

JOEL DA CRUZ COUCEIRO

AÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS NA MORTALIDADE E NO  
SISTEMA IMUNE DE FORMIGAS-CORTADEIRAS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da  
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

C853a  
2015  
Couceiro, Joel da Cruz, 1990-  
Ação de fungos entomopatogênicos na mortalidade e  
no sistema imune de formigas-cortadeiras / Joel da Cruz  
Couceiro. - Viçosa, MG, 2015.  
ix, 46f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador : Terezinha Maria Castro Della Lucia.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Formiga-cortadeira. 2. Actinomicetos. 3. Patógenos.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Entomologia. Programa de Pós-graduação em Entomologia.  
II. Título.

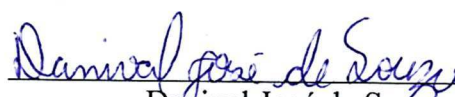
CDD 22. ed. 595.796

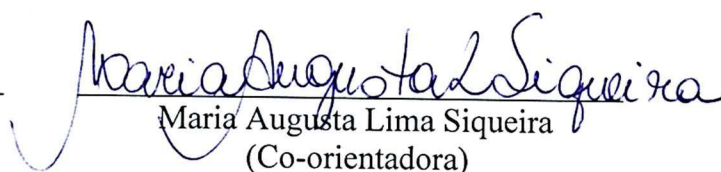
JOEL DA CRUZ COUCEIRO

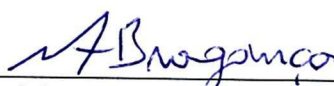
AÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS NA MORTALIDADE E NO  
SISTEMA IMUNE DE FORMIGAS-CORTADEIRAS

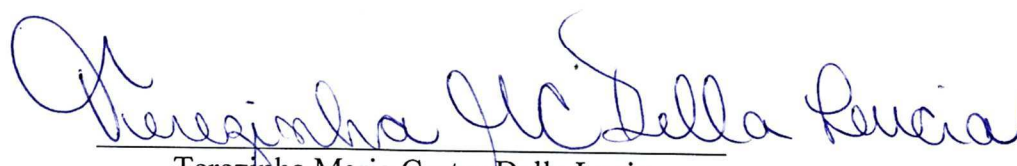
Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-graduação  
em Entomologia, para obtenção do título de  
*Magister Scientiae*.

APROVADA: 26 de março de 2015.

  
Danival José de Souza  
(Co-orientador)

  
Maria Augusta Lima Siqueira  
(Co-orientadora)

  
Marcos Antônio Lima Bragança

  
Terezinha Maria Castro Della Lucia  
(Orientadora)

**A todos que estiveram comigo ao longo dessa jornada**

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Entomologia, pela oportunidade de estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À minha orientadora, professora doutora Terezinha Maria Castro Della Lucia, pela orientação durante a graduação e o mestrado. Muito obrigado pelos conselhos, pela amizade e pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor doutor Danival José de Souza, que mesmo estando longe, foi de vital importância para este trabalho. Obrigado por toda a ajuda.

À professora doutora Maria Augusta Lima Siqueira, pelas sugestões ao trabalho.

Aos meus pais, João e Telma, por estarem sempre ao meu lado. O apoio de vocês foi fundamental para que eu atingisse minhas metas. Agradeço especialmente à minha mãe, por todos os finais de semana nos quais me acompanhou ao laboratório, seja para avaliar experimentos ou para alimentar as formigas.

A grandes amigos com os quais pude contar nos melhores e nos piores momentos: Augusto, Priscila, Franklin e Késsia. Vocês são muito importantes na minha vida, obrigado pelos conselhos, broncas e pelos ótimos momentos.

A todos os amigos da Biologia. A companhia de vocês todos esses anos me fez mais feliz e sempre renovou minhas forças quando precisava. Obrigado pelos momentos de descontração. Agradecimentos especiais aos amigos do “Lavando Roupa”. Vocês são minha segunda família. Não importa a distância, estaremos sempre juntos.

Aos amigos nativos de Viçosa, pela excelente companhia em qualquer época, e em especial ao Carlos Augusto, que está comigo desde sempre.

À equipe do Laboratório de Formigas-cortadeiras. Às “laevigatinhas” Lailla, Karina, Vanessa, Bressane e Hendria, obrigado pelos bons momentos durante o trabalho e pelos conselhos na realização do trabalho. Ao Wesler, que se tornou um grande amigo e me ajudou bastante na montagem dos experimentos. Ao Sr. Manuel, que foi essencial na manutenção das colônias. Obrigado por toda a ajuda e pela companhia no laboratório.

Aos amigos que fiz na pós-graduação, pelo convívio durante o período de aulas e pelos momentos de descontração.

Ao professor doutor Marcos Antônio Lima Bragança, pela participação na banca deste trabalho.

Por fim, a todos outros que fizeram parte da minha vida nesses anos de universidade.

Muito obrigado!

## **BIOGRAFIA**

JOEL DA CRUZ COUCEIRO, segundo filho de João Bosco Couceiro da Silva e Telma Maria da Cruz Couceiro, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, em 21 de junho de 1990.

Concluiu o Ensino Médio em dezembro de 2007, no Colégio Anglo de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

Iniciou o curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa em março de 2008. Graduou-se bacharel e licenciado em Ciências Biológicas em fevereiro de 2013.

Em abril de 2013, iniciou o curso de Mestrado em Entomologia na Universidade Federal de Viçosa, defendendo a dissertação no dia 26 de março de 2015.

## ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1 - INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 - Formigas-cortadeiras.....	1
1.2 - Fungos parasitas associados às cortadeiras.....	1
1.3 - Estratégias de defesa.....	2
1.4 - Actinomicetos.....	4
2 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	7
CAPÍTULO I - MORTALIDADE RESULTANTE DA APLICAÇÃO TÓPICA DE SUSPENSÕES DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS EM FORMIGAS- CORTADEIRAS.....	10
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1 - INTRODUÇÃO.....	12
2 - METODOLOGIA.....	15
2.1 - Preparação das suspensões de esporos.....	15
2.2 - Colônias e operárias de cortadeiras.....	15
2.3 - Procedimento experimental.....	16
2.4 - Análise estatística.....	17
3 - RESULTADOS.....	18
3.1 - Testes de mortalidade com <i>Aspergillus ochraceus</i> .....	18
3.1.1 - Aplicação em <i>Acromyrmex subterraneus subterraneus</i> .....	18
3.1.2 - Aplicação em <i>Acromyrmex subterraneus molestans</i> .....	18
3.2 - Testes de mortalidade com <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	20
3.2.1 - Aplicação em <i>Acromyrmex subterraneus subterraneus</i> .....	20
3.2.2 - Aplicação em <i>Acromyrmex subterraneus molestans</i> .....	20
3.3 - Comparações entre os efeitos das suspensões de esporos.....	22
3.3.1 - <i>Acromyrmex subterraneus subterraneus</i> .....	22
3.3.2 - <i>Acromyrmex subterraneus molestans</i> .....	22
4 - DISCUSSÃO.....	26
5 - CONCLUSÃO.....	30



6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
CAPÍTULO II - TAXA DE ENCAPSULAÇÃO DE OPERÁRIAS DE FORMIGAS-CORTADEIRAS APÓS APLICAÇÃO TÓPICA DE SUSPENSÕES DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS.....	33
RESUMO.....	33
ABSTRACT.....	34
1 - INTRODUÇÃO.....	35
2 - METODOLOGIA.....	37
2.1 - Suspensões de esporos.....	37
2.2 - Colônias e operárias de cortadeiras.....	37
2.3 - Procedimento experimental.....	37
2.4 - Análise estatística.....	38
3 - RESULTADOS.....	39
3.1 - Encapsulação de operárias submetidas ao fungo <i>Aspergillus ochraceus</i> ....	39
3.1.1 - Operárias de <i>Acromyrmex subterraneus subterraneus</i> .....	39
3.1.2 - Operárias de <i>Acromyrmex subterraneus molestans</i> .....	39
3.2 - Encapsulação de operárias submetidas ao fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> ....	41
3.2.1 - Operárias de <i>Acromyrmex subterraneus subterraneus</i> .....	41
3.2.2 - Operárias de <i>Acromyrmex subterraneus molestans</i> .....	41
4 - DISCUSSÃO.....	43
5 - CONCLUSÃO.....	45
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

## RESUMO

COUCEIRO, Joel da Cruz, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2015. **Ação de fungos entomopatogênicos na mortalidade e no sistema imune de formigas-cortadeiras.** Orientadora: Terezinha Maria Castro Della Lucia. Co-orientadores: Danival José de Souza e Maria Augusta Lima Siqueira.

De forma a proteger a colônia de micro-organismos que habitam o solo e são capazes de infectar operárias e seu jardim de fungo, as formigas-cortadeiras desenvolveram diversos mecanismos de defesa, como por exemplo, o sistema imune capaz de encapsular pequenas partículas infecciosas, a produção de antimicrobianos pelas glândulas metapleurais, e a simbiose com actinomicetos, bactérias filamentosas presentes na cutícula e que também produzem antimicrobianos. A partir disso, o objetivo deste trabalho foi infectar três grupos de operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e *Acromyrmex subterraneus molestans* (operárias externas ao jardim de fungo, operárias do jardim sem camada visível de actinomicetos e operárias do jardim com camada visível de actinomicetos) com duas espécies de fungos entomopatogênicos, *Aspergillus ochraceus* e *Metarhizium anisopliae*, e verificar se a presença das bactérias filamentosas influenciaria na capacidade de sobrevivência e na resposta imune das formigas. Nos testes de mortalidade, as operárias foram infectadas e isoladas individualmente em placas de Petri, sendo avaliadas durante 10 dias. As suspensões de esporos aumentaram as taxas de mortalidade em ambas as subespécies. Porém, em nenhuma delas foi encontrada relação entre a presença dos actinomicetos e a maior capacidade de sobrevivência dos grupos de operárias. Quando os efeitos das suspensões de esporos foram comparados em cada grupo de operárias, ocorreram efeitos semelhantes nos dois grupos de *Ac. subterraneus subterraneus* que não possuíam camada visível de actinomicetos; em *Ac. subterraneus molestans*, as suspensões causaram efeitos semelhantes apenas nas operárias internas sem camada visível das bactérias filamentosas. A resposta imune foi medida através do processo de encapsulação. Enquanto *M. anisopliae* causou efeito imunossupressor, *A. ochraceus* não produziu o mesmo resultado. Ambas as suspensões mostraram que as operárias externas ao jardim de fungo possuem sistema imune mais eficiente.

## ABSTRACT

COUCEIRO, Joel da Cruz, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2015. **Activity of entomopathogenic fungi on mortality and in the immune system of leaf-cutting ants.** Adviser: Terezinha Maria Castro Della Lucia. Co-advisers: Danival José de Souza and Maria Augusta Lima Siqueira.

To protect the colony from microorganisms which inhabit the soil and are capable of infecting workers and their fungus garden, leaf-cutting ants developed many defense mechanisms, e.g., the immune system capable of encapsulating small infectious particles, the production of antimicrobial substances by metapleural glands, and the symbiosis with actinomycete, filamentous bacteria that live in the cuticle and are also capable of producing antimicrobial substances. The objective of this study was to infect three groups of *Acromyrmex subterraneus subterraneus* and *Acromyrmex subterraneus molestans* workers (those outside the fungus garden, those inside the fungus garden without visible actinomycete covering the body, and those inside the fungus garden with visible actinomycete covering the body) with two species of entomopathogenic fungi, *Aspergillus ochraceus* and *Metarhizium anisopliae*, and to verify if the filamentous bacteria presence would influence the survival capacity and the immune response of the ants. During mortality tests, workers were infected and individually isolated in Petri dishes and evaluated during 10 days. We found that spore suspensions increased the mortality rates of both subspecies. However, in none of them there was a relationship between actinomycete presence and the increased capacity of survival of the groups of workers. When the effects of the spore suspensions were compared in each of the groups of workers, similar effects occurred in the two groups of *Ac. subterraneus subterraneus* which didn't have visible actinomycete covering the body; in *Ac. subterraneus molestans*, the suspensions caused similar effects only in the workers inside fungus garden without visible actinomycete covering the body. The immune response was measured through encapsulation. While *M. anisopliae* caused immunosuppressive effect, *A. ochraceus* did not produce the same result. Both suspensions indicated that workers outside fungus garden have a more effective immune system.

## **1 - INTRODUÇÃO GERAL**

### **1.1 - Formigas-cortadeiras**

As formigas-cortadeiras são insetos pertencentes à tribo Attini (Hymenoptera: Formicidae), composta por formigas cultivadoras de fungo e de distribuição Neotropical (WEBER, 1966). Esta tribo inclui 16 gêneros e 297 espécies (DELLA LUCIA, 2011). Recentemente, Sosa-Calvo et al. (2013) descreveram um novo gênero e uma nova espécie pertencentes à tribo. Respectivamente conhecidos como saúvas e quenquéns, os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* cortam materiais vegetais frescos e os transportam para seus ninhos, onde servem de substrato para o crescimento do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* (Basidiomycota: Agaricales: Agaricaceae), do qual se alimentam (WEBER, 1966).

As cortadeiras são consideradas pragas em ecossistemas agrícolas e pastagens (DELLA LUCIA, 2003), uma vez que, por cortarem diversos tipos de materiais vegetais, podem destruir plantações e algumas culturas. O hábito de corte, associado à organização eussocial (colônias apresentam sobreposição de gerações, cuidado parental e divisão de castas), torna difícil o controle desses insetos (DELLA LUCIA; GANDRA; GUEDES, 2014).

O gênero *Acromyrmex* é encontrado em grande parte da América, distribuindo-se desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina, não ocorrendo em território chileno, devido à Cordilheira dos Andes (DELABIE et al., 2011); no Brasil, ocorrem cerca de 20 espécies (MAYHÉ-NUNES, 1991). Formigas desse gênero são caracterizadas morfológicamente pela presença de 4 pares de espinhos no dorso, em contraste com as do gênero *Atta*, que possuem 3 pares e cujas operárias são de maior tamanho corporal.

Apesar de o polimorfismo não ser tão evidente em *Acromyrmex* como o é em *Atta*, existem três tipos básicos de operárias: as mínimas, que cultivam o jardim de fungo e cuidam dos ovos e das larvas; as médias, que executam as mesmas funções das mínimas, mas também forrageiam; e as máximas, que forrageiam e defendem a colônia (WEBER, 1966).

### **1.2 - Fungos parasitas associados às cortadeiras**

Devido ao fato de os ninhos serem construídos no solo e este ser um ambiente no qual se encontram muitos patógenos, tanto as formigas quanto o jardim de fungo estão

sujeitos a contaminações e infecções (BOT et al., 2002). Fungos do gênero *Escovopsis* (Ascomycota: Hypocreales anamórfico) estão entre os principais patógenos encontrados nas colônias. Parasita especializado do jardim de fungo, este micopatógeno apresenta a maior ocorrência entre os fungos não mutualísticos que podem ser encontrados nas colônias e possui alta virulência, capaz de crescer e dominar colônias rapidamente (na ausência de formigas, o tempo para isso pode chegar a apenas 2 dias) (CURRIE; MUELLER; MALLOCH, 1999). Elevados graus de infecção podem levar a grande perda de biomassa do jardim de fungo e redução do número de larvas, pupas e novas operárias (CURRIE, 2001).

Outras espécies de fungos parasitas também podem ser encontradas nos ninhos das cortadeiras. Rodrigues et al. (2005) identificaram 26 espécies isoladas de diferentes colônias em laboratório e em campo, entre elas, *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus flavus*, obtidas de operárias mortas descartadas nos lixos das colônias. Algumas das espécies isoladas são bastante comuns no solo e foram encontradas pela primeira vez em ninhos dessas formigas. Apesar de apresentarem certo grau de patogenicidade, fungos como *F. oxysporum* e *Cunninghamella* spp. provavelmente são danosos ao jardim de fungo não por parasitarem diretamente *L. gongylophorus*, mas sim por competirem nutricionalmente com este (RODRIGUES et al., 2008). Hughes et al. (2004) encontraram 58 isolados de *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* em solo perto de colônias de cortadeiras, sendo que alguns destes foram obtidos do lixo ou de operárias doentes encontradas neste local.

### **1.3 - Estratégias de defesa**

De forma a proteger o jardim de fungo e a si próprias, as cortadeiras possuem algumas estratégias de defesa. Quando um patógeno entra em contato com o inseto, a primeira barreira encontrada é o exoesqueleto; no caso de ingestão do parasita, a membrana peritrófica servirá como obstáculo (KLOWDEN, 2007). Quando essas barreiras são ultrapassadas, as defesas imunológicas são ativadas. Dois tipos básicos de respostas podem então acontecer: as humorais e as celulares. As primeiras dizem respeito àquelas mediadas por moléculas, enquanto as últimas dizem respeito às mediadas por células da hemolinfa (STRAND, 2008). As principais respostas celulares que ocorrem

são a fagocitose e a encapsulação, enquanto respostas humorais incluem a ação de peptídeos e proteínas antimicrobianos (GILLESPIE; KANOST; TRENCZEK, 1997).

Uma estratégia comportamental muito utilizada pelas cortadeiras é o *grooming*, ou lambedura, no qual as operárias utilizam as peças bucais para remoção de partículas infecciosas. Este comportamento é bastante importante na proteção do jardim de fungo contra eventuais parasitas ou competidores (NORTH; JACKSON; HOWSE, 1997) e na proteção das formigas contra patógenos (HUGHES; EILENBERG; BOOMSMA, 2002). A cavidade infrabucal, localizada abaixo da glossa e em comunicação com a cavidade bucal (QUINLAN; CHERRETT, 1978), possui importante papel no comportamento de *grooming*, uma vez que nela são armazenados os esporos ou os pedaços de fungo removidos, para posterior deposição no lixo (CURRIE; STUART, 2001). Neste último trabalho, os autores observaram aumento nas taxas de *fungus-grooming* e de *weeding* (remoção de fragmentos infectados e/ou velhos do jardim de fungo) em colônias nas quais foram aplicadas suspensões de esporos de *Escovopsis* sp. e *Trichoderma viride*. A importância das peças bucais no *grooming* torna-se clara ao se constatar que, quando elas são coladas e impedidas de agirem, as operárias não conseguem realizar a lambedura (TRAGUST et al., 2013).

A presença de glândulas metapleurais é uma característica exclusiva da família Formicidae. Localizadas na porção póstero-lateral do mesossoma, essas glândulas apresentam-se aos pares e são responsáveis por produzir secreções antimicrobianas que fluem para a superfície corporal e são utilizadas para proteger as formigas e o jardim de fungo contra parasitas (BOT et al., 2002). Estes últimos autores observaram que operárias de menor tamanho que trabalham dentro do jardim de fungo possuem glândulas metapleurais de maior tamanho em relação ao corpo, quando comparadas com operárias maiores que trabalham fora do jardim de fungo, evidenciando a importância dessas estruturas na defesa da colônia. Trabalho de Poulsen et al. (2002) mostrou que deve haver um *trade-off* entre a produção de antimicrobianos por essas glândulas e o gasto de energia metabólica, porque, ao bloquearem a abertura das glândulas, a taxa respiratória das operárias reduziu significativamente, indicando que houve redução no gasto metabólico. Esse mesmo trabalho hipotetizou que a liberação das secreções é controlada, e tal hipótese foi confirmada posteriormente por Fernández-Marín et al. (2006), os quais demonstraram que a taxa de secreção aumenta logo após as operárias entrarem em contato com um patógeno, mas o mesmo não acontece quando o contato é com um material não infeccioso.

O fato de as operárias serem muito próximas geneticamente e de estarem em constante contato entre si faz com que o risco de transmissão de doenças seja bastante alto nos ninhos. Apesar disso, viver em grupos apresenta vantagens, pois indivíduos conspecíficos podem cuidar uns dos outros e estimular comportamentos de defesa em seus companheiros; é a chamada imunidade social (FELDHAAR; GROSS, 2008). Operárias submetidas a uma suspensão de esporos de *M. anisopliae* apresentaram maior taxa de sobrevivência quando na presença de companheiras de ninho, seja por aumento na taxa de *grooming* ou por maior liberação de secreções das glândulas metapleurais (HUGHES; EILENBERG; BOOMSMA, 2002). Konrad et al. (2012) demonstraram que operárias expostas a patógenos são capazes de gerar o que chamaram de imunização ativa da colônia: após o contato daquelas com operárias sadias, as companheiras saudáveis apresentaram maior capacidade de inibição de patógenos e, quando infectadas, as infecções mostravam-se pouco efetivas. Em *Camponotus pennsylvanicus*, a trofalaxia mostrou ser um importante componente da imunidade social, ajudando a elevar a resistência das colônias a doenças (HAMILTON; LEJEUNE; ROSENGAUS, 2011).

Cuidado com o lixo também pode ser considerado comportamento relacionado à defesa. Composto por fragmentos secos de folhas, fungo simbionte exaurido e larvas, pupas e operárias mortas (LACERDA; DELLA LUCIA; DE SOUZA, 2011), a deposição destes materiais em áreas afastadas do jardim de fungo é importante para evitar contaminações e manter a higiene da colônia, uma vez que no lixo podem ser encontradas várias espécies de patógenos, como *F. oxysporum*, *A. flavus*, *Trichoderma harzianum* (RODRIGUES et al., 2005) e *M. anisopliae* (HUGHES et al., 2004) além do micoparasita *Escovopsis* sp. (BOT et al., 2001). Foi demonstrado que, em *Acromyrmex lobicornis* (BALLARI; FARJI-BRENER; TADEY, 2007) e em *Atta cephalotes* (HART; RATNIEKS, 2001), as operárias que trabalham no lixo executam apenas essa função e não penetram em outras regiões da colônia, estando sujeitas a agressão por parte das companheiras. Entretanto, posterior trabalho de Lacerda et al. (2014), com *Atta sexdens*, mostrou que o fato de uma operária estar contaminada não é motivo suficiente para sua exclusão do ninho ou para que haja agressão por parte de suas companheiras.

#### **1.4 - Actinomicetos**

Além das formas mencionadas na seção anterior, outra possibilidade de defesa baseia-se na relação simbiótica com actinomicetos (bactérias filamentosas do Filo

Actinobacteria) produtoras de substâncias antimicrobianas (CURRIE et al., 1999). Estes autores observaram os actinomicetos formando uma camada esbranquiçada no tegumento de operárias e os identificaram como pertencentes ao gênero *Streptomyces*. Análises filogenéticas posteriores reclassificaram-nos dentro do gênero *Pseudonocardia* (CAFARO; CURRIE, 2005).

Cavidades denominadas fôveas são encontradas nos tegumentos de várias espécies de cortadeiras e suportam o crescimento dos actinomicetos. Ductos ligam as fôveas a glândulas exócrinas localizadas logo abaixo da superfície da cutícula, as quais são provavelmente responsáveis por produzir secreções nutritivas para o crescimento das bactérias filamentosas (CURRIE et al., 2006). Dângelo (2011), porém, não encontrou nenhuma estrutura semelhante em três espécies de *Acromyrmex* e hipotetizou que as glândulas liberam suas secreções diretamente no tegumento.

Currie et al. (1999) propuseram que os actinomicetos são transmitidos verticalmente, através da cutícula das futuras rainhas. Além de considerar esta forma de transmissão, estudo posterior de Kost et al. (2007) encontrou mais de uma cepa de actinomicetos em uma mesma colônia, obtendo resultados condizentes com a existência de transmissão horizontal, com aquisições das bactérias filamentosas a partir do solo ou de outras colônias. Este último trabalho ainda sugere argumentos contrários à hipótese da coevolução entre os actinomicetos e o micoparásita *Escovopsis*, uma vez que as linhagens de bactérias filamentosas utilizadas no estudo não foram capazes de inibir *Escovopsis* em alguns casos e porque elas podem ser encontradas em formigas não pertencentes à tribo Attini. Análises filogenéticas feitas por Mueller et al. (2008) revelaram que muitas cepas encontradas no ambiente são semelhantes àquelas do trabalho, propondo que existe no tegumento das cortadeiras uma comunidade bacteriana na qual *Pseudonocardia* predomina.

A partir do que foi dito, os objetivos gerais deste trabalho são: 1) verificar se as linhagens de actinomicetos presentes em *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e *Acromyrmex subterraneus molestans* auxiliam na proteção dessas cortadeiras contra os fungos entomopatogênicos *Aspergillus ochraceus* e *Metarhizium anisopliae*; 2) avaliar a resposta imune de operárias de *Ac. subterraneus subterraneus* e *Ac. subterraneus molestans* através da taxa de encapsulação, após aplicação de suspensões de esporos dos fungos *A. ochraceus* e *M. anisopliae*.



Os objetivos específicos são:

1) verificar a mortalidade e avaliar a taxa de encapsulação resultantes da aplicação tópica de *A. ochraceus* e *M. anisopliae* em operárias externas ao jardim de fungo que não apresentam camada visível de bactérias recobrando o corpo, em operárias do jardim de fungo que não apresentam camada visível de bactérias recobrando o corpo e em operárias do jardim de fungo que apresentam camada visível de bactérias recobrando o corpo;

2) comparar as mortalidades e as taxas de encapsulação dos três grupos, de modo a avaliar qual deles é o mais afetado pelas aplicações das suspensões de esporos e relacionar isto com a presença de actinomicetos e com a eficiência do sistema imune.

## 2 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALLARI, S.; FARJI-BRENER, A. G.; TADEY, M. Waste management in the leaf-cutting ant *Acromyrmex lobicornis*: division of labour, aggressive behaviour, and location of external refuse dumps. **Journal of Insect Behavior**, v. 20, n. 1, p. 87–98, 2007.
- BOT, A. N. M. et al. Waste management in leaf-cutting ants. **Ethology Ecology & Evolution**, v. 13, n. 3, p. 225–237, 2001.
- BOT, A. N. M. et al. Variable sensitivity of fungi and bacteria to compounds produced by the metapleural glands of leaf-cutting ants. **Insectes Sociaux**, v. 49, n. 4, p. 363–370, 2002.
- BUENO, O. C.; BUENO, F. C. Plantas inseticidas: perspectivas de uso no controle de formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Editora UFV, 2011. p. 359–372.
- CURRIE, C. R. et al. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, v. 398, n. 6729, p. 701–704, 1999.
- CURRIE, C. R. Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. **Oecologia**, v. 128, n. 1, p. 99–106, 2001.
- CURRIE, C. R. et al. Coevolved crypts and exocrine glands support mutualistic bacteria in fungus-growing ants. **Science**, v. 311, n. 5757, p. 81–83, 2006.
- CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 14, p. 7998–8002, 1999.
- CURRIE, C. R.; STUART, A. E. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. **Proceedings of The Royal Society B: Biological Sciences**, v. 268, n. 1471, p. 1033–1039, 2001.
- DÂNGELO, R. A. C. **Actinomicetos e fungos simbiotes: implicações para formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* MAYR, 1865**. 2011. 76 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.
- DELABIE, J. H. C. et al. Distribuição das formigas-cortadeiras dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta* no Novo Mundo. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Editora UFV, 2011. p. 80–101.
- DELLA LUCIA, T. M. C. Hormigas de importancia económica en la región Neotropical. In: FERNÁNDEZ, F. (Ed.). **Introducción a las hormigas de la región Neotropical**. Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, 2003. p. 337–349.
- DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Editora UFV, 2011.

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

FELDHAAR, H.; GROSS, R. Immune reactions of insects on bacterial pathogens and mutualists. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 9, p. 1082–1088, 2008.

FERNÁNDEZ-MARÍN, H. et al. Active use of the metapleural glands by ants in controlling fungal infection. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 273, n. 1594, p. 1689–1695, 2006.

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

HAMILTON, C.; LEJEUNE, B. T.; ROSENGAUS, R. B. Trophallaxis and prophylaxis: social immunity in the carpenter ant *Camponotus pennsylvanicus*. **Biology Letters**, v. 7, n. 1, p. 89–92, 2011.

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

HUGHES, W. O. H. et al. Diversity of entomopathogenic fungi near leaf-cutting ant nests in a neotropical forest, with particular reference to *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 85, n. 1, p. 46–53, 2004.

HUGHES, W. O. H.; EILENBERG, J.; BOOMSMA, J. J. Trade-offs in group living: transmission and disease resistance in leaf-cutting ants. **Proceedings of The Royal Society B: Biological Sciences**, v. 269, n. 1502, p. 1811–1819, 2002.

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

KONRAD, M. et al. Social transfer of pathogenic fungus promotes active immunisation in ant colonies. **PLoS Biology**, v. 10, n. 4, p. e1001300, 2012.

KOST, C. et al. Non-specific association between filamentous bacteria and fungus-growing ants. **Die Naturwissenschaften**, v. 94, n. 10, p. 821–828, 2007.

LACERDA, F. G. et al. Social interactions between fungus garden and external workers of *Atta sexdens* (Linnaeus) (Hymenoptera: Formicidae). **Italian Journal of Zoology**, n. May, p. 1–6, 2014.

LACERDA, F. G.; DELLA LUCIA, T. M. C.; DE SOUZA, D. J. Biologia comportamental das operárias do lixo das colônias de formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Editora UFV, 2011. p. 226–235.

MAYHÉ-NUNES, A. J. **Estudo de *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae) com ocorrência constatada no Brasil: subsídios para uma análise filogenética**. 1991. 122

- f. Tese (Doutorado em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1991.
- MUELLER, U. G. et al. Coevolution between attine ants and actinomycete bacteria: a reevaluation. **Evolution**, v. 62, n. 11, p. 2894–2912, 2008.
- NORTH, R. D.; JACKSON, C. W.; HOWSE, P. E. Evolutionary aspects of ant-fungus interactions in leaf-cutting ants. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 12, n. 10, p. 386–389, 1997.
- POULSEN, M. et al. Experimental evidence for the costs and hygienic significance of the antibiotic metapleural gland secretion in leaf-cutting ants. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 52, n. 2, p. 151–157, 2002.
- QUINLAN, R. J.; CHERRETT, J. M. Studies on the role of the infrabuccal pocket of the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hym., Formicidae). **Insectes Sociaux**, v. 25, n. 3, p. 237–245, 1978.
- RODRIGUES, A. et al. Variability of non-mutualistic filamentous fungi associated with *Atta sexdens rubropilosa* nests. **Folia Microbiologica**, v. 50, n. 5, p. 421–425, 2005.
- RODRIGUES, A. et al. Microfungal “weeds” in the leafcutter ant symbiosis. **Microbial Ecology**, v. 56, n. 4, p. 604–614, 2008.
- SOSA-CALVO, J. et al. *Cyatta abscondita*: taxonomy, evolution, and natural history of a new fungus-farming ant genus from Brazil. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e80498, 2013.
- STRAND, M. R. The insect cellular immune response. **Insect Science**, v. 15, n. 1, p. 1–14, 2008.
- TRAGUST, S. et al. Ants disinfect fungus-exposed brood by oral uptake and spread of their poison. **Current Biology**, v. 23, n. 1, p. 76–82, 2013.
- WEBER, N. A. Fungus-growing ants: a symbiotic relationship exists between an insect and a plant, involving an effective culturing technique. **Science (New York, N.Y.)**, v. 153, n. August, p. 587–604, 1966.

## CAPÍTULO I

### Mortalidade resultante da aplicação tópica de suspensões de fungos entomopatogênicos em formigas-cortadeiras

#### RESUMO

Métodos alternativos de controle de formigas-cortadeiras vêm sendo estudados, uma vez que muitos produtos utilizados atualmente são tóxicos ao ambiente. O controle biológico através de fungos entomopatogênicos é uma dessas alternativas. Porém, a simbiose das cortadeiras do gênero *Acromyrmex* com os actinomicetos pode dificultar a utilização dos micoparasitas. O objetivo deste capítulo foi verificar se as linhagens de actinomicetos em *Ac. subterraneus subterraneus* e *Ac. subterraneus molestans* protegeriam as operárias contra os fungos *Aspergillus ochraceus* e *Metarhizium anisopliae*. Suspensões de esporos das duas espécies de micoparasitas foram preparadas e aplicadas topicamente em três grupos de operárias (externas ao jardim de fungo, operárias do jardim sem camada visível de actinomicetos e operárias do jardim com camada visível de actinomicetos). As formigas foram isoladas em placas de Petri e foram avaliadas durante 10 dias. Verificou-se que as suspensões foram capazes de causar mortalidade nas formigas. Quando foram comparadas as mortalidades em cada grupo de operárias, os resultados variaram de acordo com a espécie de fungo e com a subespécie de cortadeira. Também houve variação nos resultados quando os efeitos das suspensões de esporos foram comparados entre si. Concluiu-se que os actinomicetos protegeram as operárias contra *M. anisopliae*, mas não contra *A. ochraceus*.

## **Mortality resulting from topical application of spore suspensions of entomopathogenic fungi in leaf-cutting ants**

### **ABSTRACT**

Alternative methods to control leaf-cutting ants have been studied, since many products currently being used are toxic to the environment. Biological control using entomopathogenic fungi is one of these alternatives. However, the symbiosis of the ants of the genus *Acromyrmex* with actinomycetes may difficult the use of a parasitic fungi. The objective of this chapter was to verify if the strains of actinomycetes of *Ac. subterraneus subterraneus* and *Ac. subterraneus molestans* would protect workers against the fungi *Aspergillus ochraceus* and *Metarhizium anisopliae*. Spore suspensions of both fungi species were prepared and applied topically to three groups of workers (to those outside the fungus garden, to workers inside the fungus garden without visible actinomycetes covering their bodies, and to workers inside the fungus garden with visible actinomycetes covering their bodies). The ants were then isolated in Petri dishes and evaluated during 10 days. It was found that the suspensions were capable of causing mortality to the ants. When the mortalities in each group of workers were compared, the results varied according to the species of fungus and with the subspecies of ants. There was also variation on the results when the effects of spore suspensions were compared with each other. It was concluded that the actinomycetes protected the workers against *M. anisopliae*, but not against *A. ochraceus*.

## 1 - INTRODUÇÃO

As cortadeiras *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e *Ac. subterraneus molestans* são bastante comuns na região de Viçosa (MG), e já foram relatados muitos ataques dessas formigas a espécies florestais (ARNHOLD, MAGISTRALI & ANJOS, 2013). O prejuízo econômico causado por essas subespécies e pelas outras espécies de cortadeiras, devido à destruição de culturas como eucalipto e cana-de-açúcar (DELLA LUCIA, 2011), levou ao desenvolvimento de diversas estratégias para controle destes insetos. A principal delas é a utilização de iscas granuladas tóxicas. Seu princípio ativo era o dodecacloro, porém, como a utilização de clorados foi proibida no Brasil em 1993, a sulfluramida passou a ser o ingrediente mais utilizado (OLIVEIRA et al., 2011). Estes autores também citam o uso de pós secos e termonebulizadores como técnicas de controle químico.

O emprego de produtos sintéticos aumentou consideravelmente a partir da década de 1950. Apesar da rápida eficiência no controle, eles são bastante tóxicos e agressivos ao ambiente, por isso métodos alternativos de controle vêm sendo buscados, como, por exemplo, o uso de extratos de plantas inseticidas (BUENO; BUENO, 2011).

Outra alternativa que vem sendo pesquisada é a utilização de fungos entomopatogênicos. Esses parasitas infectam seus hospedeiros penetrando-os através da cutícula e os levam à morte após reproduzirem-se na hemocele, onde se aproveitam de nutrientes ou produzem toxinas (HAJEK; ST. LEGER, 1994). Aqueles pertencentes ao gênero *Aspergillus* são frequentemente encontrados em ninhos de cortadeiras (DÂNGELO, 2011; HUGHES et al., 2004; POULSEN; HUGHES; BOOMSMA, 2006; RODRIGUES et al., 2005, 2008) e podem causar doenças tanto em plantas quanto em animais, geralmente infectando-os quando estão debilitados (ST. LEGER; SCREEN; SHAMS-PIRZADEH, 2000). Estes autores demonstraram que, com *A. flavus*, a infecção começa de forma lenta, de modo que o sistema imune do inseto consegue, por meio de fagocitose, conter grande quantidade de esporos. Porém, muitos esporos fagocitados são capazes de germinar e destruir os hemócitos, formando hifas em até 24h após a infecção e matando o hospedeiro. Os parasitas pertencentes ao gênero *Metarhizium*, por sua vez, são entomopatógenos generalistas, comumente encontrados no solo próximo a colônias de cortadeiras ou em seus depósitos de lixo (HUGHES et al., 2004). Sua ocorrência nos jardins de fungos dos ninhos é mais difícil, devido aos mecanismos de defesa das formigas, mas, em colônias debilitadas, a presença pode ser mais frequente (RODRIGUES et al., 2005). A infecção de *M. anisopliae* é facilitada por meio de um

grupo de proteínas conhecidas como destruxinas, capazes de interferir em respostas imunológicas celulares (HUXHAM; LACKIE; MCCORKINDALE, 1989; VEY; MATHA; DUMAS, 2002).

Couceiro et al. (2013) aplicaram suspensão de esporos de *A. ochraceus* (concentração:  $10^6$  conídios/mL) em operárias de *Ac. subterraneus subterraneus* e não encontraram diferenças entre testemunhas e tratamentos. De forma a dar continuidade à pesquisa dos referidos autores, o presente trabalho foi realizado de forma semelhante àquele, mas utilizando suspensões de esporos com maior concentração ( $5 \times 10^6$  conídios/mL). Com isso, espera-se obter resultados mais promissores, que possibilitem continuar as pesquisas de controle biológico com fungos entomopatogênicos.

As diversas formas de defesa das cortadeiras, porém, dificultam a utilização de fungos como agentes biológicos de controle. Em formigas do gênero *Acromyrmex*, essa dificuldade aumenta devido à presença dos actinomicetos sobre o corpo das operárias. Trabalho de Oh et al. (2009) identificou que o principal composto inibidor liberado pelas bactérias filamentosas é a dentigerumicina. Esta substância, juntamente com outras, são importantes no combate ao micoparasita *Escovopsis*, e isso tornou-se evidente em um trabalho que demonstrou que, em colônias infectadas, a abundância de actinomicetos aumenta, e aquelas com operárias com as bactérias perdem menos biomassa de fungo (CURRIE; BOT; BOOMSMA, 2003). Além disso, estes autores relataram grande quantidade de operárias jardineiras recobertas com os micro-organismos simbiotes, enquanto as forrageadoras possuíam pouca ou nenhuma cobertura. Apesar destes fatos, foi demonstrado que *Pseudonocardia* também inibe outras espécies de fungos e que nem toda linhagem das bactérias é capaz de inibir *Escovopsis* (SEN et al., 2009).

O objetivo deste capítulo é: verificar se as linhagens de actinomicetos presentes em *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e *Acromyrmex subterraneus molestans* auxiliam na proteção dessas formigas-cortadeiras contra os fungos entomopatogênicos *Aspergillus ochraceus* e *Metarhizium anisopliae*, comparando três grupos de operárias (EXT: operárias externas ao jardim de fungo; ISA: operárias internas ao jardim de fungo e sem camada visível de actinomicetos; ICA: operárias internas ao jardim de fungo, com camada visível de actinomicetos), após aplicação de suspensões de esporos destes fungos. A hipótese nula ( $H_0$ ) considera que, após as aplicações das suspensões: i) a testemunha e cada tratamento apresentarão mortalidades iguais estatisticamente; ii) os três grupos de operárias terão mortalidades semelhantes; iii) as suspensões de esporos de fungos levarão a taxas de mortalidade similares. A hipótese alternativa ( $H_1$ ) considera que, após as



aplicações das suspensões: i) testemunha e tratamento serão estatisticamente diferentes; ii) o grupo EXT apresentará as maiores mortalidades, o grupo ICA apresentará as menores e o grupo ISA deverá ser intermediário entre os outros dois grupos; iii) o fungo *Metarhizium anisopliae* resultará em maiores taxas de mortalidade, comparado ao fungo *Aspergillus ochraceus*; essa hipótese baseia-se nos resultados de Hughes & Boomsma (2003) e Yek et al. (2012), cujos resultados mostraram que fungos do gênero *Metarhizium* são mais eficientes em causar mortalidade em operárias, comparados àqueles do gênero *Aspergillus*.

## 2 - METODOLOGIA

### 2.1 - Preparação das suspensões de esporos

O fungo *Aspergillus ochraceus* foi obtido a partir de operárias coletadas em trilhas de forrageamento no *campus* da Universidade Federal de Viçosa (UFV). As formigas foram individualizadas em placas de Petri e avaliadas diariamente até que morressem; após a morte, elas passaram por um processo de lavagem seriada para desinfecção, com álcool 70%, hipoclorito de sódio 2% e água destilada, secas em papel filtro esterilizado, colocadas em tubos Eppendorf autoclavados com algodão úmido em água destilada e mantidas em câmara bioclimatizada a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . Quando ocorreu extrusão do fungo *A. ochraceus*, este foi repicado em meio de cultura BDA até a obtenção de colônias puras. O fungo *Metarhizium anisopliae* foi isolado a partir de solo de café cultivado em sistema agroflorestal no município de Araponga (MG), sendo cedido pelo Laboratório de Interações Inseto-Microrganismos; ambas as culturas foram conservadas em câmara bioclimatizada a  $25^\circ\text{C}$ . Suspensões contendo 50 mL de água destilada e 25  $\mu\text{L}$  de Tween 80 (espalhante) foram preparadas, e 2 mL desta foram aplicados em uma placa de Petri contendo o entomopatógeno com abundância de esporos, utilizando-se uma pipeta de 1000  $\mu\text{L}$ . A superfície do material foi raspada com uma alça de Drigalski. O material foi então filtrado com gaze e a suspensão obtida foi colocada em um béquer. Acrescentou-se à mistura uma gota de Tween 80 para evitar agregação dos esporos e 50 mL de água destilada para diluição. Todo o processo ocorreu em uma câmara de fluxo laminar. Uma alíquota do material foi colocada em uma câmara de Neubauer para a contagem dos conídios, de modo a obter a concentração de  $5 \times 10^6$  conídios/mL. Adicionou-se, progressivamente, 25 mL de água destilada, até que fosse atingida a concentração desejada, caso não fosse obtida na primeira contagem. A concentração foi escolhida com base nos resultados de Ribeiro et al. (2012) e Couceiro et al. (2013).

### 2.2 - Colônias e operárias de cortadeiras

Foram utilizadas sete colônias de *Ac. subterraneus subterraneus* e sete de *Ac. subterraneus molestans*, acondicionadas no Insetário da Universidade Federal de Viçosa, em salas com temperatura  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade  $70 \pm 10\%$ . Diariamente, elas foram alimentadas com folhas de *Acalypha wilkesiana* Müll.Arg.

As operárias coletadas foram divididas em três grupos: operárias externas ao jardim de fungo que não apresentam camada visível de actinomicetos recobrimdo o corpo (EXT); operárias internas ao jardim de fungo que não apresentam camada visível de

actinomicetos recobrando o corpo (ISA); e operárias internas ao jardim de fungo que apresentam camada visível de actinomicetos recobrando o corpo (ICA) (figura 1).



Foto: Danival José de Souza

**Figura 1 - Operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. À direita, indivíduo com o corpo sem revestimento de actinomicetos (EXT e ISA); à esquerda, indivíduo com o revestimento de actinomicetos (ICA).**

### **2.3 - Procedimento experimental**

O procedimento utilizado foi baseado nos trabalhos de Ribeiro et al. (2012) e Couceiro et al. (2013). Foram coletadas 24 formigas por colônia e por grupo em cada subespécie: 12 receberam a solução testemunha (solução de 0,05% de Tween 80 em água destilada) e 12 receberam a suspensão com conídios. Em câmara de fluxo laminar, utilizando microseringas, aplicou-se 1  $\mu$ L das suspensões no tórax das operárias. Após a aplicação, os insetos foram individualizados em placas de Petri com duas perfurações na parte superior, onde foram colocados dois tubos plásticos com algodão, um com água destilada e outro com água destilada e mel, para alimentação das operárias. A fim de evitar dessecação das formigas, as placas foram seladas com *parafilm*. Avaliou-se a mortalidade das operárias diariamente por dez dias. As operárias mortas passaram por lavagem seriada para desinfecção e foram colocadas em tubos Eppendorf autoclavados com algodão úmido em água destilada. Por dez dias, os tubos foram armazenados em câmara bioclimatizada a fim de verificar a extrusão do fungo, confirmando então se a

morte foi causada pelo entomopatógeno. Cada colônia foi tratada como uma repetição. A fim de se verificar se havia diferenças entre as curvas de sobrevivência dos grupos que receberam o tratamento, foram feitas análises aos pares.

#### **2.4 - Análise estatística**

As curvas de sobrevivência foram obtidas comparando múltiplas amostras pelo teste de Kaplan-Meier. Comparações entre os pares de grupos foram feitas através do teste não paramétrico Log-Rank. O nível de significância para ambos os casos foi 5%, e o programa utilizado foi o StatSoft Statistica 10 Enterprise.

### **3 - RESULTADOS**

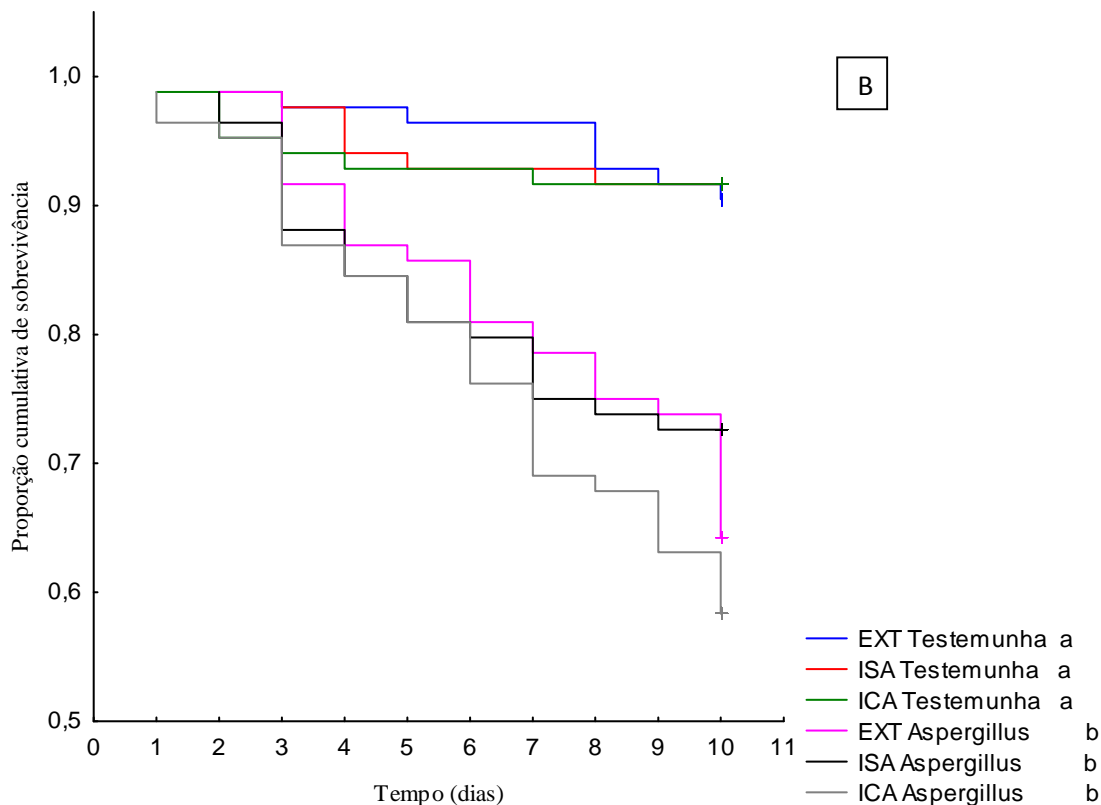
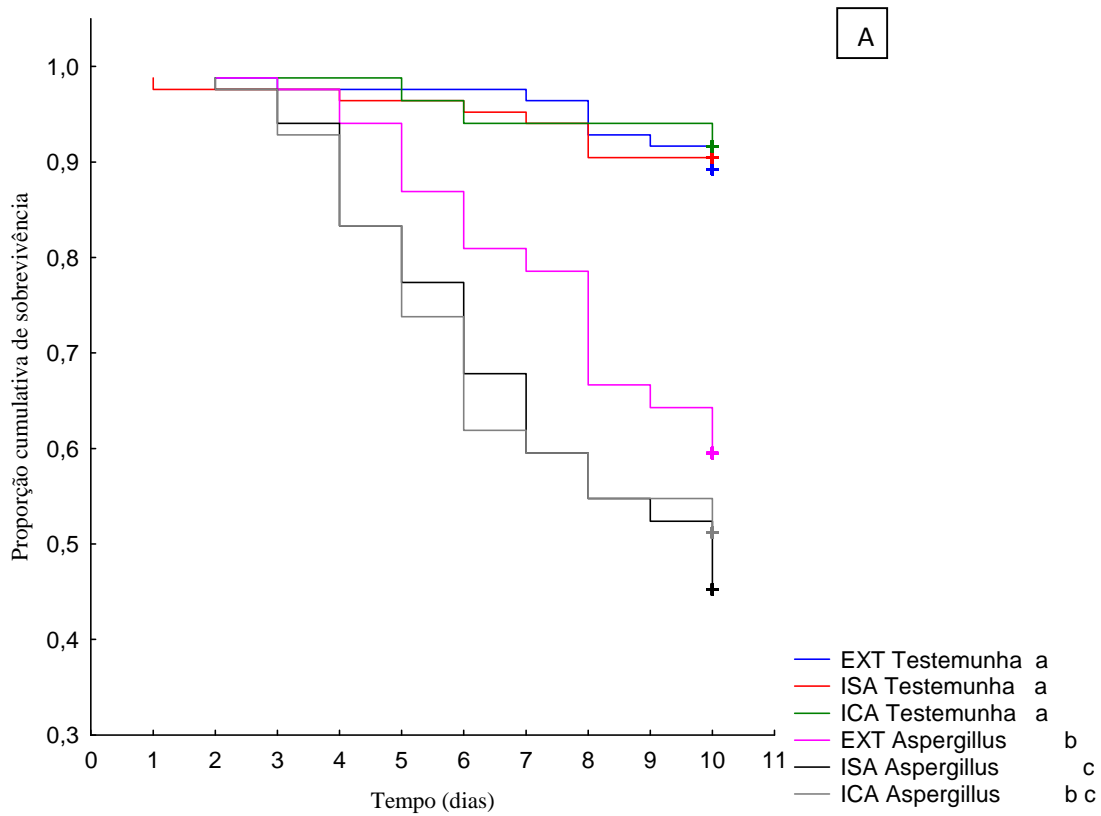
#### **3.1 - Testes de mortalidade com *Aspergillus ochraceus***

##### **3.1.1 - Aplicação em *Acromyrmex subterraneus subterraneus***

Não houve diferença entre as mortalidades das colônias, por isso todas as operárias foram agrupadas como pertencentes a uma única colônia ( $n = 504$ ,  $P < 0,001$ ). A aplicação da suspensão de esporos resultou em diferença entre a testemunha e o tratamento ( $\chi^2 = 95,762$ ; G.L. = 5;  $P < 0,001$ ), indicando que *A. ochraceus* é capaz de causar mortalidade em operárias dos três grupos de *Ac. subterraneus subterraneus*. As comparações aos pares mostraram diferença apenas entre EXT e ISA ( $P = 0,038$ ), ao passo que não houve diferença entre EXT e ICA ( $P = 0,129$ ) e ISA e ICA ( $P = 0,632$ ) (figura 2A).

##### **3.1.2 - Aplicação em *Acromyrmex subterraneus molestans***

As mortalidades das colônias não diferiram entre si, assim as operárias foram agrupadas da mesma forma feita para a outra subespécie ( $n = 504$ ,  $P < 0,001$ ). Também houve diferença entre o tratamento e a testemunha ( $\chi^2 = 51,283$ ; G.L. = 5;  $P < 0,001$ ) em operárias de *Ac. subterraneus molestans*, indicando que o fungo foi capaz de causar mortalidade nas operárias. Os grupos que receberam os tratamentos, comparados aos pares, resultaram em diferenças não significativas (entre EXT e ISA:  $P = 0,376$ ; entre EXT e ICA:  $P = 0,344$ ; entre ISA e ICA:  $P = 0,080$ ) (figura 2B).



**Figura 2 - Proporção cumulativa de sobrevivência (Kaplan-Meier) de operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (A) e *Acromyrmex subterraneus molestans* (B), após aplicação da suspensão de conídios de *Aspergillus ochraceus*, no decorrer dos dias entre todos os tratamentos estudados (legendas seguidas por letras diferentes representam diferença estatística pelo teste Log-Rank, a 5% de probabilidade)**

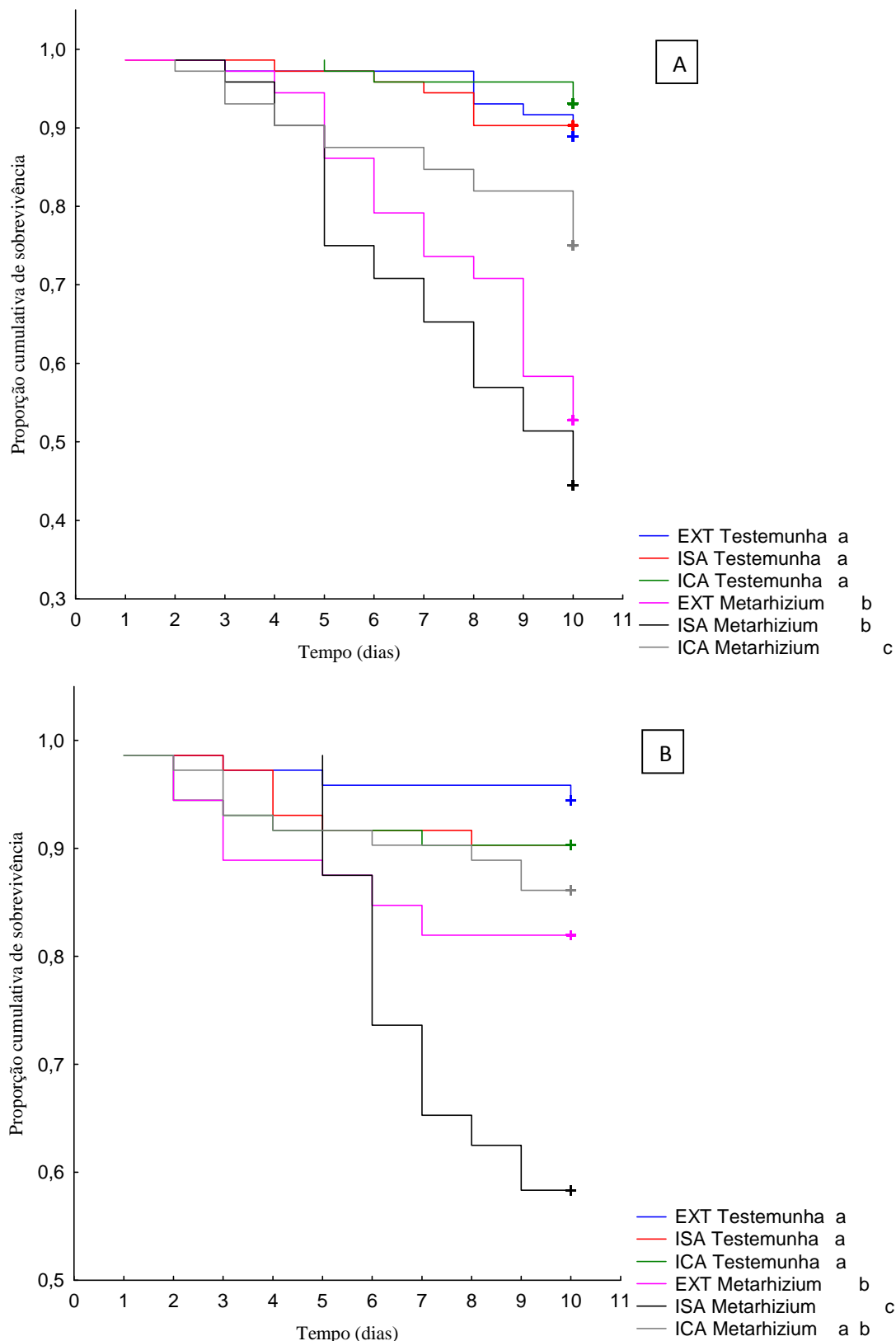
## **3.2 - Testes de mortalidade com *Metarhizium anisopliae***

### **3.2.1 - Aplicação em *Acromyrmex subterraneus subterraneus***

As operárias desta subespécie foram agrupadas como companheiras de ninho, pois não houve diferença de sobrevivência entre as colônias ( $n = 504$ ,  $P < 0,001$ ). A aplicação do fungo *M. anisopliae* também resultou em menor sobrevivência dos três grupos de operárias de *Ac. subterraneus subterraneus* em relação aos grupos de testemunhas ( $\chi^2 = 79,636$ ; G.L. = 5;  $P < 0,001$ ). As análises feitas entre os pares de grupos tratamento não apontaram diferença entre EXT e ISA ( $P = 0,228$ ), ao contrário do ocorrido entre EXT e ICA ( $P = 0,008$ ) e ISA e ICA ( $P < 0,001$ ), indicando que os actinomicetos protegeram as operárias do grupo ICA de *Ac. subterraneus molestans* contra o fungo *M. anisopliae* (figura 3A).

### **3.2.2 - Aplicação em *Acromyrmex subterraneus molestans***

Não houve diferença de mortalidades entre as colônias, resultando no agrupamento das operárias ( $n = 504$ ,  $P < 0,001$ ). Houve diferença entre testemunha e tratamento ( $\chi^2 = 37,772$ ; G.L. = 5;  $P < 0,001$ ). Assim como *A. ochraceus*, *M. anisopliae* foi capaz de levar as operárias à mortalidade (figura 3B). As comparações entre duplas de grupos tratamento mostraram diferença entre EXT e ISA ( $P = 0,005$ ) e entre ISA e ICA ( $P < 0,001$ ); entretanto, EXT e ICA ( $P = 0,477$ ) não diferiram entre si. Nesta subespécie, o tratamento ICA não diferiu de nenhuma das testemunhas ( $P = 0,092$  em relação a EXT;  $P = 0,439$  em relação a ISA;  $P = 0,469$  em relação a ICA).



**Figura 3 - Proporção cumulativa de sobrevivência (Kaplan-Meier) de operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (A) e *Acromyrmex subterraneus molestans* (B), após aplicação da suspensão de *Metarhizium anisopliae*, no decorrer dos dias entre todos os tratamentos estudados (legendas seguidas por letras diferentes representam diferença estatística pelo teste Log-Rank, a 5% de probabilidade)**



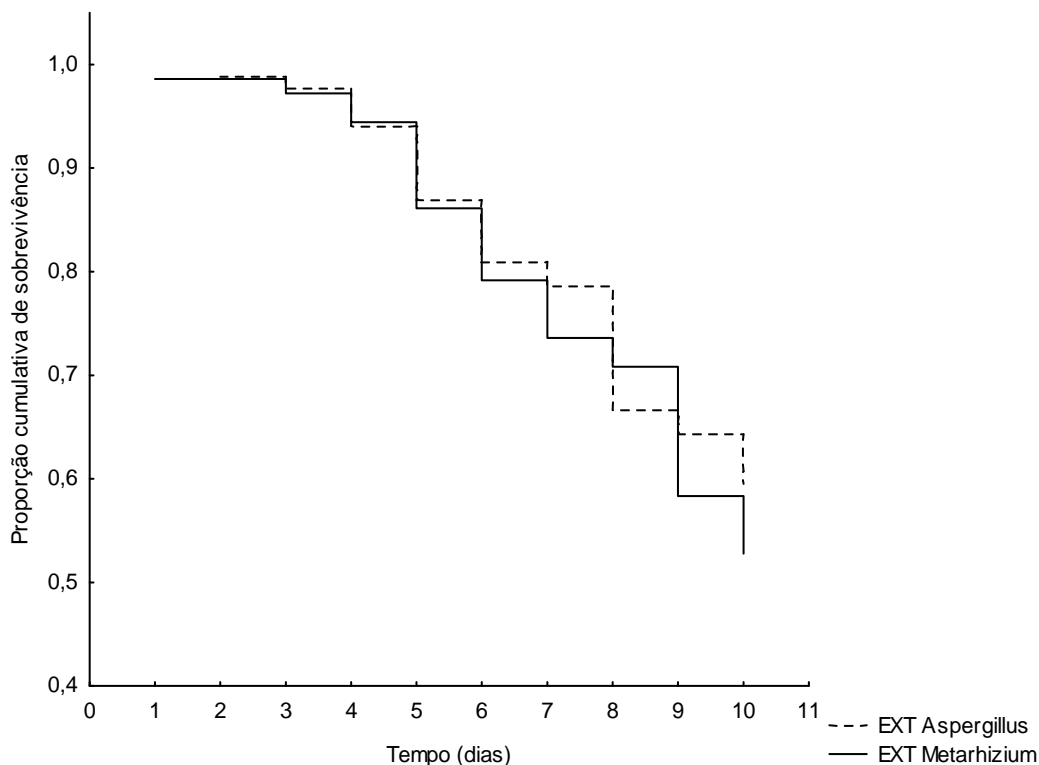
### 3.3 Comparações entre os efeitos das suspensões de esporos

#### 3.3.1 *Acromyrmex subterraneus subterraneus*

A aplicação das suspensões de esporos não resultou em diferenças significativas quando foram comparados seus efeitos nos grupos EXT ( $P = 0,466$ ; figura 4) e ISA ( $P = 0,936$ ; figura 5A), porém os grupos ICA diferiram entre si ( $P = 0,001$ ; figura 5B), indicando que as espécies de fungos resultaram em mortalidades diferentes apenas entre os grupos de operárias com actinomicetos.

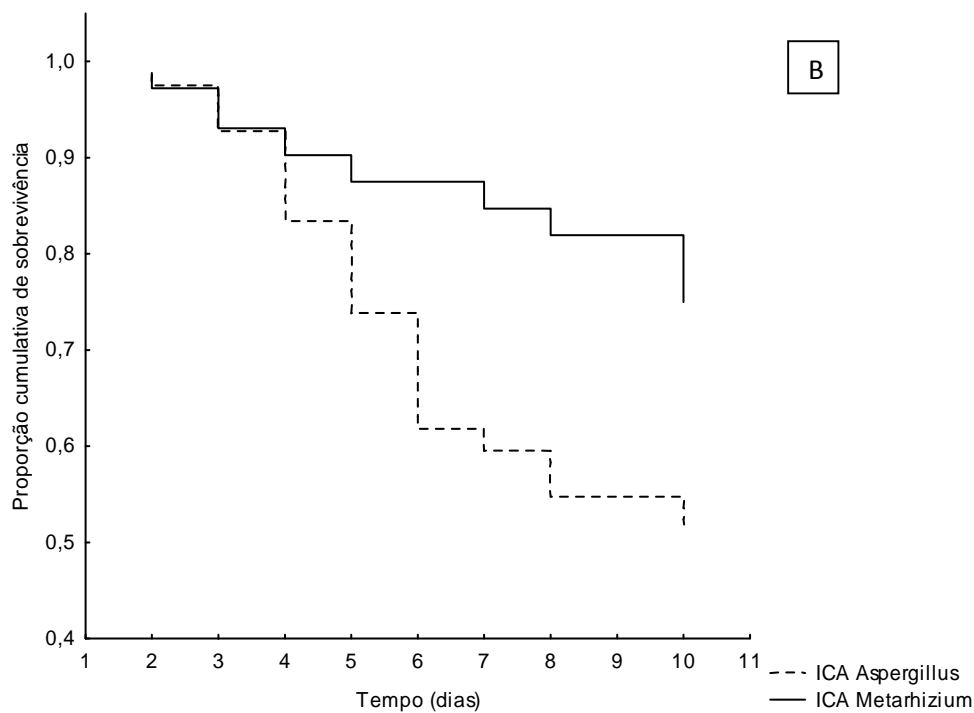
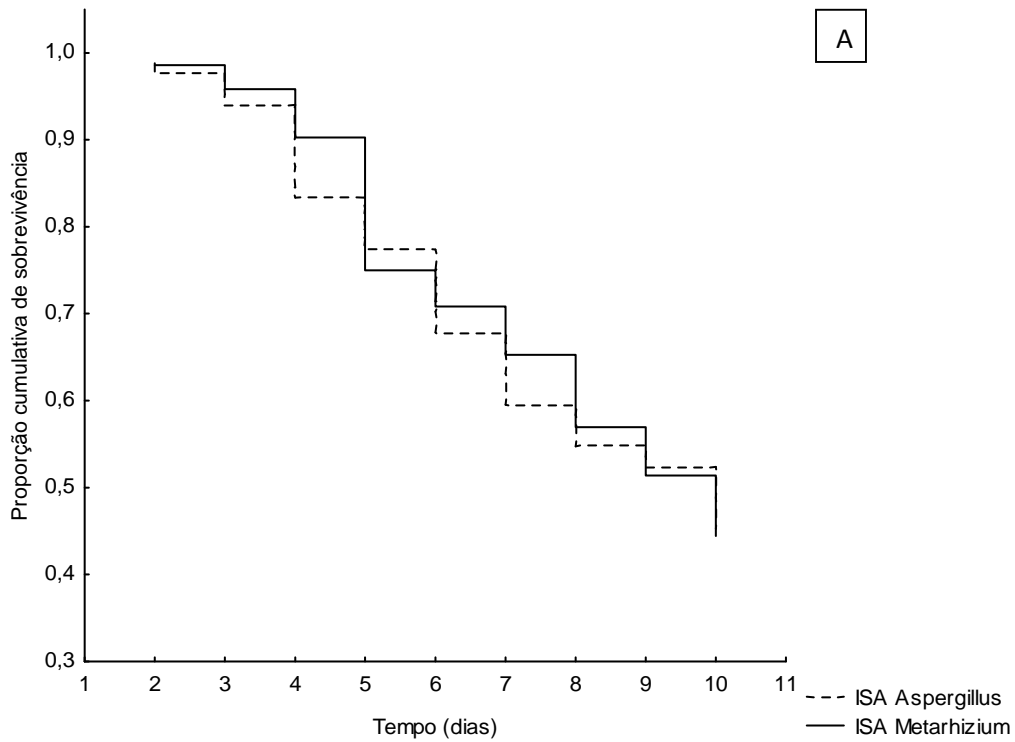
#### 3.3.2 - *Acromyrmex subterraneus molestans*

Não houve diferença significativa entre os grupos ISA ( $P = 0,145$ ; figura 7A), enquanto os grupos EXT ( $P = 0,027$ ; figura 6) e ICA ( $P < 0,001$ ; figura 7B) demonstraram ser estatisticamente diferentes. Isso indica que as suspensões de esporos causaram efeitos semelhantes apenas nas operárias internas sem camada visível de actinomicetos (ISA).



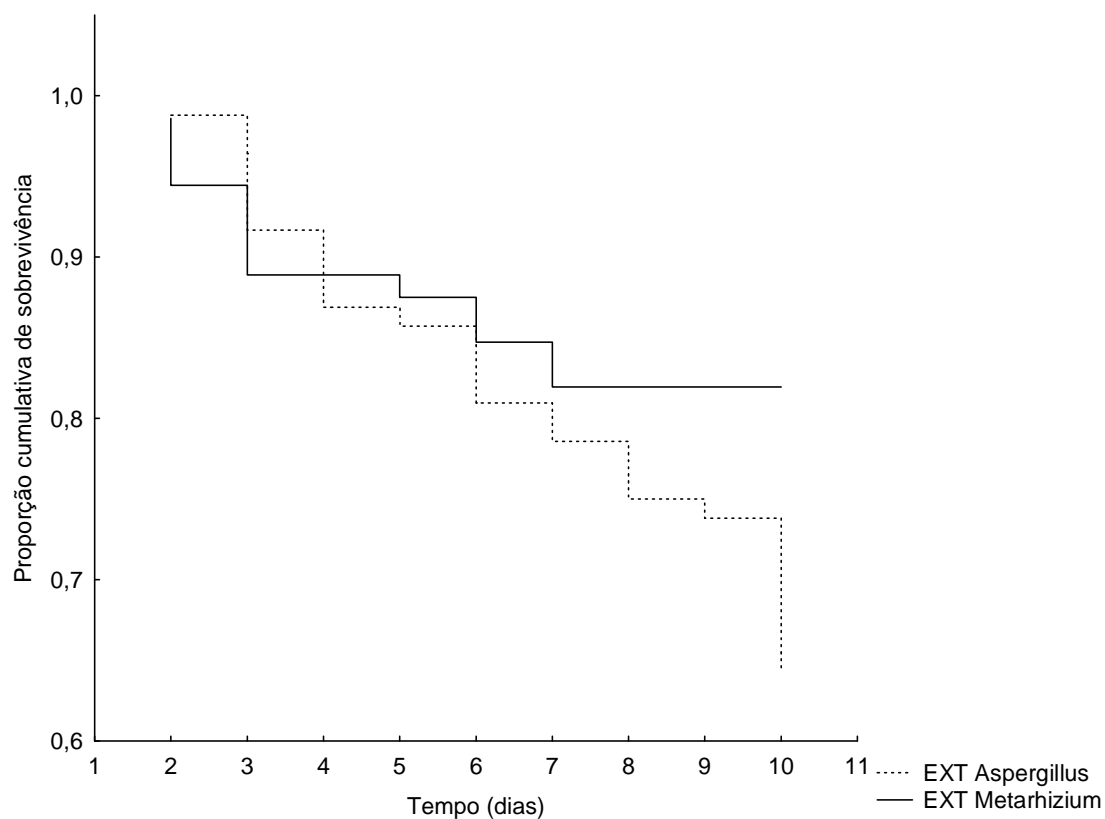
**Figura 4 - Proporção cumulativa de sobrevivência (Kaplan-Meier) entre os grupos EXT de operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, após aplicação das suspensões de esporos de *Aspergillus ochraceus* e *Metarhizium anisopliae*, no decorrer dos dias ( $P = 0,466$ )**

**EXT Aspergillus = suspensão de *A. ochraceus* aplicada no grupo EXT**  
**EXT Metarhizium = suspensão de *M. anisopliae* aplicada no grupo EXT**



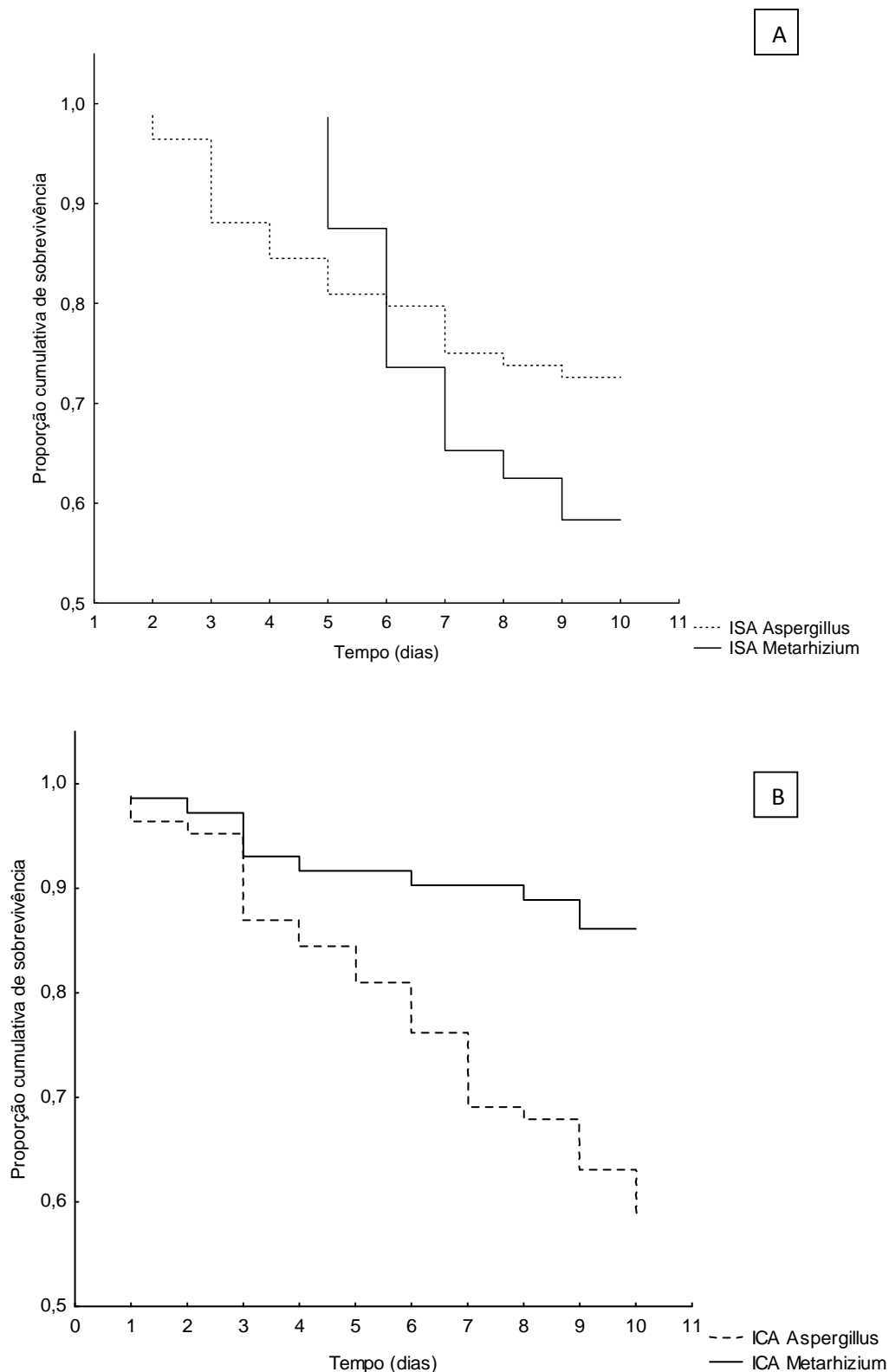
**Figura 5 - Proporção cumulativa de sobrevivência (Kaplan-Meier) para os grupos ISA (A) e ICA (B) de operárias *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, após aplicação das suspensões de esporos de *Aspergillus ochraceus* e *Metarhizium anisopliae*, no decorrer dos dias ( $P = 0,936$  para ISA;  $P = 0,001$  para ICA)**

ISA Aspergillus = suspensão de *A. ochraceus* aplicada no grupo ISA  
 ISA Metarhizium = suspensão de *M. anisopliae* aplicada no grupo ISA  
 ICA Aspergillus = suspensão de *A. ochraceus* aplicada no grupo ICA  
 ICA Metarhizium = suspensão de *M. anisopliae* aplicada no grupo ICA



**Figura 6 - Proporção cumulativa de sobrevivência (Kaplan-Meier) entre os grupos EXT de operárias de *Acromyrmex subterraneus molestans*, após aplicação das suspensões de esporos de *Aspergillus ochraceus* e *Metarhizium anisopliae*, no decorrer dos dias ( $P = 0,027$ )**

**EXT Aspergillus = suspensão de *A. ochraceus* aplicada no grupo EXT**  
**EXT Metarhizium = suspensão de *M. anisopliae* aplicada no grupo EXT**



**Figura 7 - Proporção cumulativa de sobrevivência (Kaplan-Meier) para os grupos ISA (A) e ICA (B) de operárias de *Acromyrmex subterraneus molestans*, após aplicação das suspensões de esporos de *Aspergillus ochraceus* e *Metarhizium anisopliae*, no decorrer dos dias ( $P = 0,145$  para ISA;  $P < 0,001$  para ICA).**

**ISA Aspergillus = suspensão de *A. ochraceus* aplicada no grupo ISA**  
**ISA Metarhizium = suspensão de *M. anisopliae* aplicada no grupo ISA**  
**ICA Aspergillus = suspensão de *A. ochraceus* aplicada no grupo ICA**  
**ICA Metarhizium = suspensão de *M. anisopliae* aplicada no grupo ICA**

#### 4 - DISCUSSÃO

Quando o fungo *Metarhizium anisopliae* foi aplicado em *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, a hipótese H1 foi confirmada, indicando que os actinomicetos tiveram papel importante na defesa desta subespécie de cortadeiras contra a espécie do fungo entomopatogênico. A aplicação de *M. anisopliae* em *Ac. subterraneus molestans* mostrou que os actinomicetos só foram relevantes quando se comparam operárias internas ao jardim de fungo. Ainda, o grupo ICA foi estatisticamente igual às três testemunhas, indicando que os actinomicetos ajudaram a proteger as operárias contra os patógenos. A suspensão de *Aspergillus ochraceus* aplicada em ambas as subespécies resultou em diferença não significativa em quase todas as comparações aos pares; a exceção foi entre EXT e ISA em *Ac. subterraneus subterraneus*. Pode-se inferir, dessa forma, que a presença das bactérias filamentosas não foi relevante na defesa contra *A. ochraceus*. Em trabalho semelhante com *Ac. subterraneus subterraneus* e suspensão de *A. ochraceus* (concentração:  $10^6$  conídios/mL), Couceiro et al. (2013) encontraram diferença entre EXT e ICA; ao mesmo tempo, não houve diferença entre ISA e ICA, ambos compostos por operárias do jardim de fungo, determinando que a presença das bactérias filamentosas era fator a ser considerado na defesa apenas quando se comparava operárias externas com internas ao fungo simbiote.

Utilizando *A. ochraceus*, houve diferença entre testemunha e tratamento, tanto para *Ac. subterraneus subterraneus* quanto para *Ac. subterraneus molestans*, ou seja, os patógenos foram capazes de causar mortalidade nas operárias. Trabalhando com este patógeno, Couceiro et al. (2013) não encontraram diferença entre os dois grupos. Um dos prováveis motivos é a diferença entre as concentrações utilizadas nos estudos: a atual foi cinco vezes maior. Ribeiro et al. (2012) aplicaram suspensão de *A. ochraceus* em operárias de *Atta bisphaerica* em concentrações variando de  $10^5$  a  $10^9$ , e apenas aquelas acima de  $10^7$  diferiram da testemunha, mostrando-se capazes de causar mortalidade e de poderem ser usadas como potenciais agentes de controle biológico. Hughes & Boomsma (2003) fizeram procedimento semelhante com *A. flavus* em concentrações de  $10^4$  a  $10^7$ , e a única que mostrou-se eficaz em causar mortalidade foi esta última.

A aplicação de *M. anisopliae* também levou a diferenças entre testemunha e tratamento, para ambas as subespécies de cortadeiras. Este resultado confirmou a hipótese H1, uma vez que esta espécie de fungo é considerada bastante virulenta e parasita grande número de formigas (HUGHES et al., 2004). Em trabalho semelhante, utilizando *M. brunneum* (concentração:  $10^7$  conídios/mL), Yek et al. (2012) igualmente encontraram

grande diferença entre testemunha e tratamentos, confirmando o potencial do parasita em causar mortalidade. A aplicação de *Beauveria bassiana*, outra espécie bastante virulenta e parasita de insetos, em operárias de *Atta bisphaerica*, na concentração de  $10^6$  conídios/mL, também resultou em diferença estatística com a testemunha em estudo de Ribeiro et al. (2012). Castilho et al. (2010), utilizando *B. bassiana* e *M. anisopliae* (concentrações:  $10^8$  conídios/mL), encontraram isolados capazes de, 72h após a aplicação, causar mortalidade superior a 50% dos indivíduos. Vale ressaltar que, em experimentos visando ao controle de formigas em campo, concentrações muito altas não seriam ideais porque resultam em rápida mortalidade dos indivíduos, até mesmo na trilha durante o forrageamento, e acabam sendo descartadas pelas operárias, tornando-se ineficazes (DELLA LUCIA, 2011)

As comparações entre as suspensões de esporos mostraram que apenas os grupos ICA foram diferentes (em ambas subespécies), e nos dois casos o fungo *M. anisopliae* causou menor taxa de mortalidade que *A. ochraceus*, rejeitando a hipótese de que *M. anisopliae* é mais prejudicial às formigas do que *A. ochraceus*. Ao aplicar suspensões de *A. niger* e *M. brunneum* em *Ac. octospinosus*, Yek et al. (2012) demonstraram que *M. brunneum* foi mais efetivo em causar mortalidade nas operárias. Hughes & Boomsma (2003) aplicaram suspensões de esporos de *A. flavus* e *M. anisopliae* (concentrações:  $10^4$ - $10^7$  esporos/mL para o primeiro e  $10^5$  esporos/mL para o segundo) em *Ac. echinator*, e também encontraram diferenças entre as espécies, comparando as concentrações equivalentes; houve diferentes taxas de mortalidade de operárias, com *A. flavus* causando menor número de formigas mortas, mostrando-se menos eficiente que *M. anisopliae*. Ambos os trabalhos confirmam o fato de que o gênero *Metarhizium* é mais virulento. Uma provável explicação para o presente trabalho não confirmar totalmente a hipótese H1 diz respeito à virulência dos parasitas, ou seja, a capacidade de causar doenças. Proteínas e metabólitos tóxicos são importantes nesse processo (HAJEK; ST. LEGER, 1994); dessa forma, fatores como temperatura, umidade ou o material genético da cepa podem afetar essa habilidade de infecção. Castilho et al. (2010) reportaram patogenicidades diferentes para os isolados de *M. anisopliae* e *Beauveria bassiana* em seu trabalho. Sendo assim, é possível que a linhagem de *Metarhizium* utilizada aqui estivesse menos virulenta e/ou a de *Aspergillus* estivesse mais virulenta.

Algumas diferenças em relação às mortalidades dos grupos podem ser destacadas. Em determinadas colônias, as operárias externas ao jardim de fungo morreram em menor quantidade, enquanto aquelas com actinomicetos morreram em maior número. Isso pode

ser devido a uma maior esclerotização da cutícula nas operárias externas: estas formigas estão mais sujeitas à ação de patógenos e suas enzimas; estas proteínas, quando em atividade muito alta, podem desencadear maior esclerotização no organismo parasitado, resultando em maior capacidade de defesa do hospedeiro (ORTIZ-URQUIZA; KEYHANI, 2013). As glândulas metapleurais também podem estar envolvidas nessa menor mortalidade: Lacerda et al. (2010), em trabalho com *Atta sexdens rubropilosa*, encontraram menor volume desses órgãos em operárias do jardim de fungo, enquanto operárias lixeiras e operárias externas apresentaram tendência a ter maiores volumes; o mesmo pode valer para *Acromyrmex*.

Ainda sobre as glândulas metapleurais, Bot et al. (2002) concluíram que os compostos liberados por esses órgãos podem ter suas concentrações modificadas, dependendo do grau da infecção. Os resultados de Yek et al. (2012), por sua vez, mostraram que as glândulas metapleurais de operárias infectadas por fungos mais virulentos produzem maior quantidade de secreção e são mais eficientes em impedir os esporos de germinarem. Com isso, pode-se destacar a grande importância desses órgãos glandulares na defesa das operárias que não possuem actinomicetos. Essa importância parece ser maior ainda para as operárias externas ao jardim de fungo, quando comparadas às internas sem as bactérias filamentosas, pois, nos dois casos em que os grupos EXT e ISA diferiram significativamente, as operárias do primeiro grupo morreram em menor quantidade.

Dângelo (2011) realizou testes de inibição em placa de Petri utilizando *A. ochraceus* (entre outras espécies de fungos) e cinco linhagens de *Pseudonocardia*, entre elas, duas advindas das subespécies utilizadas no presente trabalho. Para *Ac. subterraneus subterraneus*, a testemunha teve maior média de crescimento e diferiu estatisticamente do tratamento, indicando que houve formação de halo de inibição, causado pelas substâncias antimicrobianas produzidas pelas bactérias; porém, três colônias desta subespécie mostraram alta mortalidade do grupo ICA, sugerindo que não houve inibição do parasita por parte dos actinomicetos. Em *Ac. subterraneus molestans*, a média de crescimento nas placas não diferiu, e duas colônias tiveram alta mortalidade no grupo ICA. Sabendo que as colônias costumam apresentar resistência diferencial (YEK et al., 2012), que é comum isolados diferentes possuírem patogenicidades diferentes (CASTILHO et al., 2010) e combinando os resultados obtidos aqui com os de Dângelo (2011), podemos inferir que a capacidade de defesa dos actinomicetos contra esta espécie

de entomopatógeno deve variar, de acordo com as resistências diferenciais das colônias, das patogenicidades dos isolados e com as cepas de bactérias filamentosas.

Sabe-se que as operárias alteram seu comportamento quando na presença de patógenos, de forma a se defender. Alguns trabalhos (HUGHES; EILENBERG; BOOMSMA, 2002; YEK; BOOMSMA; SCHIØTT, 2013) demonstraram aumento nas taxas de *self-grooming* e *allogrooming* após suspensões de esporos de entomopatógenos serem aplicadas em grupos de operárias; Fernández-Marín et al. (2006) e Yek et al. (2012) relataram que, em presença de patógenos, as operárias liberam maior quantidade de secreção das glândulas metapleurais. Dessa forma, nos casos em que os grupos apresentaram baixa mortalidade, fatores como os mencionados acima podem ter sido os responsáveis por isso.

As cortadeiras exibem uma grande quantidade de defesas comportamentais e imunológicas, de forma a evitar contaminações na colônia. Sendo assim, o combate utilizando fungos parasitas torna-se difícil em condições de campo, por mais que sejam obtidos resultados satisfatórios em laboratório (CASTILHO et al., 2010). Dessa forma, alguns trabalhos testaram fungos parasitas associados com métodos tradicionais, a fim de contornar estas defesas. Lopez & Orduz (2003) realizaram testes utilizando iscas granuladas juntamente com entomopatógenos e obtiveram resultados promissores. Galvanho et al. (2012), por sua vez, conduziram experimentos associando *B. bassiana* com o inseticida imidaclopride: este neonicotinoide, ao agir no sistema nervoso, altera o comportamento do inseto e leva à redução de atividades como *self-grooming*, permitindo que a infecção se espalhe mais facilmente pela colônia.

É importante que sejam testados outros isolados dos fungos patogênicos. Testes em campo também devem ser realizados, antes de se concluir sobre a possibilidade de uso dos fungos no combate a essas formigas. Ainda, a experimentação em campo possibilitará estudos mais completos sobre o comportamento dos diferentes grupos de operárias e sobre os actinomicetos em seu habitat natural, uma vez que as condições de laboratório comumente diferem das ambientais.



## 5 - CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste capítulo, pôde-se concluir que os actinomicetos protegeram as operárias das duas subespécies de cortadeiras contra *M. anisopliae*, ao passo que não foram relevantes na defesa contra *A. ochraceus*. As diferenças de mortalidade encontradas entre os três grupos de operárias podem ser devido a fatores como virulência das cepas dos entomopatógenos ou à presença dos actinomicetos.

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNHOLD, A.; MAGISTRALI, I. C.; ANJOS, N. Espécies florestais e formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae) em Viçosa, Minas Gerais. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 74, p. 215-219, 2013.
- BUENO, O. C.; BUENO, F. C. Plantas inseticidas: perspectivas de uso no controle de formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Editora UFV, 2011. p. 359–372.
- CASTILHO, A. M. C. et al. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* patogênicos a soldados de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa* em condições de laboratório. **Ciência Rural**, v. 40, n. 6, p. 1243–1249, 2010.
- COUCEIRO, J. C. et al. **Interaction between actinomycete, leaf-cutting ant and entomopathogenic fungus** Anais do XXI Simpósio de Mirmecologia. **Anais...**Fortaleza, CE: 2013
- CURRIE, C. R.; BOT, A. N. M.; BOOMSMA, J. J. Experimental evidence of a tripartite mutualism: bacteria protect ant fungus gardens from specialized parasites. **Oikos**, v. 1, p. 91–102, 2003.
- DÂNGELO, R. A. C. **Actinomicetos e fungos simbiotes: implicações para formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* MAYR, 1865**. 2011. 76 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.
- DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Editora UFV, 2011.
- GALVANHO, J. P.; CARRERA, M. P.; MOREIRA, D. D. O.; ERTHAL JR., M.; SILVA, C. P.; SAMUELS, R. I. Imidacloprid inhibits behavioral defences of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Insect Behavior**, v. 26, n. 1, p. 1-13, 2012.
- HAJEK, A. E.; ST. LEGER, R. J. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 39, p. 293–322, 1994.
- HUGHES, W. O. H. et al. Diversity of entomopathogenic fungi near leaf-cutting ant nests in a neotropical forest, with particular reference to *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 85, n. 1, p. 46–53, 2004.
- HUGHES, W. O. H.; BOOMSMA, J. J. Let your enemy do the work: within-host interactions between two fungal parasites of leaf-cutting ants. **Proceedings of The Royal Society B: Biological Sciences**, v. 271 Suppl, p. S104–106, 2003.
- HUXHAM, I. M.; LACKIE, A. M.; MCCORKINDALE, N. J. Inhibitory effects of cyclodepsipeptides, destruxins, from the fungus *Metarhizium anisopliae*, on cellular immunity in insects. **J Insect Physiol**, v. 35, n. 2, p. 97–105, 1989.

- LOPEZ, E.; ORDUZ, S. *Metarhizium anisopliae* and *Trichoderma viride* for control of nests of the fungus-growing ant, *Atta cephalotes*. **Biological Control**, v. 27, n. 2, p. 194-200, 2003.
- OH, D.-C. et al. Dentigerumycin: a bacterial mediator of an ant-fungus symbiosis. **Nature chemical biology**, v. 5, n. 6, p. 391–393, 2009.
- OLIVEIRA, M. A. et al. Manejo de formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Editora UFV, 2011. p. 400–419.
- POULSEN, M.; HUGHES, W. O. H.; BOOMSMA, J. J. Differential resistance and the importance of antibiotic production in *Acromyrmex echinator* leaf-cutting ant castes towards the entomopathogenic fungus *Aspergillus nomius*. **Insectes Sociaux**, v. 53, n. 3, p. 349–355, 2006.
- RIBEIRO, M. M. R. et al. Diversity of fungi associated with *Atta bisphaerica* (Hymenoptera: Formicidae): the activity of *Aspergillus ochraceus* and *Beauveria bassiana*. **Psyche: A Journal of Entomology**, v. 2012, p. 1–6, 2012.
- RODRIGUES, A. et al. Variability of non-mutualistic filamentous fungi associated with *Atta sexdens rubropilosa* nests. **Folia Microbiologica**, v. 50, n. 5, p. 421–425, 2005.
- RODRIGUES, A. et al. Microfungal “weeds” in the leafcutter ant symbiosis. **Microbial Ecology**, v. 56, n. 4, p. 604–614, 2008.
- SEN, R. et al. Generalized antifungal activity and 454-screening of *Pseudonocardia* and *Amycolatopsis* bacteria in nests of fungus-growing ants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 42, p. 17805–17810, 2009.
- ST. LEGER, R. J.; SCREEN, S. E.; SHAMS-PIRZADEH, B. Lack of Host Specialization in *Aspergillus flavus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 320–324, 2000.
- VEY, A.; MATHA, V.; DUMAS, C. Effects of the peptide mycotoxin destruxin E on insect haemocytes and on dynamics and efficiency of the multicellular immune reaction. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 80, n. 3, p. 177–187, 2002.
- YEK, S. H. et al. Regulation and specificity of antifungal metapleural gland secretion in leaf-cutting ants. **Proceedings of The Royal Society B: Biological Sciences**, v. 279, n. 1745, p. 4215–22, 2012.

## CAPÍTULO II

### Taxa de encapsulação de operárias de formigas-cortadeiras após aplicação tópica de suspensões de fungos entomopatogênicos

#### RESUMO

O sistema imune dos insetos combate patógenos por meio de dois tipos principais de respostas: as humorais e as celulares. Entre estas, destaca-se a encapsulação, através da qual forma-se ao redor do antígeno uma cápsula de hemócitos e/ou melanina que será responsável por neutralizar a ameaça. O objetivo deste capítulo foi avaliar a resposta imune de três grupos de operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e *Acromyrmex subterraneus molestans* (externas ao jardim de fungo, operárias do jardim sem camada visível de actinomicetos e operárias do jardim com camada visível de actinomicetos) por meio da taxa de encapsulação. As operárias foram infectadas com suspensões de esporos de *Aspergillus ochraceus* e *Metarhizium anisopliae* e, após 24h, foi introduzido em seus tórax um filamento de *nylon*, usado como antígeno padrão. Depois de mais 24h, o filamento foi retirado e montado em lâmina, para análise. Verificou-se que *M. anisopliae* causou imunossupressão nos três grupos de operárias, enquanto *A. ochraceus* não obteve o mesmo efeito na maioria dos casos. As operárias externas ao jardim apresentaram as maiores taxas de encapsulação, demonstrando maior eficiência imunológica.

## **Encapsulation rates of workers of leaf-cutting ants after topical application of spore suspensions of entomopathogenic fungi**

### **ABSTRACT**

The immune system of insects combats pathogens by two types of responses: humoral and cellular. Among the latter, there may occur the encapsulation, in which a capsule of hemocytes and/or melanin that will be responsible for neutralizing the threat is formed around the antigen. The objective of this chapter was to evaluate the immunocompetence of three groups of workers of *Acromyrmex subterraneus subterraneus* and *Acromyrmex subterraneus molestans* (those outside the fungus garden, workers inside the fungus garden but without visible actinomycete covering the body, and workers inside the fungus garden with visible actinomycete covering the body) by measuring the encapsulation rate. Workers were infected with spore suspensions of *Aspergillus ochraceus* and *Metarhizium anisopliae* and, after 24h, a nylon filament, used as standard antigen, was introduced in their thorax. After 24 more hours, the filament was removed and mounted in glass slides to be analyzed. It was found that *M. anisopliae* caused immunodepression to the three groups of workers, while *A. ochraceus* did not have the same effect in most of the cases. Workers outside the fungus garden exhibited higher encapsulation rates, showing greater immunological efficiency.

## 1 - INTRODUÇÃO

Em insetos, uma vez que a barreira física imposta pelo exoesqueleto é ultrapassada por um patógeno, o sistema imune é ativado. Ocorre o reconhecimento do invasor, por meio de proteínas de reconhecimento padrão (PRR – do inglês *pattern recognition receptors*) (ROYET; DZIARSKI, 2007); as principais moléculas reconhecidas são peptidoglicanos que compõem a parede celular de bactérias, lipopolissacarídeos encontrados em bactérias Gram-negativas e  $\beta$ -1,3-glicanos na parede celular de fungos (GILLESPIE; KANOST; TRENCZEK, 1997). As respostas humorais são mediadas por peptídeos antimicrobianos produzidos principalmente pelos corpos gordurosos (GILLESPIE; KANOST; TRENCZEK, 1997; ROYET; DZIARSKI, 2007). A produção dessas moléculas dá-se por meio de duas vias de sinalização: a Toll, em resposta a bactérias Gram-positivas e fungos, e a IMD, em resposta a bactérias Gram-negativas (ROYET; DZIARSKI, 2007). Um primeiro tipo de resposta celular a ser mencionado é a fagocitose, através da qual os hemócitos englobam e digerem pequenos patógenos, como bactérias. As células de defesa podem ainda se agregar de forma a englobar grande número de partículas, levando à formação de um nódulo (GILLESPIE; KANOST; TRENCZEK, 1997).

Outra resposta celular possível é a encapsulação. De acordo com estes últimos autores, o processo envolve a formação de uma cápsula com várias camadas de hemócitos e/ou melanina ao redor de partículas de maior tamanho. A melanização inicia-se quando serinas-proteínases reconhecem as PRRs ligadas a seus substratos e então desencadeiam reações em cascata que levarão à ativação da enzima fenoloxidase, culminando com a produção de quinonas e melanina (CERENIUS; SÖDERHÄLL, 2004). Os produtos finais da reação resultam em liberação de radicais livres de oxigênio, os prováveis responsáveis pela morte do parasita (FELDHAAR; GROSS, 2008). Gillespie, Kanost & Trenczek (1997) destacam que os hemócitos são importantes para trabalhos sobre processos imunológicos porque suas ações são visíveis, facilitando o estudo.

O objetivo deste capítulo é avaliar a resposta imune de operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e *Acromyrmex subterraneus molestans* através da taxa de encapsulação, comparando três grupos de operárias e verificando se a presença de actinomicetos influenciará na capacidade de defesa. A hipótese nula (H0) considera que, após a aplicação das suspensões de esporos e da inserção do microfilamento: i) testemunha e tratamento apresentarão taxas de encapsulação semelhantes; ii) os três grupos de operárias resultarão em taxas de encapsulação estatisticamente iguais. A

hipótese alternativa (H1) considera que, após as aplicações das suspensões e da inserção do microfilamento: i) testemunha e tratamento serão estatisticamente diferentes; ii) o grupo EXT apresentará as maiores taxas de encapsulação, o grupo ICA apresentará as menores e o grupo ISA deverá ser intermediário entre os outros dois grupos; essa hipótese baseia-se no fato de que o sistema imune das operárias com revestimento de actinomicetos não necessita ser tão eficiente, uma vez que as bactérias filamentosas devem combater grande parte dos patógenos antes que estes consigam penetrar o exoesqueleto.

## **2 - METODOLOGIA**

### **2.1 - Suspensões de esporos**

As suspensões de esporos foram preparadas da mesma forma como feito no capítulo 1, obtendo-se uma suspensão de esporos de *Aspergillus ochraceus* e outra de *Metarhizium anisopliae*, ambas com concentração de  $5 \times 10^6$  conídios/mL.

### **2.2 - Colônias e operárias de cortadeiras**

As colônias de *Ac. subterraneus subterraneus* e de *Ac. subterraneus molestans* utilizadas foram acondicionadas no Insetário da Universidade Federal de Viçosa, em salas com temperatura  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade  $70 \pm 10\%$ . Diariamente, elas eram alimentadas com folhas de *Acalypha wilkesiana* Müll.Arg.

As operárias coletadas foram divididas em três grupos: operárias externas ao jardim de fungo que não apresentam camada visível de actinomicetos recobrindo o corpo (EXT); operárias internas ao jardim de fungo que não apresentam camada visível de actinomicetos recobrindo o corpo (ISA); e operárias internas ao jardim de fungo que apresentam camada visível de actinomicetos recobrindo o corpo (ICA).

Utilizou-se 50 operárias por grupo em cada subespécie, retiradas de 6 colônias: 25 receberam a testemunha (solução de 0,05% de Tween 80 em água destilada) e 25 receberam a suspensão de conídios. De forma a padronizar o processo, utilizou-se operárias com o mesmo tamanho de cápsula cefálica (~ 2,4 mm).

### **2.3 - Procedimento experimental**

A resposta imune foi medida através da introdução, no tórax das operárias, de um antígeno padronizado, que consiste em um microfilamento de *nylon* (diâmetro: 0,12 mm; comprimento: 1 mm).

As suspensões de conídios de *A. ochraceus* e *M. anisopliae* foram aplicadas nas operárias e, depois de 24h, o microfilamento de *nylon* foi introduzido; as formigas foram então incubadas, por 24 horas, em câmara bioclimatizadora, a  $25^\circ\text{C}$ . Posteriormente, houve a retirada dos microfilamentos e a montagem desses em lâmina, a fim de serem fotografados em microscópio óptico (Olympus BX 50, câmera Olympus QColor 3) e analisados com auxílio do programa Image J®.



#### **2.4 - Análise estatística**

Os valores médios da taxa de encapsulação dos diferentes grupos foram comparados por ANOVA, seguidos da comparação de médias pelo teste de Tukey, adotando  $\alpha = 5\%$ .

### 3 - RESULTADOS

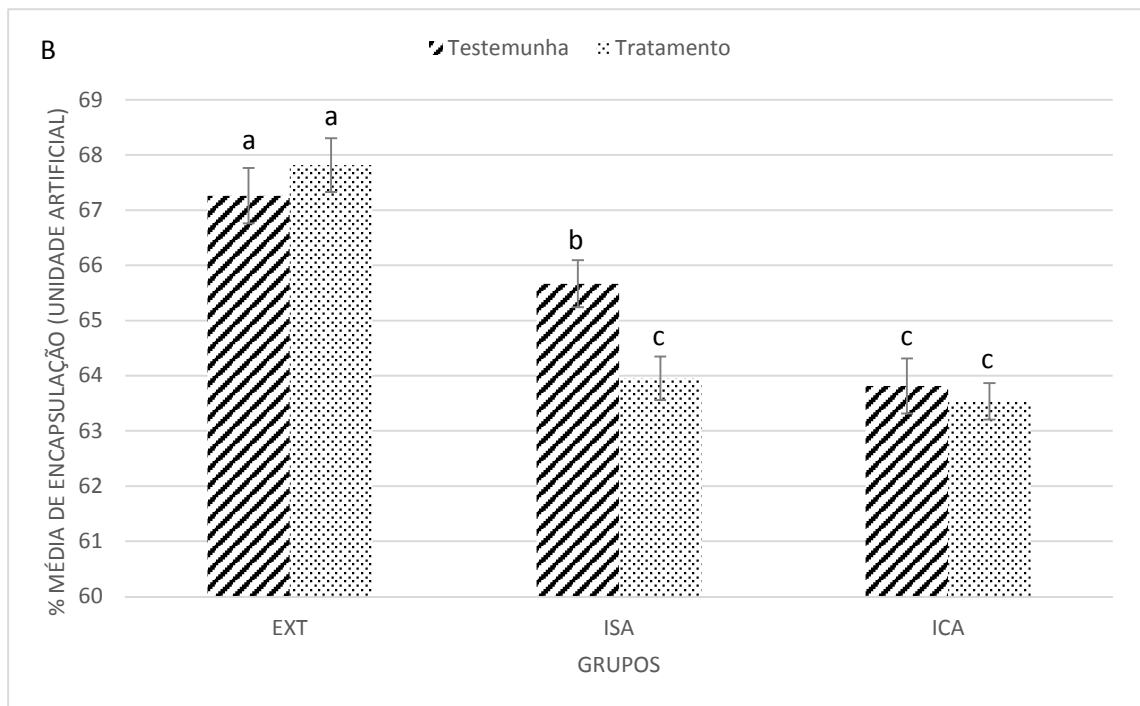
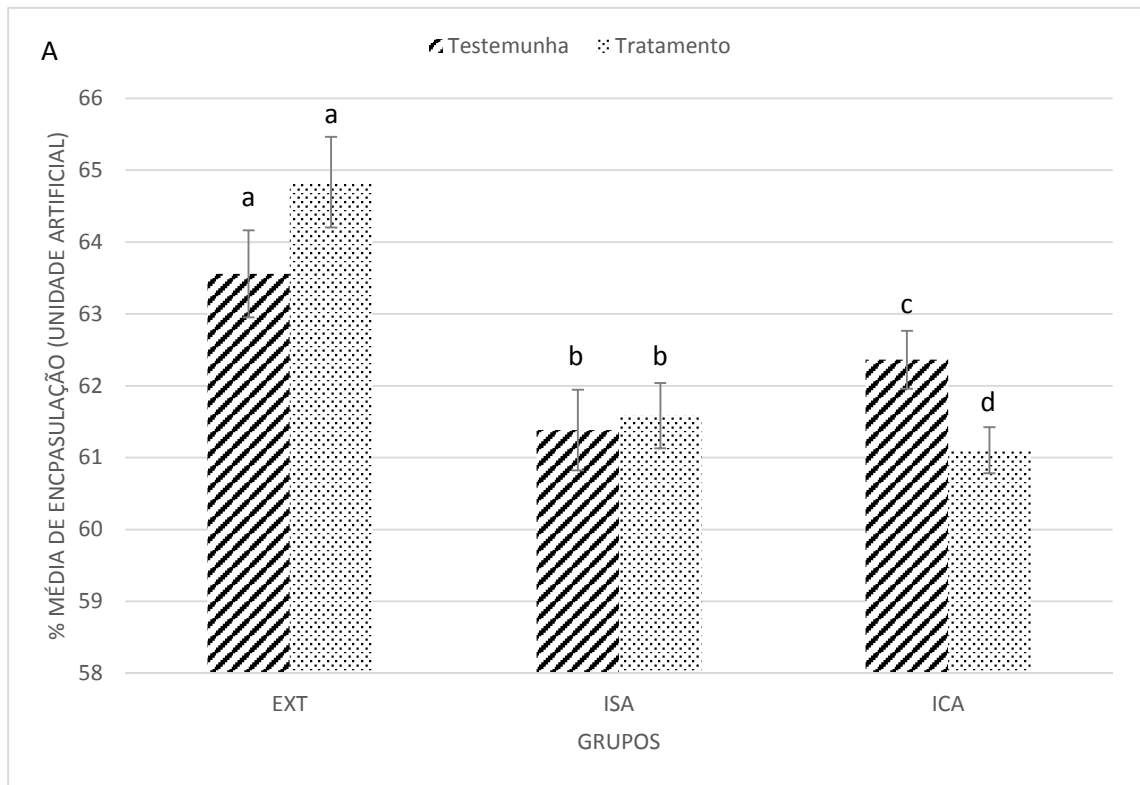
#### 3.1 - Encapsulação de operárias submetidas ao fungo *Aspergillus ochraceus*

##### 3.1.1 - Operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus*

A ANOVA mostrou que houve variação na taxa de encapsulação entre os grupos ( $F_{5,144} = 8,21$ ;  $n = 150$ ;  $P < 0,001$ ). As operárias do grupo EXT que receberam a suspensão de conídios apresentaram maior taxa de encapsulação entre os tratamentos ( $P < 0,001$  em relação a ISA e  $P < 0,001$  em relação a ICA); as companheiras de ninho dos grupos ISA e ICA apresentaram taxas semelhantes que não diferiram significativamente ( $P = 0,391$ ). Quando confrontados com suas respectivas testemunhas, os grupos EXT e ISA não mostraram diferença, ao contrário do grupo ICA, o qual apresentou imunodepressão devido à suspensão de esporos de *A. ochraceus* (EXT:  $P = 0,151$ ; ISA:  $P = 0,783$ ; ICA:  $P = 0,018$ ) (figura 8A).

##### 3.1.2 - Operárias de *Acromyrmex subterraneus molestans*

Neste caso também houve variação entre as taxas de encapsulação ( $F_{5,144} = 17,71$ ;  $n = 150$ ;  $P < 0,001$ ); o tratamento do grupo EXT diferiu estatisticamente dos outros dois grupos ( $P < 0,001$  em relação a ISA e  $P < 0,001$  em relação a ICA), mas os grupos ISA e ICA não diferiram entre si ( $P = 0,420$ ), indicando mais uma vez que as operárias externas ao jardim de fungo possuem sistema imunológico mais eficiente no combate a parasitas. A comparação com as respectivas testemunhas mostrou igualdade para os grupos EXT e ICA (EXT:  $P = 0,429$ ; ISA:  $P = 0,004$ ; ICA:  $P = 0,646$ ), significando que a suspensão de esporos só causou alteração (neste caso, redução) na taxa de encapsulação de operárias do grupo ISA (figura 8B).



**Figura 8 - Porcentagem média de encapsulação entre os diferentes grupos de operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (A) e *Acromyrmex subterraneus molestans* (B), após aplicação de suspensão de esporos de *Aspergillus ochraceus* (barras com letras diferentes representam diferença estatística pelo teste de Tukey, a 5% de significância)**

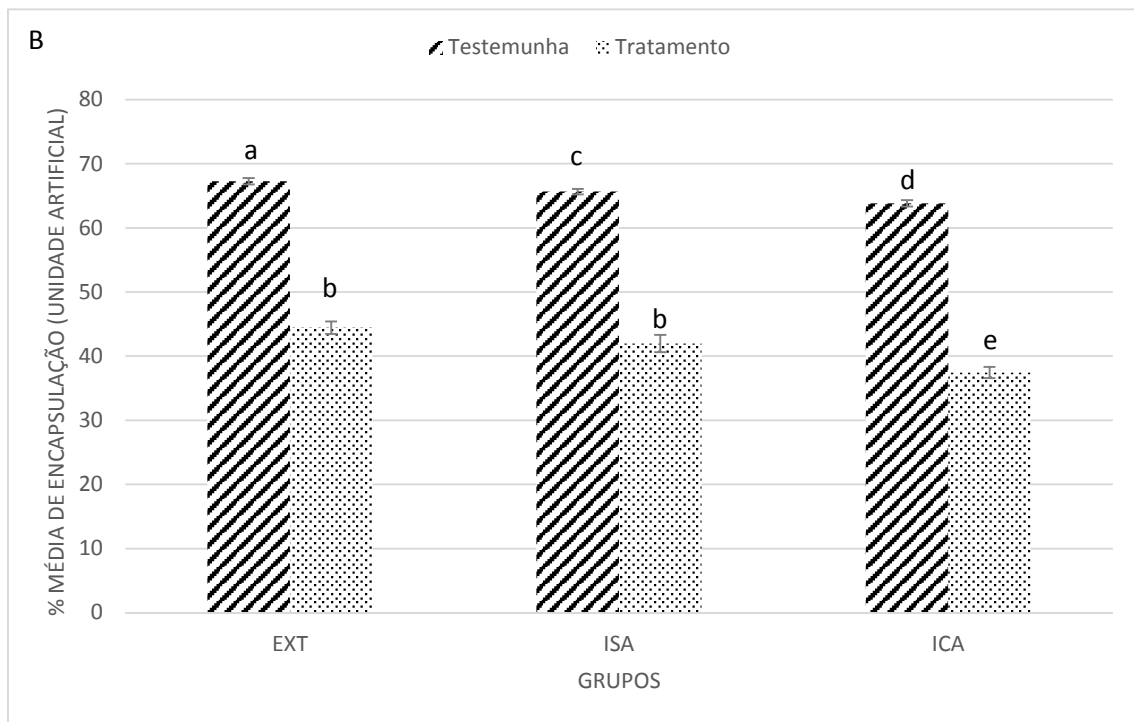
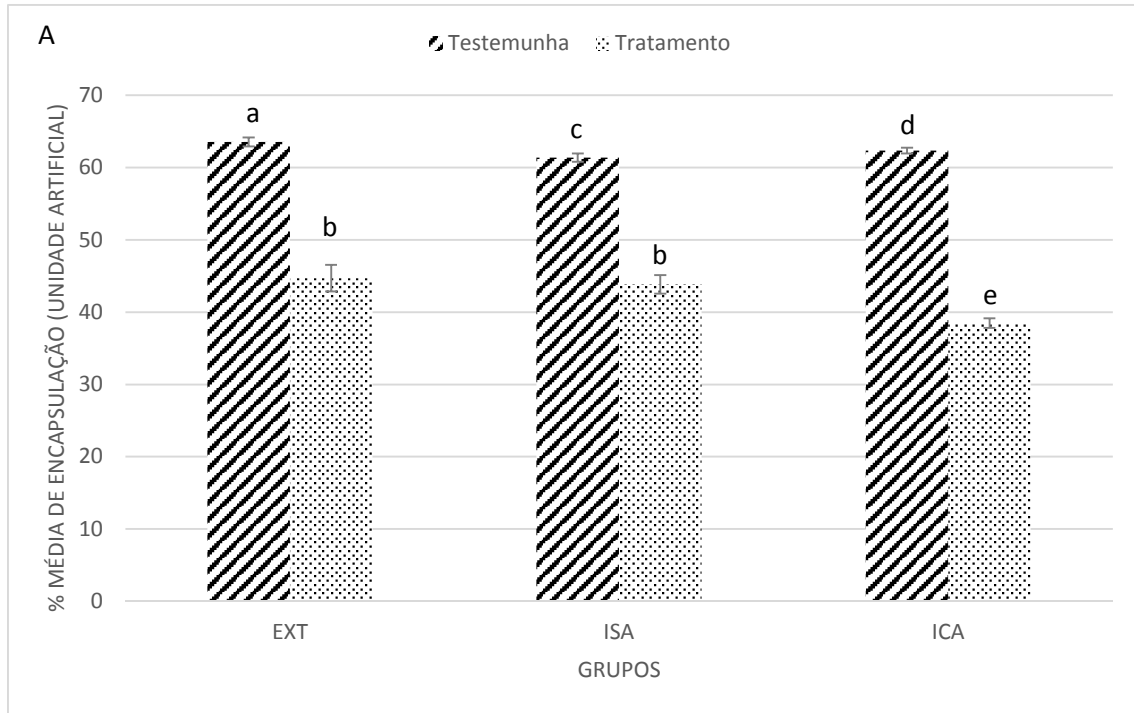
### **3.2 - Encapsulação de operárias submetidas ao fungo *Metarhizium anisopliae***

#### **3.2.1 - Operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus***

A ANOVA indicou diferenças entre as taxas de encapsulação ( $F_{5,144} = 120,56$ ;  $n = 150$ ;  $P < 0,001$ ). Todos os tratamentos apresentaram menor taxa de encapsulação quando comparados com suas testemunhas ( $P < 0,001$ ), significando que a suspensão de esporos de *M. anisopliae* diminuiu as taxas de encapsulações das operárias. Comparados entre si, o grupo EXT não apresentou diferença para com o grupo ISA ( $P = 0,701$ ), ao passo que as comparações entre grupos EXT e ICA ( $P = 0,002$ ), e ISA e ICA ( $P < 0,001$ ) resultou em diferenças significativas. Estes resultados indicam que o sistema imunológico de operárias sem actinomicetos foi mais eficiente no combate ao patógeno utilizado, comparadas às operárias com as bactérias filamentosas (figura 9A).

#### **3.2.2 - Operárias de *Acromyrmex subterraneus molestans***

Neste caso também houve diferença nas taxas de encapsulação dos grupos ( $F_{5,144} = 256,31$ ;  $n = 150$ ;  $P < 0,001$ ). Todos os tratamentos diferiram significativamente das testemunhas ( $P < 0,001$ ), ou seja, a suspensão de esporos de *M. anisopliae* causou alterações no sistema imunológico das operárias. Grupos EXT e ISA foram estatisticamente iguais ( $P = 0,147$ ), e grupos EXT e ICA ( $P < 0,001$ ), e ISA e ICA ( $P = 0,007$ ) apresentaram diferenças entre si, indicando que as operárias com actinomicetos foram menos eficientes no combate aos patógenos, quando comparadas àquelas sem as bactérias filamentosas (figura 9B).



**Figura 9 - Porcentagem média de encapsulação entre os diferentes grupos de operárias de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (A) *Acromyrmex subterraneus molestans* (B), após aplicação de suspensão de esporos de *Metarhizium anisopliae* (barras com letras diferentes representam diferença estatística pelo teste de Tukey, a 5% de significância)**

#### 4 - DISCUSSÃO

Confirmando a hipótese H1, operárias externas ao jardim de fungo apresentaram as maiores taxas de encapsulação, enquanto as internas com actinomicetos tiveram as menores taxas. Uma vez que estão mais expostas a patógenos, os sistemas imunes de operárias do grupo EXT devem ser mais capazes de evitar infecções. Por sua vez, a camada de bactérias filamentosas no tegumento das operárias do grupo ICA possibilita combate ao patógenos antes de estes conseguirem penetrar na hemocele das operárias; dessa forma, o sistema imune dessas formigas não necessita ser tão eficiente quanto das companheiras sem o revestimento, e isso é importante para evitar maiores gastos energéticos pelas operárias, uma vez que a simbiose com os actinomicetos já é custosa metabolicamente (POULSEN et al., 2003). Estes resultados são semelhantes àqueles encontrados por De Souza et al. (2013): menor taxa de encapsulação em operárias com actinomicetos, enquanto os dois grupos sem as bactérias não diferiram entre si. Esses autores concluíram que existe um padrão no qual operárias mais velhas (que realizam trabalhos fora da colônia) têm sistema imunológico mais eficiente que as mais jovens (que realizam trabalhos dentro da colônia), e para estas últimas, a presença dos actinomicetos seria importante enquanto o sistema imunológico não se desenvolve completamente.

Baer et al. (2005) aplicaram suspensão de esporos de *M. anisopliae* (concentração:  $10^7$  esporos/mL) em operárias de *Ac. echinator* e compararam os efeitos da infecção nas taxas de encapsulação. Apenas 96h após a aplicação foi encontrada diferença significativa em relação à testemunha, com os tratamentos apresentando menores médias de encapsulação; os autores argumentam que a redução nessa taxa pode ter ocorrido devido às toxinas liberadas pelo fungo. Estas substâncias, chamadas destruxinas, são capazes de inibir a formação de agregados de hemócitos e as reações da profenoloxidase, suprimindo assim o sistema imune dos insetos e levando a menor capacidade de encapsulação (HUXHAM; LACKIE; MCCORKINDALE, 1989; VEY; MATHA; DUMAS, 2002). Com isso, as menores taxas de encapsulação aqui encontradas, em relação à testemunha, após a aplicação de *M. anisopliae*, podem ser devidas às destruxinas. Os actinomicetos também podem ter sido os responsáveis por isso, uma vez que a camada de bactérias pode ter ajudado a combater os patógenos externamente, impedindo-os de entrar na hemocele; sendo assim, o sistema imune pode ter sido menos estimulado, resultando nas menores taxas de encapsulação.

O fato de que testemunha e tratamento neste estudo não se mostraram diferentes, usando suspensão de *A. ochraceus*, necessita investigação futura, mas pode ser devido à utilização de uma cepa menos potente do entomopatógeno, incapaz de causar maiores efeitos no sistema imune.

Poucos são os estudos que tratam sobre imunidade no gênero *Acromyrmex* e que relacionam técnicas de imunocompetência com a presença dos actinomicetos. Sendo assim, trabalhos realizados nesse contexto são necessários para preencher as numerosas lacunas nessa área e buscar novas perspectivas para o controle dessas pragas agrícolas.

## 5 - CONCLUSÃO

A suspensão de *Metarhizium anisopliae* resultou em queda de imunidade nas duas subespécies de formigas, indicando que o fungo causou imunossupressão nas operárias. A suspensão de *Aspergillus ochraceus* não resultou em efeitos diferentes da testemunha na maioria dos casos, significando que o patógeno não levou a alterações na resposta imune. Ambas as suspensões indicaram que indivíduos externos ao jardim de fungo possuem sistema imunológico mais eficiente em combater parasitas.

As espécies de fungo utilizadas no presente trabalho mostraram ser promissoras como futuros agentes de controle biológico de formigas-cortadeiras, uma vez que foram capazes de causar mortalidade e, na maioria dos casos, causaram imunossupressão nas operárias. O fato de não ter sido encontrado um padrão que relaciona maior capacidade de defesa e presença dos actinomicetos indica que sua importância está mais relacionada à proteção do jardim de fungo.



## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAER, B. et al. Examination of the immune responses of males and workers of the leaf-cutting ant *Acromyrmex echinator* and the effect of infection. **Insectes Sociaux**, v. 52, n. 3, p. 298–303, 2005.

CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 116–126, 2004.

DE SOUZA, D. J. et al. Ectosymbionts and immunity in the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. **Brain, behavior, and immunity**, v. 28, p. 182–187, 2013.

FELDHAAR, H.; GROSS, R. Immune reactions of insects on bacterial pathogens and mutualists. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 9, p. 1082–1088, 2008.

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

HUXHAM, I. M.; LACKIE, A. M.; MCCORKINDALE, N. J. Inhibitory effects of cyclodepsipeptides, destruxins, from the fungus *Metarhizium anisopliae*, on cellular immunity in insects. **J Insect Physiol**, v. 35, n. 2, p. 97–105, 1989.

POULSEN, M. et al. Within-colony transmission and the cost of a mutualistic bacterium in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. **Functional Ecology**, v. 17, n. 2, p. 260–269, 2003.

ROYET, J.; DZIARSKI, R. Peptidoglycan recognition proteins: pleiotropic sensors and effectors of antimicrobial defences. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 264–277, 2007.

VEY, A.; MATHA, V.; DUMAS, C. Effects of the peptide mycotoxin destruxin E on insect haemocytes and on dynamics and efficiency of the multicellular immune reaction. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 80, n. 3, p. 177–187, 2002.