria dos isolados de *Trichoderma* cresceu completando o tamanho da placa de Petri (85 mm) em apenas 4 dias. Somente o isolado Trd2 teve crescimento um pouco mais lento e completou a placa no 5º dia. Foram feitas transformações logarítmicas dos valores médios dos diâmetros e as curvas de crescimento se ajustaram melhor a um modelo de regressão polinomial quadrático, com coeficiente de determinação (R^2) superiores a 0,93 (Tabela 2).

Tabela 2 – Equações de regressão e valores de R^2 correspondente ao crescimento radial do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* e sete isolados de *Trichoderma* spp.

| Fungo | Equação | R^2 |
|--|----------------------------------|--------------|
| Trd1 <i>Trichoderma spirale</i> , isolado 1 | $y = -0,078x^2 + 0,629x + 1,708$ | $R^2 = 0,99$ |
| Trd2 <i>Trichoderma spirale</i> , isolado 2 | $y = -0,028x^2 + 0,425x + 1,567$ | $R^2 = 0,93$ |
| Trd3 <i>Trichoderma strigosellum</i> | $y = -0,059x^2 + 0,551x + 1,673$ | $R^2 = 0,99$ |
| Trd4 <i>Trichoderma</i> spp1 | $y = -0,059x^2 + 0,554x + 1,649$ | $R^2 = 0,98$ |
| Trd5 <i>Trichoderma</i> spp2 | $y = -0,076x^2 + 0,620x + 1,703$ | $R^2 = 0,99$ |
| Trd6 <i>Trichoderma asperellum</i> | $y = -0,084x^2 + 0,663x + 1,685$ | $R^2 = 0,98$ |
| Trd7 <i>Trichoderma harzianum</i> (ESALQ 1306) | $y = -0,076x^2 + 0,620x + 1,712$ | $R^2 = 0,99$ |
| Lg <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> | $y = -0,000x^2 + 0,049x + 0,702$ | $R^2 = 0,99$ |

Y= Crescimento radial; x= tempo, dias.

Efeito antagônico de isolados de *Trichoderma* sp. em *Leucoagaricus gongylophorus*

No tratamento controle, após oito dias, observou-se o maior crescimento médio do fungo mutualista sendo 6,97mm de diâmetro e, nos demais tratamentos, conforme esperado, foram verificados efeitos inibitórios do fungo antagônico sobre o mutualista. Os isolados Trd2, Trd6 e Trd7 apresentaram a capacidade de inibição do fungo mutualista acima de 57%. Apenas o isolado Trd5 obteve a taxa de inibição inferior a 50%. Os dados de crescimento relativo médios do fungo mutualista foi comparada com o controle e mostraram que houve redução significativa do seu crescimento para todos os tratamentos avaliados (Tabela 3). Para efeitos de comparações de cada par de médias, a tabela 4 contém os valores de *P* na comparação 2 a 2 pelo teste de FISHER LSD.

Tabela 3 – Crescimento (em mm \pm desvio padrão) e taxa de inibição de *Leucoagaricus gongylophorus*, após oito dias na presença de diferentes isolados de *Trichoderma* spp.

| | Diâmetro Inicial (DI) | Diâmetro Final (DF) | C | CR | Inibição de crescimento* |
|--|-----------------------|---------------------|-------|--------------------|--------------------------|
| Controle (C ₁) | 5,03 \pm 0,05 | 12,0 \pm 2,09 | 2,385 | 1,00a [§] | 0% |
| Trd5 - <i>Trichoderma</i> spp.2 | 5,82 \pm 0,74 | 6,98 \pm 0,97 | 1,199 | 0,502b | 49,8% |
| Trd4 - <i>Trichoderma</i> spp.1 | 5,62 \pm 0,63 | 6,95 \pm 1,07 | 1,236 | 0,498bc | 50,2% |
| Trd1 - <i>T. spirale</i> isolado 1 | 5,68 \pm 0,86 | 6,72 \pm 0,88 | 1,183 | 0,496bc | 50,4% |
| Trd3 - <i>T. strigosellum</i> | 5,61 \pm 0,49 | 6,45 \pm 0,71 | 1,149 | 0,480bc | 52,0% |
| Trd7 - <i>T. harzianum</i> (ESALQ 1306) | 5,7 \pm 0,8 | 6,0 \pm 1,06 | 1,052 | 0,425bc | 57,5% |
| Trd2 - <i>T. spirale</i> isolado 2 | 5,15 \pm 0,19 | 5,2 \pm 0,17 | 1,009 | 0,422c | 57,8% |
| Trd6 - <i>T. asperellum</i> | 5,0 \pm 0 | 5,03 \pm 0,14 | 1,006 | 0,421c | 57,9% |

C₁: Eficiência de crescimento do tratamento controle; C: Eficiência de Crescimento de *L. gongylophorus* na presença do fungo antagônico; C= DF/DI; CR: Crescimento relativo do *L. gongylophorus* na presença do fungo antagônico CR= C/C₁; *Porcentagem de inibição de crescimento de *L. gongylophorus*.

[§] Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste *t*.

Tabela 4 – Valores de *P*, na comparação 2 a 2 das médias do crescimento relativo de *L. gongylophorus* em crescimento pareado com sete isolados de *Trichoderma* sp.

| Fungo | Trd1 | Trd2 | Trd3 | Trd4 | Trd5 | Trd6 | Trd7 | L.g. |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------|
| Trd1 | X | - | - | - | - | - | - | - |
| Trd2 | 0,06 | X | - | - | - | - | - | - |
| Trd3 | 0,68 | 0,15 | X | - | - | - | - | - |
| Trd4 | 0,61 | 0,02* | 0,36 | x | - | - | - | - |
| Trd5 | 0,88 | 0,04* | 0,57 | 0,72 | X | - | - | - |
| Trd6 | 0,06 | 0,97 | 0,13 | 0,02* | 0,04* | x | - | - |
| Trd7 | 0,15 | 0,67 | 0,29 | 0,05 | 0,11 | 0,65 | X | - |
| L.g. | <0,01* | <0,01* | <0,01* | <0,01* | <0,01* | <0,01* | <0,01* | X |

*significativos ao nível de 5%, pelo teste de FISHER LSD.

Trd1= *Trichoderma spirale* isolado 1; Trd2= *Trichoderma spirale* isolado 2; Trd3= *Trichoderma strigosellum*; Trd4= *Trichoderma* spp1; Trd5= *Trichoderma* spp2; Trd6= *Trichoderma asperellum*; Trd7= *Trichoderma harzianum* (ESALQ 1306).

Após oito dias do teste pareado, foi verificado que todos os isolados do fungo antagonístico já havia esporulado e *L. gongylophorus* obteve o menor crescimento pareado com Trd6 e Trd2 sendo 0,03 e 0,05 mm médio de diâmetro respectivamente e o maior crescimento quando pareado com Trd4 sendo 1,33 mm. O teste de comparação de médias do crescimento de *L. gongylophorus* pareado com os sete isolados do fungo antagonístico, apresentou diferença significativa entre os tratamentos ($F(6,315)= 29,431$, $P < 0,0001$) (Figura 10).

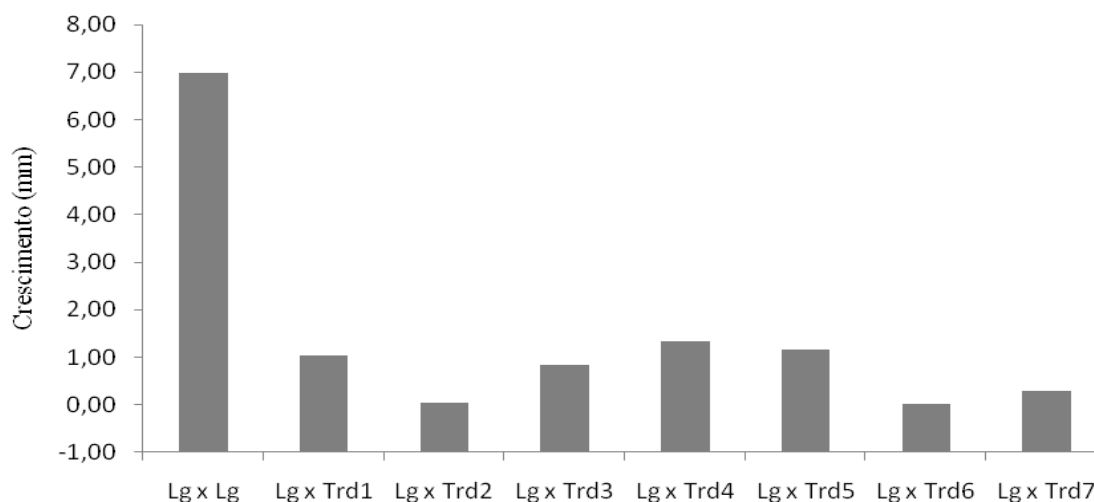


Figura 10 – Crescimento médio (em mm) de *L. gongylophorus* (L.g) na presença de sete isolados de *Trichoderma* spp. Trd1= *Trichoderma spirale* isolado 1; Trd2= *Trichoderma spirale*

isolado 2; Trd3= *Trichoderma strigosellum*; Trd4= *Trichoderma* spp1; Trd5= *Trichoderma* spp2; Trd6= *Trichoderma asperellum*; Trd7= *Trichoderma harzianum* (ESALQ 1306).

DISCUSSÃO

Naturalmente fungos, bactérias e nematóides são encontrados nos solos (ALVES, 1998) e as densidades populacionais destes organismos variam com as características locais. Com o isolamento dos fungos filamentosos de solos do *Campus* de Gurupi, pode-se encontrar diferentes valores médios de UFC.g⁻¹ sendo o menor valor verificado no solo desnudo, na camada mais superficial (0-10 cm). Em contrapartida, no solo de mata na camada mais superficial, foi encontrado o maior valor. Esse resultado se deve, muito provavelmente, à alta incidência de irradiação solar e ausência de vegetação na área desnuda. No solo de mata há constante atividade de diversos microrganismos na degradação dos materiais vegetais depositados na superfície e ainda há baixa incidência solar sobre o solo.

As larvas de *Tenebrio molitor* que permaneceram em contato com o solo de mata apresentaram uma maior taxa de mortalidade (78%), no entanto, entre esses indivíduos mortos, em apenas duas larvas foi possível confirmar a morte por fungos filamentosos (4,44%). É provável que haja neste solo grande diversidade de microrganismos, e análises posteriores devem ser realizados para confirmar os agentes causadores desta alta mortalidade nas larvas que permaneceram no solo de mata, pois sabem-se que os nematóides presentes no solo são capazes de causar a morte de insetos (POINAR et al., 2007; RASMAN et al., 2012). Os fungos filamentosos encontrados nos solos estudados foram observados em microscópio óptico, e por meio de comparações com chaves taxonômicas, encontramos cinco isolados de *Trichoderma* sp., três dos quais tiveram a região ITS do rDNA sequenciada para fins taxonômicos (Macrogen). No entanto, não foi possível realizar o sequenciamento de dois isolados devido à problemas técnicos com as amostras (Trd4 e Trd5). Realizamos comparações BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) e foi verificada a maior similaridade com outras seqüências depositadas. Assim foi possível identificar as espécies dos nossos isolados.

Para o isolamento do fungo mutualista, foi necessário realizar sucessivas repicagens a fim de obter culturas puras. Após 21 dias de crescimento da cultura pura

foi realizada a observação do micélio no microscópio óptico e os gongilídeos nas extremidades das hifas foram facilmente visualizados (Figura 9) e confirmados que se tratava do *L. gongylophorus*, pois estes gongilídeos são encontrados apenas nesta espécie de fungo.

Houve um comportamento semelhante em todas as curvas de crescimento dos isolados de *Trichoderma* sp. e *L. gongylophorus*, sendo que se ajustaram melhor num modelo polinomial quadrática, apresentando R^2 superior a 0,93. Os isolados Trd6 - *T. asperellum* e Trd7 - *T. harzianum* (ESALQ 1306) se destacaram por apresentarem o crescimento mais rápido e o isolado Trd2 - *T. spirale* isolado 2 por apresentar um crescimento mais lento em relação com os demais.

Todos os isolados de *Trichoderma* sp. testados foram capazes de inibir o crescimento do fungo mutualista em pelo menos 49,8%. É dado destaque então aos isolados Trd7 - *T. harzianum* (ESALQ 1306), Trd2 - *T. spirale* isolado 2 e Trd6 - *T. asperellum* por apresentarem os maiores valores de inibição, sendo 57,5%, 57,8% e 57,9%, respectivamente. Em trabalho semelhante, Ortiz & Orduz (2001), obtiveram uma taxa de inibição de apenas 22% de *T. harzianum* (ESALQ 1306) sobre o fungo mutualista e posteriormente Silva et al. (2006b) verificaram 75% de inibição com tais combinações de fungos. Apesar de serem fungos da mesma espécie, em cada trabalho foram utilizados isolados distintos e possuem diferentes graus de virulência.

De modo geral, fungos do gênero *Trichoderma* sp. apresentam rápido crescimento micelial. Por isso, nos ensaios pareados com o fungo mutualista em placa de Petri com meio BDA, eles podem causar uma acelerada diminuição de disponibilidade dos nutrientes do meio, desfavorecendo o desenvolvimento de *L. gongylophorus* que tem crescimento lento, ficando caracterizado um efeito inibitório por competir pelos mesmos recursos energéticos. Após realização de ensaios in vitro, Ortiz & Orduz (2001) verificaram que, possivelmente o mecanismo de interação que ocorre entre *Trichoderma* spp. e *L. gongylophorus* envolve secreção de substâncias voláteis e não voláteis, impedindo assim o crescimento do fungo mutualista sem mesmo ocorrer o contato físico das hifas.

Com base em nosso trabalho e outros experimentos em laboratório, é evidenciada a possibilidade de controle biológico de formigas-cortadeiras com a utilização de fungos filamentosos. Deve-se levar em conta que o desenvolvimento de formulações para serem usadas no campo depende de uma série de aprimoramentos, pois em condições de campo os resultados são menos eficientes. Conforme ressaltado por Oi & Pereira (1993) as formigas apresentam diversas estratégias de defesas ao detectarem a presença de patógenos em sua colônia, como a utilização de secreções, limpeza da superfície do corpo e do ninho e até evitam o contato com o patógeno. Diante disso é necessário intensificar os estudos com preparações de formulados contendo agentes biológicos de forma a driblar essa detecção pelas formigas, por exemplo, como a encapsulamento de iscas micoinseticidas.

CONCLUSÕES

Podemos concluir com a realização deste trabalho que:

1. O solo de área de mata apresenta maior quantidade e diversidade de fungos filamentosos que o solo de área desnuda;
2. A utilização de *Tenebrio molitor* como isca-viva é eficiente para a bioprospecção de fungos entomopatogênicos;
3. Foram encontrados isolados de *Trichoderma* spp. capazes de inibir o crescimento de *L. gongylophorus* em ensaios in vitro;
4. O fungo Trd2 -*Trichoderma spirale* isolado 2 – tem maior potencial para testes em campo, pois apresentou crescimento lento em placa de Petri e maior efeito inibitório contra *L. gongylophorus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S. B. (Org.). 1998. Controle Microbiano de Insetos. 2. ed. Piracicaba-SP: Fealq, 1163p.
- ARAÚJO, M.S.; DELLA LUCIA, T.M.C.; RIBEIRO, G.A.; KASUYA, M.C.M. 2003. Impacto da queima controlada de cana-de-açúcar na nidificação e estabelecimento de colônias de *Atta bisphaerica* Forel (Hymenoptera: Formicidae). Neotrop. Entomol. 32, p.685–691.
- ARAÚJO, M. S.; RIBEIRO, M.M.R.; MARINHO, C.G.S.; OLIVEIRA, M.A.; DELLA LUCIA, T.M.C. 2011. Fundação e estabelecimento de formigueiros. In: DELLA LUCIA, T.M.C. Formigas-cortadeiras: da Bioecologia ao manejo. Viçosa, MG, Ed. UFV, 421p.
- AUTUORI, M. 1941. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp.) (Hymenoptera-Formicidae). I- Evolução do sauveiro (*Atta sexdens rubropilosa*, Forel, 1908). Arquivos Instituto Biológico, São Paulo, v.12. P.197-228.
- AUTUORI, M. 1942. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp.) (Hymenoptera-Formicidae). II- O sauveiro inicial (*Atta sexdens rubropilosa*, Forel, 1908). Arquivos Instituto Biológico, São Paulo, v.13. p.67-97.
- AUTUORI, M. 1950. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp.-Hymenoptera-Formicidae). V- Número de formas aladas e redução dos sauveiros iniciais. Arquivos Instituto Biológico, São Paulo. v.19, p.325-331.
- BENTO, J.M.S.; DELLA LUCIA, T.M.C.; MUCHOVEJ, R.C.M. & VILELA, E.F. 1991. Influência da composição química e da população microbiana de diferentes horizontes do solo no estabelecimento de sauveiros iniciais de *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae) em laboratório. An. Soc. Entomol. Brasileira. v.20, p.307-317.
- BOT, A. N.; OBEMAYER, M.L.; HÖLLDOBLER, B.; BOOMSMA, J.J. 2001. Functional morphology of the metapleural gland in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. Insectes Sociaux. v.48, p.63-66.

BRANDÃO, C.R.F.; MAYHÉ-NUNES, A.J.; SANHUDO, C.E.D. 2011. Taxonomia e filogenia das formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T.M.C. Formigas-cortadeiras: da Bioecologia ao manejo. Viçosa, MG, Ed. UFV, 421p.

CHAPELA, I.H.; REHNER, S.A.; SCHULTZ, T.R.; MUELLER, U.G. 1994. Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. *Science*, v.266, n.5191 p.1691-1994.

DELLA LUCIA, T.M.C.; MOREIRA, D.D.O. Caracterização dos ninhos. In: DELLA LUCIA, T.M.C. 1993. As formigas-cortadeiras. Viçosa, MG: Sociedade de investigações florestais. Cap 8. p.84-105.

DELLA LUCIA, T.M.C. & SOUZA, D.J. 2011. Importância e história de vida das formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T.M.C. Formigas-cortadeiras: da Bioecologia ao manejo. Viçosa, MG, Ed. UFV, 421p.

DIEHL-FLEIG, E.; ROCHA, E.S. 1998. Escolha do solo por fêmeas de *Acromyrmex striatus* (Roger) (Hymenoptera: Formicidae) para construção do ninho. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v.27, p.41-45.

FARJI-BRENER, A. G.; GHERMANDI, L. 2008. Leaf-cutting ant nests near roads increase fitness of exotic plant species in natural protected areas. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v.275, n.1641, p.1431–1440.

FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. v.39, p.783-791.

FERNANDEZ-MARIN, H.; ZIMMERMAN, J. K.; WCISLO, W. T. 2004. Ecological traits and evolutionary sequence of nest establishment in fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, London, v. 82, p.39-48.

FOLGARAIT, P.; GOROSITO, N.; POULSEN, M.; CURRIE, C.R. 2011. Preliminary in vitro insights into the use of natural fungal pathogens of leaf cutting ants as biocontrol agents. *Current microbiology*, v.63, n.3, p.250-258.

HERMOSA, R.; VITERBO, A.; CHET, I.; MONTE, E. 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*. v.158, p.17-25.

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

JUKES, T.H.; CANTOR, C.R. 1969. Evolution of protein molecules. In: Munro, H.N., editor, *Mammalian Protein Metabolism*, Academic Press, New York. p.21-132.

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

LOPEZ, E.; ORDUZ, S. 2003b. *Metarhizium anisoplae* y *Trichoderma viride* controlan colonias de *Atta cephalotes* em campo major que um insecticida químico. *Revista Colombiana de Biotecnología*. v.4, n.1, p.71-78.

MACHADO, V.; DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M.E.; LUCCHESI, M.E. de P. 1988. Reações observadas em colônias de algumas espécies de *Acromyrmex* (Hymenoptera - Formicidae) quando inoculadas com fungos entomopatogênicos. *Ciência e Cultura*, v. 40, n. 11, p.1106-1108.

MARICONI, F.A.M. 1970. *As Saúvas*. Ed. Agronômica. Ceres. 167p.

MARTIN, M.M. & WEBER, N.A. 1969. The cellulose-utilizing capability of the fungus cultured by the Attini ant *Atta colombica tonsipes*. *Ann Entomological Soc of America*. 62:1386-1387

MARTIN, M.M.; BOYD, N.D.; GIESELMANN, M.J.; SILVER, R.G. 1975. Activity of faecal fluid of a leaf-cutting ant toward plant cell wall polysaccharides. *Journal of Insect Physiology*, v21, p1887-1892.

MAYHÉ-NUNES, A.J.; K. JAFFÉ. 1998. On the biogeography of Attini (Hymenoptera: Formicidae). *Ecotropicos*, v.11, n.1, p.45-54.

MEHDIABADI, N. J.; SCHULTZ, T.R. 2009. Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini). *Myrmecological News*, v.13, p.37-55.

MEYLING, N.V. 2007. Methods for isolation of entomopathogenic fungi from the soil environment. Laboratory manual University of Copenhagen, Denmark. 18p.

MISHRA, B. K.; MISHRA, R. K.; MISHRA, R. C.; TIWARI, A. K.; YADAV, R. S.; DIKSHIT, A. 2011. Biocontrol efficacy of *Trichoderma viride* isolated against fungal plant pathogens causing disease in *Vigna radiata* L. *Archives of Applied Science Research*, v.3, n.2, p.361-369.

MOREIRA, D.D.O.; ERTHAL JR, M.; SAMUELS, R.I. 2011. Alimentação e digestão em formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T.M.C. Formigas-cortadeiras: da Bioecologia ao manejo. Viçosa, MG, Ed. UFV, 421p.

OI, D.H.; PEREIRA, R.M. 1993. Ant behavior and microbial pathogens (Hymenoptera: Formicidae). *Florida Entomologist*. V.76, n.1, p.63-74.

ORTIZ, A.; ORDUZ, S. 2001. 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.

PAGNOCCA, F.C.; RODRIGUES, A.; BACCI JUNIOR, M. 2011. Microrganismos associados às formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T.M.C. Formigas-cortadeiras: da Bioecologia ao manejo. Viçosa, MG, Ed. UFV, 421p.

PANDEY, A.; SIMON, L. S.; AHMAD, S. 2010. Screening of antifungal activities in *Trichoderma* isolates against some soil borne plant pathogens. *National Academy Science Letters-india*, v.33, p.285-288.

PAPA, P.J.; PAPA, F. 1982. Inhibition des bactéries dans les nids d'*Acromyrmex octospinosus* Reich. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, Paris, v.75, n.4, p.415-425.

- POINAR JR., G. O.; PORTER, S. D.; TANG, S.; HYMAN, B.C. 2007. *Allomermis solenopsi* n. sp. (Nematoda: Mermithidae) parasitising the fire ant *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae) in Argentina. *Syst. Parasitol.* v.68, p.115–128.
- PRETTO, D.R. 1996. Arquitetura dos túneis de forrageamento e do ninho de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hym., Formicidae), dispersão de substrato e dinâmica de inseticida. 110f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Proteção de Plantas)-Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.
- RASMAN, S.; ALI, J.G.; HELDER, J.; VAN DER PUTEN, W.H. 2012. Ecology and evolution of soil nematode chemotaxis. *J. Chemical Ecology*, v.38, n.6, p.615-628.
- RODRIGUES, A.; PASSARINI, M.R.; FERRO, M.; NAGAMOTO, N.S.; FORTI, L.C.; BACCI JR, M.; SETTE, L.D.; PAGNOCCA, F.C. 2013. Fungal communities in the garden chamber soils of leaf-cutting ants. *J Basic Microbiology*. V.54, p.1186–1196.
- SAITOU, N.; NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* v.4, p.406-425.
- SAMUELS, G.J. 2006. Trichoderma: systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology*, v.96, n.2, p.195-206.
- SILVA, A., BACCI, M., PAGNOCCA, F. C., BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. 2006a. Starch metabolism in *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. *Microbiological research*, v.161, n.4, p.299-303.
- SILVA, A., RODRIGUES, A., BACCI JR, M., PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C. 2006b. Susceptibility of the ant-cultivated fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales: Basidiomycota) towards microfungi. *Mycopathologia*, v.162, n.2, 115-119.
- SOUSA-SOUTO, L.; SCHOEREDER, J. H.; SCHAEFER, C. E. G. R. 2007. Leaf-cutting ants, seasonal burning and nutrient distribution in Cerrado vegetation. *Austral Ecology*, v.32, p.758–765.
- SOUZA, D.J.; SANTOS, J.F.; DELLA LUCIA, T.M.C. 2011. Organização social das formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T.M.C. Formigas-cortadeiras: da Bioecologia ao manejo. Viçosa, MG, Ed. UFV, 421p.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI A.; KUMAR, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, v.30, p.2725-2729.

VAN GILS, H.A.J.A. 2011. Los factores ambientales em relación com La hormiga arriera (*Atta sexdens*) em el sur Del trapecio amazónico, Ph.D. Dissertação, Faculdade de Agronomia, Universidade Nacional da Colômbia, Colômbia. 236 p.

VASCONCELOS, H.L.; VIEIRA-NETO, E.H.M.; MUNDIM, F.M.E; BRUNA, E.M. 2006. Roads Alter the Colonization Dynamics of a Keystone Herbivore in Neotropical Savannas. *Biotropica*, v.38. p.661–665.

WARD, P. S., BRADY, S. G., FISHER, B. L., & SCHULTZ, T. R. 2015. The evolution of myrmicine ants: phylogeny and biogeography of a hyperdiverse ant clade (Hymenoptera: Formicidae). *Systematic Entomology*, v.40, n.1, p.61-81.

WILSON, E.O. 1971. *The insects societies* Cambridge, Mass.: Harvard University Press, 548p.

WILSON, E.O. 1980. Taxonomic exploration [Catalog of Hymenoptera in America North of Mexico, 1979. In: Krombein, et al.(Ed.) *Science*, v.208, p.721-722, 3v.

YANG, X.; CHEN, L.; YONG, X.; SHEN, Q. 2011. Formulations can affect rhizosphere colonization and biocontrol efficiency of *Trichoderma harzianum* SQR-T037 against *Fusarium* wilt of cucumbers. *Biology and fertility of soils*, 47(3), 239-248.

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

ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J.C.; MAYHÉ-NUNES, A.J.; MEDEIROS, A.G.B.; SOUZA-SILVA, A. 2003b. Combate sistemático de formigas-cortadeiras com iscas granuladas, em eucaliptais com cultivo mínimo. *Rev. Árvore* 27: p.387-392.

ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J.C.; VILELA, E.F.; LEITE, H.G.; JAFFÉ, K.; OLIVEIRA, A.C. 2003c. Level of economic damage for leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in *Eucalyptus* plantations in Brazil. *Sociobiology*. 42: p.433-444.

ZANUNCIO, J.C.; SOSSAI, M.F.; OLIVEIRA, H.N. de; ZANUNCIO JUNIOR, J.S. 2002. Influência das iscas formicidas Mirex-S Max e Blitz na paralisação de corte e no controle de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Revista Árvore*, Viçosa, v. 26, n. 2, p. 237-242.