



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE GURUPI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

CYNTHIA LHOVRANA SANTOS SILVA

**PATOGENICIDADE DE *Metarhizium anisopliae* EM COMBINAÇÃO COM
SULFATO DE ZINCO EM OPERÁRIAS DE *Atta sexdens***

GURUPI (TO)

2019

CYNTHIA LHOURLANA SANTOS SILVA

**PATOGENICIDADE DE *Metarhizium anisopliae* EM COMBINAÇÃO COM
SULFATO DE ZINCO EM OPERÁRIAS DE *Atta sexdens***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produção como requisito para à obtenção do grau de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. DSc. Danival José de Souza

GURUPI (TO)
2019

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

S586p Silva, Cynthia Lhourrana.
PATOGENICIDADE DE *Metarhizium anisopliae* EM
COMBINAÇÃO COM SULFATO DE ZINCO EM OPERÁRIAS DE *Atta*
sexdens. / Cynthia Lhourrana Silva. – Gurupi, TO, 2019.
50 f.
Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do
Tocantins – Câmpus Universitário de Gurupi - Curso de Pós-
Graduação (Mestrado) em Produção Vegetal, 2019.
Orientador: Danival José de Souza
1. Formigas-cortadeiras. 2. Imunossupressão . 3. Hemócitos. 4.
Fungos entomopatogênicos. I. Título

CDD 635

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizada 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).

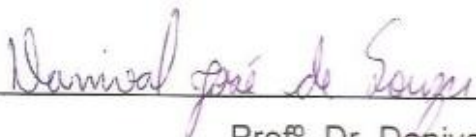
CYNTHIA LHOURLANA SANTOS SILVA

PATOGENICIDADE DE *METARHIZIUM ANISOPLIAE* EM COMBINAÇÃO COM
SULFATO DE ZINCO EM OPERÁRIAS DE *ATTA SEXDENS*

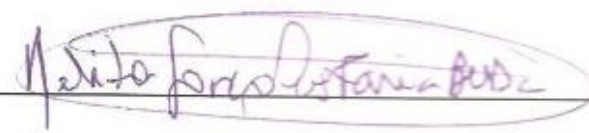
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal do Tocantins. Foi avaliada para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal pelo Orientador e pela Banca examinadora.

Data de Aprovação: 21/01/2019

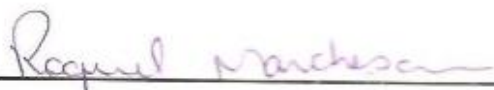
Banca examinadora:



Prof.º Dr. Danival José de Souza
Orientador, UFT



Prof.ª. (a) Dr.ª. Nelita Gonçalves Faria de Bessa
Examinador (a), UNIRG



Prof.ª. Dr.ª. Raquel Marchesan
Examinador (a), UFT

À DEUS onipotente, onipresente e onisciente por ter me dado vida e sabedoria. Aos meus pais Marta dos Santos e José William Leite Silva, minha irmã Fabiana Thays Santos Silva e meu namorado Antônio José dos Santos pela paciência, amor, afeto, dedicação e compreensão para comigo, onde fui lapidada no que sou hoje.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À DEUS toda honra, toda glória, todo louvor e gratidão. Ele é minha inspiração, minha fé e meu destino.

Aos meus pais Marta dos Santos e José William Leite Silva por serem meu alicerce e me apoiarem em todos os momentos. Minha Irmã Fabiana Thays, que não nega esforços para me ajudar.

A meu namorado Antônio José, que esteve sempre presente me auxiliando nesta caminhada e pelo carinho e amor dedicado.

Ao professor Dr. Danival José dos Souza pela orientação, paciência, amizade, dedicação, confiança e seus ensinamentos que foram de grande relevância para realização para deste trabalho e meu crescimento profissional.

Às professoras Dr^{as}. Raquel e Nelita por aceitarem compor minha banca.

Aos amigos de trabalho do laboratório de simbioses insetos-microrganismos Amanda, Marcio, Julner e Mariela que contribuíram para a execução do presente trabalho.

A todos os meus amigos que participaram dessa caminhada pois, se hoje sou o que sou porque cada um contribuiu de alguma forma.

A todos aqueles que, mesmo não tendo sido citados, tanto contribuíram para meu crescimento pessoal e conclusão desta etapa.

À Universidade Federal do Tocantins, pelo apoio institucional e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos e apoio financeiro.

Muito Obrigada !

RESUMO GERAL

Com o objetivo de avaliar a patogenicidade de *Metarhizium anisopliae* em combinação com o ZnSO₄ em operárias de *Atta sexdens*, foram conduzidos três experimentos que foram divididos em dois capítulos. Foram conduzidos no Laboratório de Simbioses Insetos-Microrganismos. O experimento do primeiro capítulo teve o objetivo de avaliar os efeitos do ZnSO₄ como substância imunossupressora em operárias de *A. sexdens*. Adotou-se o delineamento fatorial, com oito repetições (contendo 01 operária por repetição), compreendendo sete doses (0, 0,15, 0,25, 0,50, 1,50, 2,50 e 5,00 g/L) de ZnSO₄ e dois períodos de avaliação (24 e 48 horas). Para cada dose, as repetições foram imersas por 20 segundos, posteriormente cada operária foi individualizada em tubos de ensaio de vidro com algodão umedecido. Após o período de 24 e 48 horas, retirou-se 1 µL de hemolinfa da região occipital da cabeça de cada operária e realizou-se a contagem total de hemócitos utilizando-se câmara de Neubauer. As doses de ZnSO₄ foram eficientes em reduzir o número de hemócitos das operárias em ambos os períodos. Os dois tempos avaliados apresentaram alto desempenho na dose em comum: 0,15 g/L de ZnSO₄. O período de 48 horas apresentou maior interferência na imunidade das operárias. O segundo capítulo objetivou verificar o aumento na mortalidade de operárias de *A. sexdens* associando o ZnSO₄ com o fungo *M. anisopliae*. O experimento foi composto pelos seguintes tratamentos: 10⁵, 10⁶ e 10⁷ conídios/mL do fungo *M. anisopliae*, com 3 repetições cada, sendo divididas em 10 grupos com 10 operárias cada e o controle consistiu da aplicação de água destilada autoclavada. Cada operária recebeu 1 µL de suspensão no tórax em cada tratamento correspondente e colocadas em câmara climatizada. A cada dia de avaliação foram coletadas as operárias mortas e desinfetadas, colocadas em tubos Eppendorf autoclavados e colocadas em BOD para confirmar se a morte foi causada pelo entomopatógeno. A concentração 10⁶ conídios/mL provocou mortalidade intermediária, sendo escolhida para a segunda etapa do experimento. O ZnSO₄ possibilitou que fungos oportunistas se tornassem patogênicos. A associação ZnSO₄ com *M. anisopliae* foi eficiente em favorecer a atividade de *M. anisopliae* aumentando a taxa de infecção e mortalidade de 30% (tratamento com apenas a suspensão do fungo) para 60%.

Palavras-Chave: Controle biológico. Saúvas. Toxidez. Mortalidade.

OVERVIEW

In order to evaluate the pathogenicity of *M. anisopliae* in combination with ZnSO₄ in *A. sexdens* workers, three experiments were carried out in the Laboratory of the Insect-microorganism symbiosis at the Federal University of Tocantins. The experiments were divided into two chapters. The first one aimed to evaluate the effects of ZnSO₄ as an immunosuppressive substance in *A. sexdens* workers. The experimental design consisted of seven replicates (0, 0.15, 0.25, 0.50, 1.50, 2.50 and 5.00 g/L) of ZnSO₄, with eight replicates (containing 1 worker per replicate) and two evaluation periods (24 and 48 hours). For each dose, the repetition was immersed for 20 seconds, later each worker was individualized in glass test tubes with moistened cotton. After 24 and 48 hours, 1 μL of hemolymph was removed from the occipital region of the head of each worker and the total hemocytes was counted using a Neubauer chamber. The doses of ZnSO₄ were efficient in reducing the number of hemocytes of the workers in both periods. The two schedules evaluated presented a high performance in the common dose: 0.15 g/L of ZnSO₄. The period of 48 hours presented greater interference in the immunity of the workers. The second chapter aimed to verify the increase in the mortality of *A. sexdens* workers associating ZnSO₄ with the fungus *M. anisopliae*. The experiment was composed of three treatments: 10⁵, 10⁶ and 10⁷ conidia / mL of the fungus *M. anisopliae*, with 3 replicates each, being divided into 10 groups with 10 workers each and one control consisted of the application of autoclaved distilled water. Each worker received 1 μl of suspension in the thorax in each corresponding treatment and placed in BOD. In the evaluation, the dead workers were collected every day and disinfected, placed in autoclaved Eppendorf tubes and placed in BOD to confirm if the death was caused by *M. anisopliae*. The dose of 10⁶ conidia / mL presented intermediate mortality and was chosen for the second stage of the experiment. ZnSO₄ allowed opportunistic fungi to become pathogenic. The association between ZnSO₄ and *M. anisopliae* was efficient to promote the activity of *M. anisopliae* by increasing the infection rate and mortality from 30% (treatment with fungus suspension only) to 60%.

Keywords: Biological Control. Leaf-cutting Ant. Toxicity. Mortality.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

Figura 1: Contagem total de hemócitos após imersão de operárias de *A. sexdens* em diferentes doses de ZnSO₄ nos períodos de 24 e 48 horas.....25

CAPÍTULO II

Figura 1: Teste de sobrevivência com operárias de *A. sexdens*, em que Tratamento Controle (TC), suspensões do fungo *M. anisopliae* (T1) 10⁵, (T2) 10⁶, (T3) 10⁷ conídios/mL. $\chi^2 = 24,41$, df= 3, P < 0,001, +Censurado: operárias sobreviventes ao final de dez dias.....39

Figura 2: Teste de sobrevivência com operárias de *A. sexdens*, em que (TC) Tratamento Controle, (T1) suspensão do fungo *M. anisopliae* com 10⁶ conídios/mL, (T2) dose de 0,15 g/L de ZnSO₄, (T3) dose de 0,15 g/L de ZnSO₄ +10⁶ conídios/mL do fungo *M. anisopliae*. $\chi^2 = 30,165$; df=3; P<0,001, +Censurado: operárias sobreviventes ao final de dez dias.....42

Figura 3: Imagens de fungos oportunistas que esporularam nos cadáveres das operárias do tratamento contendo apenas aplicação de 0,15 g/L do ZnSO₄, em que as figuras A e B: *Aspergillus* sp. 1, C e D: *Aspergillus* sp. 2, E e F: *Aspergillus* sp. 3, G e H: *Rhizopus* sp., I e J: *Fusarium* sp., K e L: *Mycelia Sterilia*, M e N: *Metarhizium anisopliae*, O e P: *Beauveria* sp.....44

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1: Resumo da análise de variância para a variável hemócitos/ μL23

Tabela 2: Número médio de hemócitos nos períodos de 24 e 48 horas.....26

CAPÍTULO II

Tabela 1: Comparação dois a dois das curvas de mortalidade de operárias de *A. sexdens* pelo teste de Log- Rank, com nível de significância de 5%.....40

Tabela 2: Tempos letais médios (TL_{50}), obtidos pela análise de Probit para concentrações de conídios de *M. anisopliae* em operárias de *A. sexdens*.....41

Tabela 3: Comparação dois a dois das curvas de mortalidade de operárias de *A. sexdens* pelo teste de Log- Rank, com nível de significância de 5%.....43

Tabela 4: Tempos letais médios (TL_{50}), obtidos pela análise de Probit para concentração 10^6 conídios/mL de *M. anisopliae*, ZnSO_4 e associação 0,15 g/L de sulfato de zinco com 10^6 conídios/mL de *M. anisopliae*, em operárias de *A. sexdens*.....43

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| INTRODUÇÃO GERAL..... | 10 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 14 |
| CAPÍTULO I: EFEITOS DO SULFATO DE ZINCO SOBRE A IMUNIDADE DE OPERÁRIAS DE <i>Atta sexdens</i> | 17 |
| RESUMO | 17 |
| ABSTRACT | 18 |
| 1 INTRODUÇÃO | 19 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 21 |
| 2.1 Coleta de operárias no campo e manutenção em laboratório | 21 |
| 2.2 Imersão das operárias em ZnSO ₄ | 21 |
| 2.3 Contagem total de hemócitos | 22 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 23 |
| 4 CONCLUSÃO | 28 |
| REFERÊNCIAS BIBLOGRÁFICAS | 29 |
| CAPÍTULO II: SUSCETIBILIDADE DE OPERÁRIAS DE <i>Atta sexdens</i> TRATADAS COM SULFATO DE ZINCO COMO IMUNOSSUPRESSOR AO <i>Metarhizium anisopliae</i> | 32 |
| RESUMO | 32 |
| ABSTRACT | 33 |
| 1 INTRODUÇÃO | 34 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 36 |
| 2.1 Coleta das operárias no campo e manutenção em laboratório | 36 |
| 2.2 Isolamento do fungo <i>Metarhizium anisopliae</i> | 36 |
| 2.3 Infecção das operárias para teste de mortalidade com suspensões de <i>M. anisopliae</i> | 36 |
| 2.4 Teste de mortalidade associando ZnSO ₄ ao fungo <i>M. anisopliae</i> | 37 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 39 |
| 3.1 Teste de mortalidade com as suspensões 10 ⁵ , 10 ⁶ e 10 ⁷ conídios/mL .. | 39 |
| 3.2 Teste de mortalidade associando o ZnSO ₄ ao fungo <i>M. anisopliae</i> | 42 |
| 4 CONCLUSÃO | 47 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 48 |

INTRODUÇÃO GERAL

As formigas-cortadeiras representam uma das sociedades mais complexas dentre os insetos. Pertencem aos gêneros *Atta* (saúvas) e *Acromyrmex* (quenquéns), sendo conhecidas por cultivarem um jardim de fungo, com o qual elas mantêm uma relação simbiótica obrigatória.

O fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* Singer (Möller) (FISHER et al., 1994) se desenvolve sobre o material vegetal apresentando os ápices das hifas dilatados, denominados “gongylidia” (gongilideos), ocorrendo em grupamentos denominados de estáfilas. Essas estruturas são utilizadas como a principal fonte de nutrientes para as rainhas, larvas e ao mesmo tempo, servem de suplementação da dieta das operárias adultas, fornecendo cerca de 9% da energia necessária para as suas sobrevivências (QUINLAN; CHERRETT, 1979; SCHULTZ; BRADY, 2008; ERTHAL JR et al., 2009).

O fungo simbiote produz uma diversidade de enzimas para a degradação de polímeros vegetais foliares como pectina, amido e celulose, por exemplo e converte em nutrientes assimiláveis para as formigas. A glicose é um dos nutrientes produzidos a partir de material vegetal, constituindo fonte de alimento para as formigas (AYLWARD et al., 2013; SILVA et al., 2003; SILVA et al., 2006).

As colônias de algumas espécies de formigas-cortadeiras são consideradas importantes pragas na agricultura da América do Sul, uma vez que, causam danos severos nos diferentes ciclos das culturas atacadas. A espécie *A. sexdens* apresenta ampla distribuição no Brasil e na América do Sul e causa maiores prejuízos quando comparada às outras espécies do mesmo gênero, sendo considerada praga agrícola severa, ou seja, organismo cuja ponto de equilíbrio é maior que o nível de controle (DELLA LUCIA et al., 1993; LOECK et al., 2001; SILVA et al., 2006; VILELA et al., 2008; SOUZA et al., 2011).

Na silvicultura, essas formigas causam danos econômicos desde a implantação até a fase de colheita, como a morte de mudas, a redução do desenvolvimento e a diminuição da resistência da planta à outras pragas e agentes patogênicos. Em casos de ataques severos, os prejuízos podem chegar a 100% da produção (REIS FILHO et al., 2011; JUNG et al., 2013; SANTOS et al., 2013).

Os ataques de pragas se intensificaram ao longo dos anos devido à modificação do habitat pela ação humana nos ecossistemas. Conseqüentemente

houve proliferação desses insetos devido a vários fatores como abundância de recursos alimentares, escassez de predadores e de competição (ZAMBIAZZI, 2011).

Cálculos de perdas provocadas pelas saúvas são relativamente complexos, devido a influência de múltiplas variáveis, como a espécie de formiga, número e tamanho de colônia, entre outros, cujo conhecimento se torna indispensável nas ações de manejo e controle (ANTUNES; DELLA LUCIA, 1999).

Relevantes quantidades de formicidas como iscas granuladas, pós-secos, pós-solúveis e líquidos termonebulizáveis, têm sido comercializadas no Brasil, principalmente para o controle de saúvas, porém sem sucesso e o resultado é a contaminação ambiental e seleção de populações resistentes (OLIVEIRA et al., 2011).

Tem-se buscado o desenvolvimento de novos formicidas e métodos alternativos de manejo, que possam favorecer a relação custo-benefício e eficiência com a finalidade de serem usados para permitir seu controle. Uma dessas alternativas já comprovadas é o emprego do manejo integrado de pragas (OLIVEIRA et al., 2011). O uso do controle biológico vem ganhando cada vez mais destaque, sendo que alguns bioinseticidas com entomopatógenos estão sendo utilizados para o controle de pragas agrícolas (NAGAMOTO et al., 2007; ALMEIDA et al., 2007; ROSADO et al., 2014).

Os fungos entomopatogênicos são de baixo custo e considerados promissores, pois apresentam mecanismos únicos de ação que iniciam-se com a deposição do conídio sobre a cutícula do hospedeiro, após a germinação do conídio penetra por ação mecânica e enzimática, colonizando o corpo do hospedeiro, que se diferem de bactérias e vírus, que necessitam ser ingeridos para iniciar uma infecção (SANTOS et al., 2007). Também exibem taxa eficiente de produção de esporos, assim como maior taxa de especificidade em relação ao inseto alvo do que os inseticidas químicos. Outro fator importante é que, até o momento, não há relatos de desenvolvimento de resistência devido sua grande variabilidade genética.

O fungo *Metarhizium anisopliae* é altamente patogênico para um grande número de insetos devido a secreção de toxinas chamadas Destruxinas (DTXs), são toxinas peptídicas cíclicas, capazes de interferir na resposta imune do inseto (VEY et al., 2002), além de outros efeitos como paralisia tetânica (SAMUELS et al., 1988) e inibição da síntese de DNA e RNA em linhagens de células de insetos (QUIOT et al., 1985).

A protease PR1 é considerada um importante fator de virulência em *M. anisopliae*, e a superexpressão dessa enzima no mesmo fungo reduz em 25% o tempo

de morte em *Manduca sexta*, comparados àqueles infectados com o genótipo do tipo selvagem (ST. LEGER et al., 1996).

Porém, nem sempre *M. anisopliae* é capaz de vencer o sistema imune das formigas-cortadeiras devido a mecanismos de defesa, como o ato de se limpar com as patas utilizando movimentos de lambedura (“grooming”), caracterizado como um comportamento de “imunidade social” e as secreções antibióticas que são fundamentais para prevenir a contaminação por esses patógenos (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

Testes realizados por Hughes et al. (2002), expondo formigas ao fungo parasita *M. anisopliae*, mostraram que houve maior sobrevivência das saúvas quando mantidas em grupo, do que quando isoladas, devido a três mecanismos de defesa: auto-limpeza (grooming), limpeza da companheira de ninho (allogrooming) e secreção de substâncias antibióticas. Esses comportamentos podem esclarecer porque poucas doenças são conhecidas entre as formigas-cortadeiras e o porquê de tentativas de controle biológico com patógenos serem ineficientes (MIYASHIRA, 2008).

Uma estratégia que pode ser adotada para potencializar a eficácia de fungos entomopatogênicos no controle de formigas-cortadeiras é o uso de agentes imunossupressores, ou seja, substâncias que permitem reduzir a ativação ou eficácia do sistema imunológico. Em combinação com um agente imunossupressor, várias espécies oportunistas podem se tornar agentes de controle natural de formigas-cortadeiras (DORNELAS et al., 2017).

Doses baixas de alguns metais pesados, tais como cádmio (Cd), mercúrio (Hg), chumbo (Pb) e zinco (Zn) podem melhorar a função do sistema imune, enquanto que doses mais elevadas são supressivas (CABASSI, 2007). Alguns metais podem atuar como imunotoxinas causando maior suscetibilidade a doenças infecciosas e parasitas (GALLOWAY; DEPLEDGE, 2001). Mogren e Trumble (2010), fizeram uma revisão que reuniu vários estudos avaliando os efeitos da poluição de metais e metaloides no comportamento de insetos. Constataram que a maior parte das pesquisas mostraram efeitos negativos dos metais sobre os insetos.

O Zn é um dos elementos que as plantas necessitam para seu pleno desenvolvimento de acordo com a Lei do Mínimo, onde cada nutriente é essencial para a planta e sem ele seu desenvolvimento e/ou produtividade é limitada, podendo afetar o desenvolvimento e o metabolismo das espécies vegetais.

Entre os micronutrientes, a importância do Zn para as culturas em solos brasileiros é indiscutível, devido a ocorrência frequente de sua deficiência (ABREU et al., 2001). Os solos do Cerrado, são em sua maior parte, compostos por Latossolos, solos altamente intemperizados e ácidos, com mínima disponibilidade de nutrientes essenciais e a alta afinidade dos micronutrientes catiônicos como o Zn, Cu, Fe e Mn pelos colóides do solo levam, geralmente, à baixa concentração desses na solução do solo (LOPES, 1977).

Partindo-se da hipótese que o zinco possui efeito imunossupressor sobre operárias de *A. sexdens* e aumenta a probabilidade de infecção pelo fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* causando maior mortalidade das mesmas, o objetivo do estudo foi avaliar a patogenicidade de *M. anisopliae* em combinação com o ZnSO₄ em operárias de *A. sexdens*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, C. A.; FERREIRA, M. E.; BORKERT, C. M. Disponibilidade e avaliação de elementos catiônicos: zinco e cobre. In: FERREIRA, M. E.; CRUZ, M. C. P.; RAIJ, B. van; ABREU, C.A. **Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura**. (Ed.). Jaboticabal, 2001. p.125-150.
- ALMEIDA, G. D. de. et al. Determinação da concentração letal média (CL₅₀) de *Beauveria bassiana* para o controle de *Brevicoryne brassicae*, **Idesia**, v.25, n.2, p.69-72, 2007.
- ANTUNES, E. C.; DELLA LÚCIA, T. M. C. Consumo foliar em *Eucalyptus urophylla* por *Acromyrmex laticeps nigrosetosus* Forel (Hymenoptera –Formicidae). **Ciência & Agrotecnologia**, v. 23, n.1, p.208-211, 1999.
- AYLWARD F. O. et al. *Leucoagaricus gongylophorus* produces a diversity of enzymes for recalcitrant plant polymer degradation in leaf-cutter ant fungus gardens **Applied and Environmental Microbiology**, v.79 n.12 p.3770-3778, 2013. DOI:10.1128 / AEM.03833-12.
- CABASSI, E. The immune system and exposure to xenobiotics in animals. **Veterinary Research Communications**, v.31 p.115–120, 2007. DOI: 10.1007 / s11259-007-0074-8
- DELLA-LUCIA, T. M. C.; FOWLER, H. G.; MOREIRA, D. D. O. Espécies de formigas-cortadeiras no Brasil In: DELLA-LUCIA, T. M. C. **As formigas-cortadeiras**. (Ed.). Viçosa: Folha de Viçosa, 1993. p.26-31.
- DORNELAS, A. S. P. et al. Susceptibility of *Atta sexdens* worker ants treated with the immunosuppressant Sandimmun Neoral to *Metarhizium anisopliae*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 52, n. 2, p.133-136, 2017. DOI: 10.1590/s0100-204x2017000200008
- ERTHAL JR, M. et al. Hydrolytic enzymes of leaf-cutting ant fungi. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, v.152, p.54–59, 2009. DOI:10.1016/j.cbpb.2008.09.086
- FISHER, P. J. et al. Leaf cutting ants, their fungus gardens and the formation of basidiomata of *Leucoagaricus gongylophorus*. **Mycologist**, v.8, n.3. p.541-546, 1994. DOI:10.1016/S0269-915X(09)80159-6.
- GALLOWAY, T. S.; DEPLEDGE, M. H.; Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance. **Ecotoxicology**, v.10, p.5-23, 2001.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. 1990. **The ants**. Cambridge, Mass.: Harvard University Press, 732p.

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

JUNG, P. H., et al. Insecticidal activity of *Eugenia uniflora* L. and *Melia azedarach* L. on *Atta laevigata* Smith. **Floresta e Ambiente**, v.20, n.2, p.191-196, 2013. DOI: 10.4322/floram.2013.015

ST. LEGER, R. J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M. D. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.93, p.6349-6354, 1996.

LOECK, A. E.; GRÜTZMACHER, D. D.; STORCH, G. Distribuição geográfica de *Atta sexdens piriventris* SANTSCHE, 1919, nas principais regiões agropecuárias do estado do Rio Grande Do Sul. **Revista Brasileira de AGROCIÊNCIA**, Rio Grande do Sul, v.7 n.1, p.54-57, 2001. DOI:10.18539/CAST.V7I1.357

LOPES, A. S.; **Available water, phosphorus fixation and zinc levels in Brazilian Cerrado soils in relation to their physical, chemical and mineralogical properties**. 1977. 189p. Thesis (Ph.D.) - North Carolina State University, Raleigh.

MIYASHIRA, C. H. **Influência da cafeína na sobrevivência de saúvas *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) e no crescimento *in vitro* de seu fungo mutualista**. 2008. 67 f. Dissertação (Mestrado em botânica) – Instituto de biociências, Universidade de São Paulo. São Paulo.

MOGREN, C. L.; TRUMBLE, J. T. The impacts of metals and metalloids on insect behavior. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.135, p.1-17, 2010.

NAGAMOTO, N. S.; FORTI, L. C.; RAETANO, C. G. Evaluation of the adequacy of diflubenzuron and dechlorane in toxic baits for leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) based on formicidae activity. **Journal of Pest Science**, Heidelberg, v.80, p.9-13, 2007. DOI: 10.1007 / s10340-006-0143-8

OLIVEIRA, M. A.; ARAÚJO, M. S.; MARINHO, G. C.; RIBEIRO, M. M. R.; DELLA LUCIA, T. M. C. Manejo de formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA T. M. C. **Formigas-cortadeiras: da biologia ao manejo**. Viçosa-MG: UFV, 2011. p.400-419.

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

QUIOT, J.M.; VEY, A.; VAGO, C. Efeitos de micotoxinas em células invertebradas *in vitro*. **Advances in Cell Culture**, v.4 p.199–212, 1985. DOI:10.1016/B978-0-12-007904-9.50013-7

REIS FILHO, W. et al. Danos causados por diferentes níveis de desfolha artificial para simulação do ataque de formigas-cortadeiras em *Pinus taeda* e *Eucalyptus grandis*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v.31, n.65, p.37-42, 2011.

ROSADO, J. L. O. et al. Preferência de corte de *Acromyrmex Crassispinus* (Forel, 1909) e *Acromyrmex Ambiguus* (Emery, 1887) (Hymenoptera: Formicidae) por diferentes espécies de eucaliptos em laboratório. **Ciência Florestal**, v.24, n.4, p.869-875, 2014. DOI: 10.1590/1980-509820142404007

SAMUELS, R.I.; REYNOLDS, S.E.; CHARNLEY, A.K. Calcium channel activation of insect muscle by destruxins, insecticidal compounds produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Comp Biochem Physiol.** v.90 p.403-412. 1988. DOI:10.1016/0742-8413(88)90018-7

SANTOS, A. V.; DE OLIVEIRA, B. L.; SAMUELS, R. I. Selection of entomopathogenic fungi for use in combination with sub-lethal doses of imidacloprid: perspectives for the control of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). **Mycopathologia**, v.163 p.233-240, 2007. DOI 10.1007/s11046-007-9009-8

SANTOS, M. A. I. et al. Extrato metanólico de farinha de folhas de mandioca como alternativa ao controle da lagarta-do-cartucho e de formigas-cortadeiras. **Ciências Agrárias**, v.34, n.6, p.3501-3512, 2013. DOI 10.5433/1679-0359.2013v34n6Supl1p3501

SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G. Major evolutionary transitions in the ant agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.15, n.14, p.5435-5440, 2008. DOI:10.1073/pnas.0711024105

SILVA, A. Starch metabolism in *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. **Microbiological Research**, v.161, n.4, p.299-303, 2006. DOI: 10.1016 / j.micres.2005.11.001

SILVA, M. et al. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. **Insect Physiol.** v.49, p.307-313, 2003. DOI: 10.1016/S0022-1910(03)00004-0

SOUZA, M. D.; PERES FILHO, O.; DORVAL, A. Efeito de extratos naturais de folhas vegetais em *Leucoagaricus gongylophorus* (Möller) Singer, (Agaricales: Agaricaceae). **Ambiência Guarapuava (PR)**, v.7, n.3, p.461-471, 2011. DOI: 10.1016/S0022-1910(03)00004-0

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.

VILELA, N.J.; RIBEIRO, C.S.C.; MADAIL, J.C.M. 2008. **Eficiência técnico-econômico de quatro sistemas de produção de pimentas *Capsicum***. Brasília: Embrapa Hortaliças, 7p. (Embrapa Hortaliças. Comunicado Técnico, 56).

ZAMBIAZZI, E. V. et al. Controle biológico *in-vitro* do percevejo-marrom (*Euschistus heros*) com *Beauveria bassiana*, **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v.5, n.3, p.43, 2011.

CAPÍTULO I

EFEITOS DO SULFATO DE ZINCO SOBRE A IMUNIDADE DE OPERÁRIAS DE *ATTA SEXDENS*

RESUMO

As formigas-cortadeiras, ao longo do tempo desenvolveram adaptações morfológicas possuindo um sistema imune eficiente com alto grau de reconhecimento e eliminação de invasores. Causam grandes prejuízos na agricultura pois, são consideradas pragas severas. Diante disso, tem-se estudado o uso de substâncias que tenham efeitos imunossupressores, em insetos, as quais tornam os organismos pouco resistentes a infecções. Diante disso, o objetivo do estudo foi avaliar os efeitos do zinco como substância imunossupressora em operárias de *A. sexdens*. Adotou-se o delineamento fatorial, com oito repetições (contendo 01 operária por repetição), compreendendo sete doses (0, 0,15, 0,25, 0,50, 1,50, 2,50 e 5,00 g/L) de ZnSO₄ e dois períodos de avaliação (24 e 48 horas). Para cada dose, a repetição foi imersa por 20 segundos nas doses correspondentes e foram individualizadas em tubos de ensaio de vidro com algodão umedecido em água destilada esterilizada. Após o cada período, retirou-se 1µL de hemolinfa de cada indivíduo e foi feita a contagem total de hemócitos com auxílio de uma câmara de Neubauer. Conclui-se que as doses de sulfato de zinco foram eficientes em reduzir a imunidade das formigas nos horários de 24 e 48 horas. Os dois horários avaliados obtiveram alto desempenho na dose em comum: 0,15 g/L de (ZnSO₄). O período de 48 horas apresentou maior interferência na imunidade das operárias.

Palavras-Chave: Formigas-cortadeiras. Hemócitos. Sistema Imune. Metais Pesados.

EFFECTS OF ZINC SULFATE ON THE IMMUNITY OF *Atta sexdens* WORKERS

ABSTRACT

Leaf-cutting ants have developed morphological adaptations and possess an efficient immune system with a high degree of recognition and elimination of invaders. The use of the immunosuppressive substance that does the organisms of the insects less resistant to infections has been studied. Therefore, this work aimed to evaluate the effects of zinc as an immunosuppressive substance in workers of *A. sexdens*. In a factorial scheme, the assay was composed of seven treatments: 0.0, 0.15, 0.25, 0.50, 1.50, 2.50 and 5.00 g/L of ZnSO₄ with eight replicates and two evaluation periods (24 and 48 hours). Each treatment consisted of 10 workers, immersed for 20 seconds at the corresponding doses and individualized in glass test tubes with cotton wool dampened in sterile distilled water. After each period, 1 µL of hemolymph was removed from each individual and the total hemocytes were counted using a Neubauer chamber. According to the results, the doses of zinc sulfate were efficient in reducing the immunity of the ants at the times of 24 and 48 hours. Both periods showed high performance in the common dose: 0.15 g/L (ZnSO₄). A greater interference was observed in the 48 hours period for the immunity of the workers.

Keywords: Leaf-cutting Ants. Hemocytes. Immune System. Heavy Metals.

1 INTRODUÇÃO

As formigas-cortadeiras, ao longo do tempo desenvolveram adaptações morfológicas como o exoesqueleto e a membrana peritrófica que representam obstáculo a entrada de microrganismos patogênicos (KLOWDEN, 2007), o que, conseqüentemente, protege seu fungo simbiote e as demais companheiras de ninho e rainha(s). As mesmas secretam substâncias antibacterianas pelas glândulas metapleurais que inibem o desenvolvimento de patógenos (FISHER et al., 1994). Possuem o sistema imune eficiente com alto grau de reconhecimento e eliminação de invasores. Assim que a cutícula é rompida por um patógeno, o sistema imunológico é ativado, gerando respostas humorais e celulares, sendo a produção de peptídeos antimicrobianos um aspecto importante da defesa do hospedeiro em organismos multicelulares (IMLER; BULET, 2005; STRAND, 2008).

Os prejuízos acarretados pelas formigas-cortadeiras foram descritos desde o descobrimento do Brasil (ARAÚJO et al., 2015). As perdas são causadas nas diferentes fases de desenvolvimento das culturas de acordo com a idade da planta e a intensidade do ataque. Além disso, a culturas infestadas ficam susceptíveis aos ataques de doenças e outras pragas. (REIS FILHO et al., 2011)

O controle químico convencional, utilizando iscas formicidas colocadas diretamente no formigueiro e o controle químico sistemático, em que a isca formicida é distribuída na área a intervalos regulares e em quantidade constante, independentemente da localização dos saúveiros são os mais utilizados atualmente, porém, os formicidas são tóxicos e persistentes no ambiente, causando poluição.

Atualmente, tem-se estudado o uso de substâncias que tenham efeitos imunossupressores, nos insetos, as quais tornam os organismos pouco resistentes a infecções. (FIOLKA, et al., 2008; WU; YUNHONG, 2015).

Dentre essas substâncias, os metais pesados têm proporcionado resultados promissores (SUN et al., 2010; PÖLKKI, et al., 2012). O zinco, além de possuir esta característica é nutriente requerido pelas plantas, pois desempenha funções importantes, especialmente, como ativador enzimático, sendo requerido para a síntese do aminoácido triptofano, um precursor da biossíntese do AIA (ácido indolacético) (MALAVOLTA, 1997). A deficiência de zinco é reconhecida como problema nutricional mundial para a produção das culturas (FAGERIA, 2000). Desta

forma, uma das fontes de fertilizante mais utilizadas na agricultura é o sulfato de zinco (ZnSO_4), devido a solubilidade em água (RAIJ et al., 1997).

Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos do ZnSO_4 como substância imunossupressora em operárias de *A. sexdens*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta de operárias no campo e manutenção em laboratório

Realizou-se a coleta no período mais fresco do dia, ou seja, entre 8 e 10 horas da manhã, nos meses de fevereiro a outubro de 2018, na fazenda experimental da Universidade Federal do Tocantins, Campus de Gurupi. Foram selecionados três ninhos, selecionados ao acaso, que possuíam intensa atividade de forrageamento, sendo escolhidas as operárias que estavam em volta do ninho com largura da cápsula cefálica em torno de 2,0 - 2,5 mm.

A coleta foi realizada com o auxílio de pinças e as formigas foram acondicionadas em potes plásticos de 250 ml com pequenos furos na tampa para permitir circulação de ar. O tempo necessário de transporte entre o local de coleta e o laboratório foi de 15 minutos, sendo feito rapidamente para que as formigas não sofressem estresse.

2.2 Imersão das operárias em ZnSO₄

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Simbiose Insetos-Microrganismos da Universidade Federal do Tocantins, Campus de Gurupi. Adotou-se o delineamento fatorial, com oito repetições (contendo 01 operária por repetição), compreendendo sete doses (0, 0,15, 0,25, 0,50, 1,50, 2,50 e 5,00 g/L) de ZnSO₄ e dois períodos de avaliação (24 e 48 horas). Para cada dose, a repetição foi imersa por 20 segundos e foram dispostas sobre folhas de papel filtro, previamente esterilizado, para retirar o excesso de solução e cada operária foi individualizada em tubos de ensaio de vidro com algodão umedecido em água destilada esterilizada, sendo acondicionadas em BOD a 25°C ± 1°C, e 70% ± 5% U.R. Após o cada período, retirou-se 1µL de hemolinfa de cada indivíduo e foi feita a contagem total de hemócitos com auxílio de uma câmara de Neubauer. Conclui-se que as doses de sulfato de zinco foram eficientes em reduzir a imunidade das formigas nos períodos de 24 e 48 horas. Os dois períodos avaliados apresentaram alto desempenho na dose em comum: 0,15 g/L de (ZnSO₄). O período de 48 horas apresentou maior interferência na imunidade das operárias.

2.3 Contagem total de hemócitos

Após o período de 24 e 48 horas, retirou-se 1 μL de hemolinfa da região occipital da cabeça de cada operária, com auxílio de tubo microcapilar Sigma-Aldrich. Cada microlitro foi dispendo em tubos Eppendorf contendo 4 μL de solução anticoagulante (SAI) (LEONARD et al., 1985). A mistura foi ressuspendida com auxílio de uma micropipeta. A contagem total de hemócitos foi realizada imediatamente após a coleta da hemolinfa, utilizando-se câmara de Neubauer em microscópio óptico de luz Leica ICC50HD, com aumento 10 vezes, em que, 0,5 μL de corante Giemsa foi adicionado à mistura para auxiliar na visualização dos hemócitos.

A partir da equação, pôde-se obter o número estimado de hemócitos/ μL :

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

Em que: N= número de hemócitos/ μL ; C= quadrante da câmara de Neubauer utilizado na contagem e D= fator de diluição.

A análise de variância foi realizada, sendo as variâncias testadas pelo teste F à 5% de probabilidade, utilizando-se o software Genes - Genética Quantitativa e Estatística Experimental - versão 1990.2018.39 (CRUZ, 2006). A característica quantitativa foi submetida à análise regressão e a característica qualitativa foi submetida ao teste Tukey à 5% de probabilidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos, bem como o fatorial (Tabela 1), evidenciando que as doses influenciaram o número de hemócitos nos períodos avaliados, sendo necessário efetuar o desdobramento dos fatores. As formigas-cortadeiras têm sistema imune inato bem desenvolvido, intimamente associado aos constituintes celulares da hemolinfa (hemócitos) e líquidos (plasma), onde os fatores humorais são dissolvidos (SOUZA et al., 2013; COUCEIRO et al., 2016).

Os hemócitos estão presentes na hemolinfa circulando livremente (CORREIA, 2008), e reconhecem uma ampla variedade de alvos. Com a entrada de um corpo estranho através do exoesqueleto do inseto, seu número aumenta rapidamente, e eles são responsáveis por várias defesas celulares, incluindo células disseminação, formação de agregados celulares, nodulação, fagocitose e encapsulamento; eles também podem participar de reações humorais (STRAND, 2008).

Normalmente, os metais pesados desempenham papéis fisiológicos específicos na regulação do desenvolvimento das células e órgãos de organismos (XIA et al., 2005). Porém, podem interferir na resposta imune de insetos (SORVARI et al., 2007) causando efeitos negativos durante fases de desenvolvimento, como redução no crescimento, longevidade (MOE et al., 2001), e redução na resistência a infecções fúngicas (DUBOVSKIY et al., 2011).

Tabela 1 - Resumo da análise de variância para a variável hemócitos/ μL .

| Fonte de variação | GL | Quadrado Médio |
|-------------------|----|----------------|
| Períodos | 1 | 21525089 * |
| Tratamentos | 6 | 927641756* |
| Fatorial | 6 | 425099048* |
| Resíduo | 98 | 1489790* |
| C.V (%) | | 9,43 |

GL: grau de liberdade; CV: coeficiente de variação; ns: não significativo pelo teste F ($p \leq 0,05$), *significativo a ($p \leq 0,05$). Fonte: Dados da pesquisa.

A contagem total de hemócitos das operárias apresentou decréscimo em todas as doses nos dois períodos analisados, quando comparada ao tratamento controle (Figura 1). No entanto no período de acondicionamento de 24h, verificou-se redução

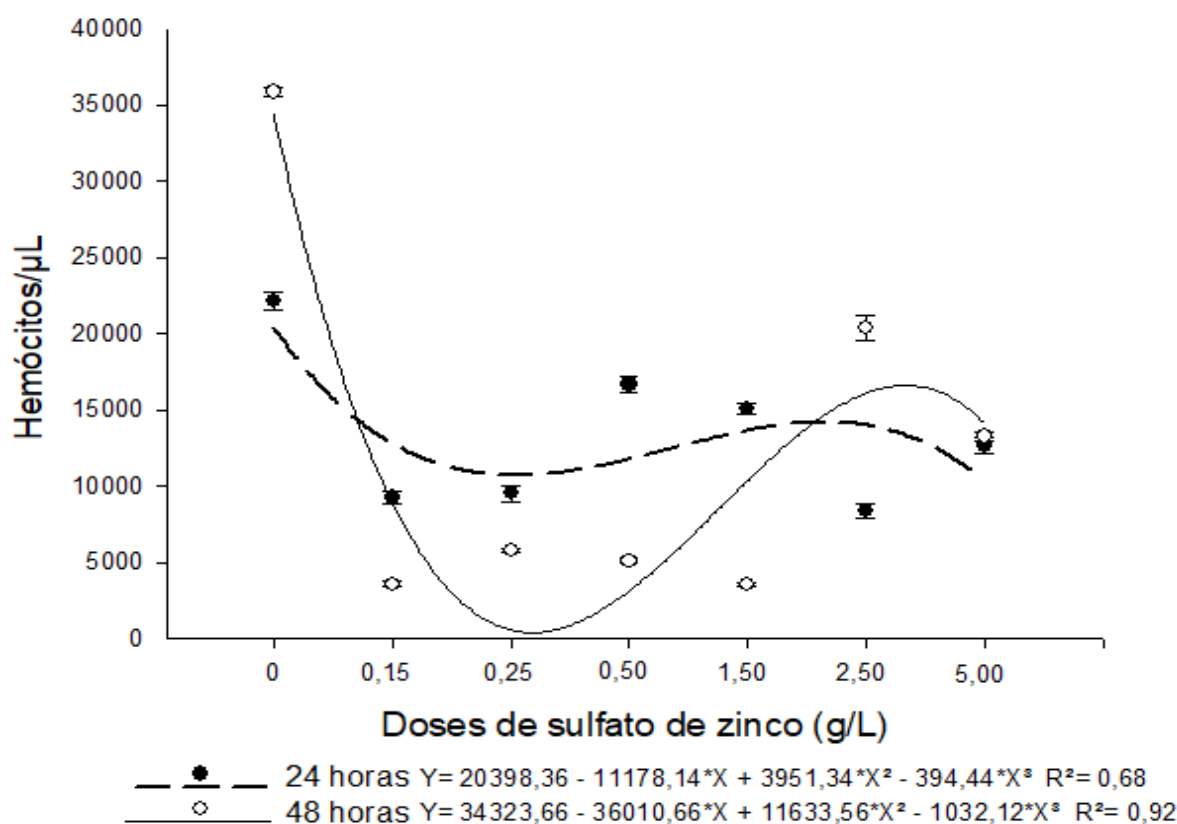
mais acentuada nas doses de 0,15, 0,25 e 2,5 g/L de ZnSO₄. Em relação à testemunha, houve redução de 58%, 57% e 62% respectivamente. Já para 48 horas, foram entre as doses 0,15 e 1,5 g/L, tendo redução variando entre 84% a 90%.

A diminuição no número de hemócitos em relação ao tratamento controle sugere que o ZnSO₄ possui efeito tóxico, ocasionando imunossupressão sobre as operárias. A toxicidade fisiológica de metais pesados acarreta na diminuição da quantidade de materiais energéticos na hemolinfa e / ou hemócitos, desequilíbrio do estado redox, supressão da imunocompetência celular e / ou humoral e integridade das células e / ou tecidos dos insetos (SHIYONG et al., 2015).

Níveis de metais que excedem significativamente os limites fisiológicos afetam o funcionamento normal de células e tecidos de insetos, em particular, os metálicos bivalentes, como o zinco, são transportados através das membranas celulares e interferem no equilíbrio extra e intercelular, impactando a polarização da membrana celular, estabilidade do pH e permeabilidade da membrana (ROH et al., 2009; PANACEK et al., 2011). Além disso, a redox dos metais pode afetar a função dos canais iônicos e das bombas de íons no plasma (BALAMURUGAN; SCHAFFNER, 2006) e no sistema imune dos insetos (PROHASKA; GYBINA, 2004).

A resposta imune em insetos pode variar devido ao genótipo (RANTALA; ROFF, 2006) e idade (AMDAM et al., 2005) e é mais importante ainda nos insetos sociais cuja sociedade é composta por indivíduos de diferentes idades e linhagens paternas. Essa variabilidade poderia explicar a amplitude na quantidade de hemócitos por microlitro nas operárias submetidas ao tratamento com ZnSO₄. Silva (2016), também observou essa falta de regularidade entre as doses e a quantidade de hemócitos/ μ L ao submeter operárias de *A. sexdens* a doses de cloreto e sulfato de zinco. Resultados como esses revelam que a resposta imune não é específica e os mecanismo(s) de ativação do sistema imunológico não é clara, ilustrando a complexidade do sistema imunitário dos insetos (DUBOVSKIY et al., 2011).

Figura 1 - Contagem total de hemócitos após imersão de operárias de *A. sexdens* em diferentes doses de ZnSO₄ nos períodos de 24 e 48 horas. Fonte: Dados da pesquisa.



Houve diferença significativa em todas as doses, exceto na dose 5,00 g/L de ZnSO₄ (Tabela 2). No tratamento controle e na dose 2,50 g/L de ZnSO₄, o período de 48 h apresentou maior quantidade de hemócitos em relação ao período de 24 h. Nas doses 0,15, 0,25, 0,50 e 1,50 g/L de ZnSO₄ houveram maiores decréscimos da quantidade de hemócitos no período de 48 h. Esse fato que pode ser justificado pelo estresse contínuo gerado com manuseio, isolamento e acondicionamento por maior período de tempo, potencializado pelos efeitos do estresse oxidativo, causado pelo ZnSO₄. Os hormônios do estresse modificam a função imunológica em moluscos, insetos e crustáceos e geralmente essas alterações são imunossupressoras (ADAMO, 2012).

Durante períodos de estresse sofrido pelo inseto como manuseio, luta ou fuga a octopamina, um mediador neuro-hormonal da resposta ao estresse e o hormônio adipocinético induzem a mobilização de energia, isso faz com que a proteína apoliporfina III perca sua capacidade de agir como uma molécula de vigilância imunológica resultando em declínio na resistência a doenças (ADAMO, 2008).

Averiguou-se que a menor dose 0,15 g/L (nos dois períodos) causou redução expressiva do número de hemócitos (Tabela 2). Sendo ideal para a realização do experimento do segundo capítulo, pois, doses mais elevadas (1,50, 2,50 e 5,00) induzem a alta apoptose de hemócitos, interferindo nos resultados esperados. Possivelmente pode ter ocorrido lise celular, recrutamento reduzido ou movimentação das células da circulação para os tecidos devido às condições de estresses pela exposição ao composto (PIPE; COLES, 1995).

Tabela 2 - Número médio de hemócitos nos períodos de 24 e 48 horas.

| Período (h) | Doses (g/L) | | | | | | |
|-------------|-------------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|
| | 0 | 0,15 | 0,25 | 0,50 | 1,50 | 2,50 | 5,00 |
| 24 | 22156b | 9250a | 9500a | 16656a | 15075a | 8375b | 12656a |
| 48 | 35844a | 3594b | 5781b | 5125b | 4094b | 20375a | 1325 a |

*Médias seguidas de mesmas letras, na vertical, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). Fonte: Dados da pesquisa.

Nas concentrações de 0,1 a 0,4% suplementadas com dieta artificial o $ZnSO_4$ reduziu o crescimento e desenvolvimento (comprimento do corpo, largura da cápsula da cabeça e pelo peso) de larvas de *Ostrinia nubilalis* Hbn (GAHUKAR, 2009). Em estudo sobre efeitos de metais pesados (cobre, zinco, cádmio e chumbo) em células imunocompetentes de mosca doméstica, mostrou alterações na morfologia dos hemócitos e plasticidade fagocitária nas moscas experimentais em comparação ao controle. O número de pró-hemócitos, considerados células-tronco, aumentou, enquanto os granulócitos, responsáveis pela fagocitose, diminuíram (BOROWSKA; PYZA, 2011).

O $ZnSO_4$ tem sido extensivamente estudado, particularmente em experimentos envolvendo pragas de lepidópteros de primeiro instar. Sabe-se que os sais de zinco causam toxicidade em insetos e suas habilidades, já que os impedimentos de alimentação para pragas agrícolas foram quantificados (MOGREN; TRUMBLE, 2010). Estudos laboratoriais são úteis para melhor compreensão da absorção de metais em insetos que vivem em condições de campo, especialmente em insetos sociais, com indivíduos que possuem grande variabilidade genética, idades distintas e complexas organizações, eficazes no controle microbiano.

Recomenda-se que em próximos experimentos, com mesma avaliação, as operárias provenham de laboratório, pois são mantidas em ambiente controlado,

reduzindo o contato com patógenos e outros fatores que possam interferir na imunidade das mesmas. Além disso, manter as operárias em grupos diminui o erro experimental, uma vez que há redução da mortalidade por estresse do isolamento social.

4 CONCLUSÃO

1. As doses de ZnSO_4 foram eficientes em reduzir o número de hemócitos das operárias em ambos os períodos.
2. Os dois períodos avaliados apresentaram alto desempenho na dose em comum: 0,15 g/L de ZnSO_4 .
3. O período de 48 horas apresentou maior interferência na imunidade das operárias.

REFERÊNCIAS BIBLOGRÁFICAS

- ADAMO, S.A., Norepinephrine and octopamine: linking stress and immune function across phyla. **Invertebrate Survival Journal**, v.5, p.12–19, 2008.
- ADAMO, S. A. The effects of the stress response on immune function in invertebrates: an evolutionary perspective on an ancient connection. **Hormones and Behavior**. v.62, p.324-330, 2012. DOI: 10.1016 / j.yhbe.2012.02.012
- AMDAM, G. V. et al. Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. **Experimental Gerontology**, v.40, n.12, p.939-947, 2005. DOI: 10.1016 / j.exger.2005.08.004.
- ARAÚJO, M. S.; RODRIGUES, C. A.; OLIVEIRA, M. A.; JESUS, F. G. Controle biológico de formigas-cortadeiras: o caso da predação de fêmeas de *Atta* spp. por *Canthon virens*. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 2, n. 3, p. 8–12, 2015.
- BALAMURUGAN, K.; SCHAFFNER, W. Copper homeostasis in eukaryotes: teetering on a tightrope. **Biochim Biophys Acta**, v.1763 p.737- 46, 2006.
- BOROWSKA, J.; PYZA, E. Efeitos de metais pesados em células imunocompetentes de insetos. **Journal of Insect Physiology**, v.57, p.760-770, 2011. DOI:10.1016/j.jinsphys.2011.02.012
- CORREIA, A. A. **Histofisiologia do canal alimentar e hemócitos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepdoptera: Noctuidae) tratadas com nim (*Azadirachta indica* A. Juss)**. 2008. 57f. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola)- Universidade Federal Rural de Pernambuco. Pernambuco.
- COUCEIRO, J. DA C. et al. Effects of entomopathogenic fungi on the mortality and immune system of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.161, n.2, p.152-159, 2016. DOI:10.1111/eea.12500.
- CRUZ, C. D. Aplicativo computacional em Genética e Estatística – Programa GENES. **Departamento de Biologia Geral – UFV, MG**, 2006.
- DUBOVSKIY, I.M. et al. The effects of dietary nickel on the detoxification enzymes, innate immunity and resistance to the fungus *Beauveria bassiana* in the larvae of the greater wax moth *Galleria mellonella*. **Chemosphere**, v.85, n.1, p.92–96, 2011. DOI: 10.1016 / j.chemosphere.2011.05.039
- FAGERIA, N. K. Níveis adequados e tóxicos de zinco na produção de arroz, feijão, milho, soja e trigo em solo de cerrado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.4, n.3, p.390-395, 2000.
- FIOLKA, M. J. Immunosuppressive effect of cyclosporin A on insect humoral immune response. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, p. 287-292, 2008. DOI: 10.1016 / j.jip.2008.03.015

FISHER, P.J. et al. Leaf cutting ants, their fungus gardens and the formation of basidiomata of *Leucoagaricus gongylophorus*. **Mycologist**, v.8, n.3. p.541-546, 1994. DOI:10.1016/S0269-915X(09)80159-6.

GAHUKAR, R. Effects of dietary zinc sulphate on the growth and feeding behaviour of *Ostrinia nubilalis* Hbn. (*Lep.*, *Pyraustidae*). **Zeitschrift für Angewandte Entomologie**. v.79, p.352-357, 2009. DOI:10.1111/j.1439-0418.1975.tb02355.x.

IMLER, J, L; BULET, P. Antimicrobial peptides in *Drosophila*, structures, activities and gene regulation. **Mechanisms of Epithelial Defense** (eds. D. Kabelitz & J.M. Schroder), vol. 86, p.1-21, 2005.

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

LEONARD, C.; SÖDERHÄLL, K.; RATCLIFFE, N. A. Studies on prophenoloxidase and protease activity of *Blaberus craniifer* haemocytes. **Insect Biochemical**, v.15, n.6, p.803-810, 1985.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2 ed. Piracicaba: POTAFÓS, 1997. 319p.

MOE, S J; STENSETH, N C; SMITH, R H. Effects of a toxicant on population growth rates: sublethal and delayed responses in blowfly populations. **Functional Ecology**, v.15, n.6, p.712–721, 2001.

MOGREN, C. L.; TRUMBLE, J. T. The impacts of metals and metalloids on insect behavior. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.135, p.1-17, 2010.

PANACEK, A. et al. Richtrova JAcute and Chronic Toxicity Effects of Silver Nanoparticles (NPs) on *Drosophila melanogaster*. **Environmental Science & Technology**, v.45, p.4974-4979, 2011.

PIPE, R. K.; COLES, J. A. Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. **Fish and Shellfish Immunology**, v.5, p.581–595, 1995.

PÖLKKI, M.; KANGASSALO, K.; RANTALA, M. J. Transgenerational effects of heavy metal pollution on immune defense of the blow fly *Protophormia terraenovae*. **PloS one**, v.7, n.6, p. e38832–e38832, 2012.

PROHASKA, J. R.; GYBINA, A. A. Intracellular copper transport in mammals. **The Journal of Nutrition**, v.134 p.1003–1006, 2004.

RAIJ, B. V; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. **Recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo**. 2. ed. Campinas: IAC, 1997. 285p. (Boletim técnico 100).

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

REIS FILHO, W. et al. Danos causados por diferentes níveis de desfolha artificial para simulação do ataque de formigas cortadeiras em *Pinus taeda* e *Eucalyptus grandis*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v.31, p.37-42, 2011.

ROH, J.Y. et al. Ecotoxicity of silver nanoparticles on the soil nematode *Caenorhabditis elegans* using functional ecotoxicogenomics. **Environmental Science & Technology**, v.43, p.3933–3940, 2009.

SHIYONG, Y. et al. Ecophysiological effects of heavy metals on insects. **Acta Entomologica Sinica**, v.58 n.4 p.427-436, 2015.

SILVA, D. G. **Efeito do fungo *Trichoderma harzianum* e do zinco em colônias de *Atta sexdens***. 2016. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais e Ambientais) – Universidade Federal Tocantins. Gurupi.

SORVARI, J. Heavy metal pollution disturbs immune response in wild ant populations. **Environmental Pollution**. v.145 p.324-328, 2007. DOI: 10.1016 / j.envpol.2006.03.004

SOUZA, de D.J. et al. Ectosymbionts and immunity in the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. **Behavior, and Immunity**, v.28, p.182–187, 2013. DOI: 10.1016 / j.bbi.2012.11.014

STRAND, M. R. The insect cellular immune response. **Insect Science** v.15 p.1–14, 2008. DOI: 10.1111/j.1744-7917.2008.00183.x

SUN, H. X. et al. Effects of dietary nickel on apoptosis of hemocytes of *Spodoptera litura* (Fabricius) larvae. **Science Bulletin**, v.55, p.390–397, 2010.

WU, G.; YI, Y. Effects of dietary heavy metals on the immune and antioxidant systems of *Galleria mellonella* larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology & Pharmacology**, v.167, p.131–139, 2015. DOI: 10.1016 / j.cbpc.2014.10.004

XIA, Q. et al. Apoptosis of *Spodoptera litura* larval hemocytes induced by heavy metal zinc. **Guren Chinese Science Bulletin**, v.50 n.24 p.2856-2860, 2005.

CAPÍTULO II

SUSCETIBILIDADE DE OPERÁRIAS DE *Atta sexdens* TRATADAS COM SULFATO DE ZINCO COMO IMUNOSSUPRESSOR AO *Metarhizium anisopliae*

RESUMO

Atta sexdens apresenta alta capacidade de reconhecimento de substâncias que podem prejudicar o desenvolvimento do fungo simbiote ou mesmo contaminar as operárias durante o forrageamento. É considerada uma das principais pragas da cultura do eucalipto e pinus, além de atacar inúmeras culturas. O uso de formicidas possui eficiência moderada devido ao comportamento eussocial desses insetos. Diante do exposto, objetivou-se verificar o aumento na mortalidade de operárias de *A. sexdens* tratadas com o fungo *M. anisopliae* após tratamento com $ZnSO_4$ como agente imunossupressor. O capítulo foi dividido em dois experimentos: O primeiro foi o teste de mortalidade com suspensões de *M. anisopliae*, sendo composto de três tratamentos: 10^5 , 10^6 e 10^7 conídios/mL do fungo *M. anisopliae*, com 3 repetições cada. Dentro de cada repetição as operárias foram divididas em 10 grupos com 10 operárias cada. Foi aplicado 1 μ L das suspensões no tórax das operárias, posteriormente foram colocadas em BOD. A avaliação da mortalidade ocorreu durante 10 dias, sendo as operárias mortas desinfetadas colocadas em Eppendorf por 10 dias até a extrusão do fungo. O segundo experimento foi o teste de mortalidade associando o $ZnSO_4$ com *M. anisopliae*, composto de TC: água destilada + 0,05% de Tween-80, T1: suspensão de 10^6 conídios/mL + 0,05% de Tween-80 de *M. anisopliae*, T2: 0,15 g/L de $ZnSO_4$, e T3: 0,15 g/L de $ZnSO_4$ + 10^6 conídios/mL de *M. anisopliae*. Cada tratamento foi composto por 3 repetições, divididas em 10 grupos com 10 formigas. A confirmação da mortalidade foi feita de acordo com o primeiro experimento. A concentração de 10^6 conídios/mL apresentou mortalidade intermediária, sendo escolhida para a segunda etapa do experimento. O $ZnSO_4$ possibilitou que fungos oportunistas se tornassem patogênicos. A associação de $ZnSO_4$ com *M. anisopliae* foi eficiente em favorecer a atividade de *M. anisopliae* aumentando a taxa de infecção e mortalidade de 30% (tratamento com apenas a suspensão do fungo) para 60%.

Palavras-Chave: Resistência. Fungos Entomopagênicos. Imunossupressão. Operárias.

SUSCEPTIBILITY OF *Atta sexdens* WORKERS TREATED WITH ZINC SULFATE AS IMMUNOSUPPRESSOR TO *Metarhizium anisopliae*

ABSTRACT

Atta sexdens has a high ability to recognize substances that may prejudice the development of the symbiotic fungus or to the workers during foraging. It is considered one of the main pests of the eucalyptus and pinus culture, in addition to attacking numerous crops. The use of chemical pesticides has moderate efficiency due to the eusocial behavior of these insects. In this sense, this work aimed to verify the increase of the mortality of *A. sexdens* workers treated with the fungus *M. anisopliae* after treatment with zinc sulfate as an immunosuppressive agent. The chapter was divided into two experiments: The first one was the mortality test with suspensions of *M. anisopliae*, and it was composed of three treatments: 10^5 , 10^6 and 10^7 conidia/mL of the fungus *M. anisopliae*, with 3 replicates each, which were divided into 10 groups with 10 workers each. One μl of the suspensions were applied to the thorax of the workers, then placed in BOD at $25 \pm 1^\circ \text{C}$ and $70 \pm 10\% \text{RH}$. Mortality of the workers was evaluated for 10 days. The dead workers were collected, disinfected and placed in Eppendorf for 10 days until extrusion of the fungus. The second experiment was the mortality test involving ZnSO_4 with *M. anisopliae*, consisting of control (TC): distilled water + 0.05% Tween-80; Treatment 1 (T1): suspension of 10^6 conidia / mL + 0.05% Tween-80 of *M. anisopliae*; Treatment 2 (T2): 0.15 g/L ZnSO_4 and Treatment 3 (T3): 0.15 g/L ZnSO_4 + 10^6 conidia/mL of *M. anisopliae*. Confirmation of mortality was done according to the first experiment. The concentration of 10^6 conidia / mL presented intermediate mortality, being chosen for the second stage of the experiment. Zinc sulfate allowed opportunistic fungi to become pathogenic. The association of ZnSO_4 with *M. anisopliae* was efficient in promoting the activity of *M. anisopliae* increasing the infection rate and mortality from 30% (treatment with fungus suspension only) to 60%.

Keywords: Resistance. Entomopathogenic Fungo. Immunosuppression. Workers

1 INTRODUÇÃO

A formiga-cortadeira *Atta sexdens*, comumente conhecida como saúva-limão, constitui-se como uma séria praga em sistemas agrícolas e florestais. Ela está presente na maior parte do território brasileiro, sendo uma das principais pragas da cultura de eucalipto (DELLA LUCIA, 2011).

Ao longo dos anos realizou-se o desenvolvimento de algumas estratégias de controle dessas formigas, sendo a mais importante delas o uso de iscas granuladas tóxicas que poluem o meio ambiente e possuem eficiência moderada devido ao comportamento eussocial desses insetos. Por exemplo, as formigas apresentam alta capacidade de reconhecimento de substâncias que podem prejudicar o desenvolvimento do fungo simbiote ou mesmo contaminar as operárias durante o forrageamento (MARINHO et al., 2006; DELLA LÚCIA et al., 2014; BRITTO et al., 2016).

Atualmente procura-se formas de viabilizar o controle biológico, em especial com a utilização de fungos entomopatogênicos. Testes de laboratório têm conseguido demonstrar a alta virulência de algumas espécies de fungos entomopatogênicos. Couceiro et al. (2016) testaram a virulência dos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Aspergillus ochraceus* em *Acromyrmex subterraneus*, apresentando respostas positivas. Assim como Castilho et al. (2010) atestaram a virulência do *M. anisopliae* e *Beauveria bassiana* em soldados de *A. sexdens* e *A. bisphaerica*. Todavia, este método de controle enfrenta dificuldades em romper os eficientes mecanismos de defesa das formigas-cortadeiras.

Uma estratégia que pode ser adotada para potencializar a eficácia de fungos entomopatogênicos no controle de formigas-cortadeiras é o uso de agentes imunossupressores, ou seja, substâncias que permitem reduzir a ativação ou eficácia do sistema imunológico. Em combinação com um agente imunossupressor, várias espécies oportunistas podem se tornar agentes de controle natural de formigas-cortadeiras (DORNELAS et al., 2017).

Estudos sobre a utilização de agentes que aumentem a ação patogênica dos fungos vem sendo desenvolvidos, por exemplo, a associação de doses subletais do inseticida químico Spinosad ao fungo *M. anisopliae* que elevou a mortalidade de moscas domésticas de 72% (apenas com o fungo) para 95% (SHARIFIFARD et al., 2011).

Metais pesados podem ser prejudiciais aos insetos herbívoros causando estresse oxidativo, resultante de um desequilíbrio de oxidantes e antioxidantes (SUGANYA et al., 2015). Resulta em mudanças na genética de insetos, pode induzir apoptose e afetar a viabilidade e a proliferação de células, afetando o crescimento, reprodução de insetos e levando-os a morte (AMDAM et al., 2007). Normalmente, os metais pesados, como o zinco, desempenham papéis fisiológicos essenciais nas plantas, não sendo menos prejudiciais ao ambiente em relação a inseticidas químicos.

Assim, objetiva-se com esse estudo verificar o aumento na mortalidade de operárias de *A. sexdens* tratadas com o fungo *M. anisopliae* após tratamento com sulfato de zinco como agente imunossupressor.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta das operárias no campo e manutenção em laboratório

Realizou-se a coleta no período mais fresco do dia, ou seja, entre 8 e 10 horas da manhã, nos meses de fevereiro a outubro de 2018, na fazenda experimental da Universidade Federal do Tocantins, Campus Gurupi. Foram selecionados ao acaso três ninhos, os quais possuíam intensa atividade de forrageamento. Foram escolhidas as operárias que estavam em volta do ninho e que possuíam largura da cápsula cefálica em torno de 2,0 - 2,5 mm.

A coleta foi realizada com o auxílio de pinças e as formigas foram acondicionadas em potes plásticos de 250 ml com pequenos furos na tampa para permitir circulação de ar. O tempo necessário de transporte entre o local de coleta e o laboratório foi de 15 minutos, sendo feito rapidamente para que as formigas não sofressem estresse.

2.2 Isolamento do fungo *Metarhizium anisopliae*

Para o estudo, foi utilizado o isolado de *Metarhizium anisopliae* foi obtido por uma larva de *Tenebrio molitor* mantida em contato com solo de mata do Câmpus Universitário de Gurupi empregando-se a técnica de isca (Depositado na Coleção Microbiana da UNESP com o código CRM 1397).

2.3 Infecção das operárias para teste de mortalidade com suspensões de *M. anisopliae*

As concentrações do fungo foram determinadas tendo como referência Loureiro et al. (2005), Castilho et al. (2010), Ribeiro et al. (2012) e Couceiro et al., (2016), trabalhos prévios que testaram várias concentrações de fungos entomopatogênicos em operárias de saúvas. O experimento foi composto de três tratamentos: 10^5 , 10^6 e 10^7 conídios/mL do fungo *M. anisopliae*, com 3 repetições cada. Dentro de cada repetição as operárias foram divididas em 10 grupos com 10 operárias cada. No total, foram utilizadas 1200 operárias de *A. sexdens* com largura da cápsula cefálica em torno de 2,0 - 2,5 mm. O tratamento controle consistiu da aplicação de água destilada autoclavada + 0,05% de Tween-80 aplicados no tórax das operárias.

Em câmara de fluxo laminar, cada operária recebeu 1 μ L de suspensão no tórax em cada tratamento correspondente com o auxílio de pipeta. Após a aplicação, foram

aconditionadas em potes de 1000 mL, com perfurações na tampa. Foi fornecido algodão estéril embebido em solução com água destilada e mel (1:1) para alimentação das mesmas. Posteriormente, os tratamentos foram colocados em BOD à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas. A avaliação da mortalidade não cumulativa foi realizada diariamente por dez dias. A cada dia de avaliação foram coletadas as operárias mortas e desinfetadas em solução com 70% de etanol, 4% de hipoclorito de sódio e água destilada estéril por 10 segundos e colocadas em tubos Eppendorf autoclavados com algodão úmido em água destilada. Por dez dias, os tubos foram armazenados na incubadora à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$, a fim de verificar a extrusão do fungo, confirmando então se a morte foi causada pelo entomopatógeno. A suspensão que apresentasse porcentagem de mortalidade moderada, que não ocasionasse alta mortalidade em pouco tempo seria escolhida para a segunda fase do experimento.

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 de 5%, e o programa utilizado foi o StatSoft Statistica® 7.0. Para obtenção dos valores de TL_{50} (em dias) foi realizada a análise de Probit nos tratamentos.

2.4 Teste de mortalidade associando $ZnSO_4$ ao fungo *M. anisopliae*

Nesta fase, os tratamentos foram dispostos da seguinte maneira: tratamento controle: água destilada + 0,05% de Tween-80, T1: suspensão de *M. anisopliae* 10^6 conídios/mL + 0,05% de Tween-80 T2: 0,15 g/L de $ZnSO_4$, e T3: 0,15 g/L de $ZnSO_4$ + 10^6 conídios/mL de *M. anisopliae*. Cada tratamento foi composto por 3 repetições, dentro de cada repetição as operárias foram divididas em 10 grupos com 10 formigas. No experimento foram utilizadas 1200 operárias de *A. sexdens* com largura da cápsula cefálica em torno de 2,0-2,5 mm.

A execução do experimento foi realizada em câmara de fluxo laminar e a aplicação do $ZnSO_4$ foi feita por meio de imersão das operárias em solução de 0,15 g/L. Cada operária foi mergulhada individualmente durante o período de 20 segundos, posteriormente foram dispostas sobre folhas de papel filtro, previamente esterilizado, para retirar o excesso de solução. A suspensão de *M. anisopliae* 10^6 conídios/mL foi aplicada com o auxílio de microseringas, sendo 1 μL da suspensão no tórax das operárias.

No tratamento T3, primeiramente foi realizada a imersão das operárias e após o período de 3 horas foi aplicada a suspensão para que a solução de ZnSO₄, fosse absorvida pelo exoesqueleto e não houvesse interação entre a substância e a suspensão conidial, prejudicando o efeito do *M. anisopliae*. Após a aplicação dos tratamentos, cada grupo com 10 operárias foi acondicionado em potes de 1000 mL, com perfurações na parte superior, e foi fornecida uma solução com água destilada autoclavada e mel (1:1) em algodão estéril, para alimentação das operárias. Posteriormente, os tratamentos foram colocados na BOD à temperatura de 25 ± 1°C, umidade relativa de 70 ± 10% e fotoperíodo de 12 horas. A avaliação da mortalidade não cumulativa foi realizada diariamente por dez dias.

Para confirmar a mortalidade causada pelo fungo, as formigas mortas foram desinfetadas em solução com 70% de etanol, 4% de hipoclorito de sódio e água destilada estéril por 10 segundos, depois secas em papel de filtro em uma câmara de fluxo laminar, colocando-as em tubos de Eppendorf contendo um algodão úmido e estéril e mantidas em uma incubadora a 25 ± 1 °C até o crescimento fúngico.

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® 7.0. Para obtenção dos valores de TL₅₀ (em dias) foi realizada a análise de Probit nos tratamentos.

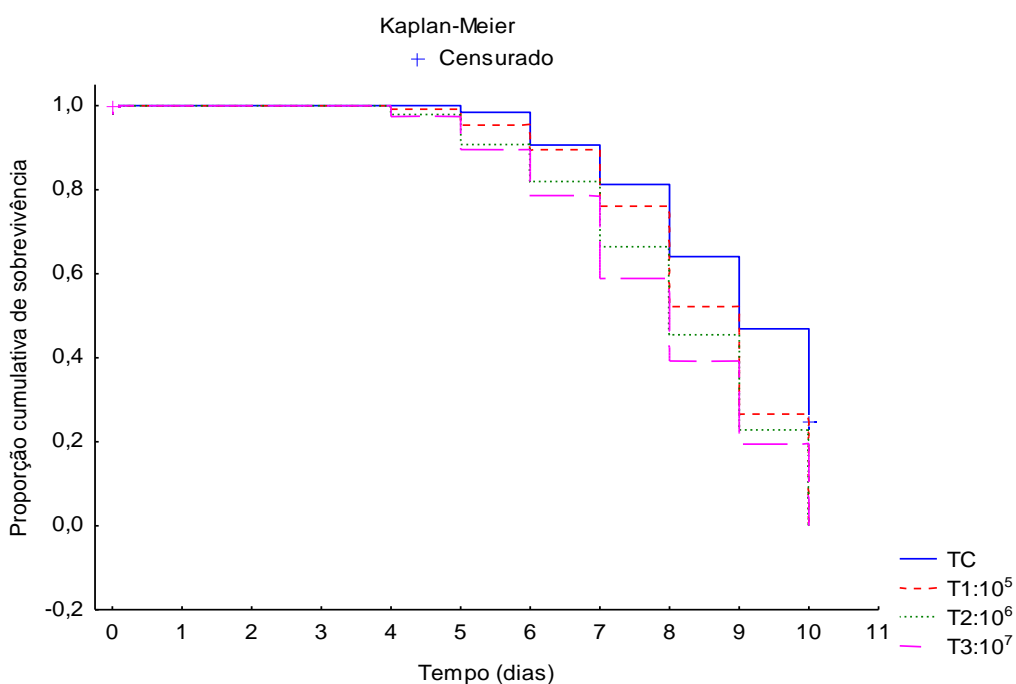
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teste de mortalidade com as suspensões 10^5 , 10^6 e 10^7 conídios/mL

Embora a alta mortalidade do tratamento controle indique que as formigas foram estressadas de alguma forma (por exemplo, isolamento social) e, portanto, provavelmente mais suscetíveis a doenças, os tratamentos com todas as concentrações de suspensões de conídios de *M. anisopliae* provocaram elevada mortalidade das operárias de *A. sexdens* (Figura 1). Castilho et al. (2010) avaliaram concentrações de *M. anisopliae* que mostraram ser altamente patogênicas em laboratório, embora testes à campo não reproduzam as mesmas respostas. Os resultados também corroboram com Loureiro et al. (2005) que constataram a patogenicidade de variedades de isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana*.

A ação patogênica dos fungos foi evidenciada a partir do 4º dia após a inoculação em todas as concentrações e a maior mortalidade foi verificada na suspensão com 10^7 conídios/mL com 51% de mortalidade. Já o tratamento com 10^6 conídios/mL, mesmo apresentando mortalidade geral de 44% não apresentou diferença significativa na mortalidade quando comparado a maior dose (mortalidade de 51%) e a menor dose (mortalidade de 38%).

Figura 1 - Teste de sobrevivência com operárias de *A. sexdens*, em que Tratamento Controle (TC), suspensões do fungo *M. anisopliae* (T1) 10^5 , (T2) 10^6 , (T3) 10^7 conídios/mL. $\chi^2 = 24,41$, $df = 3$, $P < 0,001$, +Censurado: operárias sobreviventes ao final de dez dias. Fonte: Dados da pesquisa.



Na comparação, dois a dois, pelo teste de Log-Rank, observou-se que não houve diferença significativa na comparação entre os tratamentos com 10^5 e 10^6 conídios/mL, assim como a comparação dos tratamentos com 10^6 e 10^7 conídios/mL (Tabela 1). Porém, houve diferença no tempo de sobrevivência das operárias submetidas ao tratamento 10^5 , quando comparado ao tratamento 10^7 .

A suspensão conidial 10^6 não ter se diferenciado dos outros tratamentos contendo suspensões sugere que esta concentração pode ser suficiente para obter resultados satisfatórios, pois, tornou-se uma dose intermediária, visto que a dose elevada causou alto índice de mortalidade e a dose mais baixa pode não ter o resultado esperado, ou seja, não apresentar eficiência ao associar a suspensão a um imunossupressor. Esta concentração conidial foi utilizada em estudos com formigas cortadeiras por Ribeiro et al. (2012) e Couceiro et al. (2016), pois, não causa mortalidade em curto espaço de tempo devido concentrações elevadas de conídios, que poderia interferir a análise de dados posteriores

Tabela 1 - Comparação dois a dois das curvas de mortalidade de operárias de *A. sexdens* pelo teste de Log- Rank, com nível de significância de 5%.

| Concentração (conídios/ml) | Trat. Controle | 10^5 | 10^6 | 10^7 |
|----------------------------|----------------|---------|---------|---------|
| Trat. Controle | - | P<0,001 | P<0,001 | P<0,001 |
| 10^5 | P<0,001 | - | 0,204 | 0,018 |
| 10^6 | P<0,001 | 0,204 | - | 0,276 |
| 10^7 | P<0,001 | 0,018 | 0,276 | - |

Fonte: Dados da pesquisa.

A concentração conidial 10^7 conídios/mL foi a mais patogênica dentre as avaliadas, sendo observado um TL_{50} de 5,43 dias. Já as operárias do controle não obtiveram o TL_{50} até o décimo dia de avaliação (Tabela 2). O tratamento contendo a concentração 10^6 conídios/mL apresentou um TL_{50} próximo ao tratamento com 10^5 conídios/mL. Analisando as doses do isolado, em função do tempo após a inoculação, observou-se que todos os isolados foram altamente virulentos quando comparados a testemunha.

Há poucos trabalhos que avaliam a patogenicidade de fungos em operárias de *A. sexdens*, com base no TL_{50} . A mortalidade acumulada de ninfas de primeiro instar do *T. limbativentris*, expostas às concentrações de *M. anisopliae* 5×10^6 conídios/mL com TL_{50} de 6 dias e 5×10^7 conídios/mL com TL_{50} de 5 dias, diferiram do

controle. No entanto, não houve diferença significativa na mortalidade das ninfas comparando os tratamentos com o fungo (SILVA, 2012). Yek et al. (2012), utilizando *M. anisopliae* na concentração com 10^7 conídios/mL, igualmente encontraram grande diferença entre testemunha e tratamentos, confirmando o potencial da concentração em causar elevada mortalidade. Em experimentos visando o controle de formigas em campo, concentrações muito altas não seriam ideais, pois 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).

Tabela 2 - Tempos letais médios (TL_{50}), obtidos pela análise de Probit para concentrações de conídios de *M. anisopliae* em operárias de *A. sexdens*

| Tratamentos (conídios/mL) | TL_{50} (Dias) | IC* | Modelo Linear | r^2 |
|------------------------------|---------------------|-----------------|----------------------------|-------|
| Controle | 10,50 | $9,3 \pm 11,70$ | $y = -0,1573 + 0,0575 * x$ | 0,84 |
| 10^5 | 6,31 | $5,80 \pm 6,81$ | $y = -0,348 + 0,1323 * x$ | 0,88 |
| 10^6 | 5,89 | $5,50 \pm 6,29$ | $y = -0,3115 + 0,137 * x$ | 0,93 |
| 10^7 | 5,43 | $4,97 \pm 5,89$ | $y = -0,2829 + 0,1445 * x$ | 0,90 |

*Intervalo de Confiança. Fonte: Dados da pesquisa.

Sobre a porcentagem de formigas que apresentaram extrusão do fungo entomopatogênico após desinfecção e acondicionamento em Eppendorf, constatou-se que nas concentrações 10^5 , 10^6 e 10^7 denotaram extrusão do fungo de com 23%, 33% e 43% respectivamente.

A mortalidade total, observada no teste “in vitro” pode ter sido favorecida por fatores como o estresse pelo manuseio, morte por fungos oportunistas e por apresentarem grande variabilidade genética, que contribuem para diferenças de patogenicidade e virulência (SANTOS et al., 2007). Entretanto, o *M. anisopliae* foi eficiente na esporulação sobre os cadáveres das operárias. Isso é uma prova da capacidade do fungo em penetrar e colonizar, causando-lhes, então, a morte (DIEHL-FLEIG et al., 1988). Além disso, a mortalidade confirmada pode ser escolhida como parâmetro para se estudar o comportamento da melhor dose, pois os fungos, como agente de controle biológico, diferem fundamentalmente dos produtos químicos, pela capacidade de aumento da densidade do patógeno por meio da dispersão do inóculo (HAJEK; ST. LEGAR, 1994).

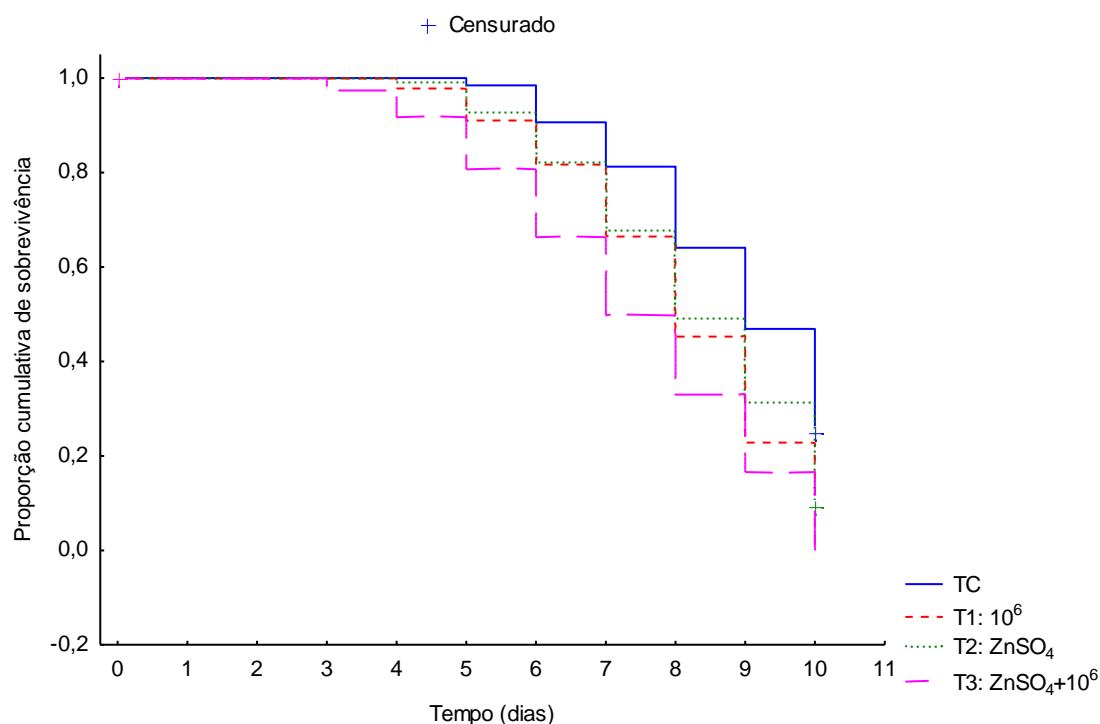
3.2 Teste de mortalidade associando o ZnSO₄ ao fungo *M. anisopliae*

Houve diferença significativa entre os tratamentos, expressando a capacidade do fungo *M. anisopliae* de levar as operárias à mortalidade (Figura 2).

O tratamento apenas com a suspensão do fungo (tratamento T1) apresentou mortalidade das operárias semelhante o tratamento contendo apenas sal de zinco (tratamento T2).

A associação do imunossupressor e suspensão do fungo (tratamento T3) obteve maior mortalidade de operárias em relação aos outros tratamentos. Fato que pode ser justificado devido à redução na resposta imune das operárias pela ação do ZnSO₄, comprometendo o sistema de defesa contra um fungo entomopatogênico, elevando a mortalidade para 100% a partir do 7º dia com uma dose de esporos que, sem o imunossupressor, provoca baixa mortalidade. Resultado semelhante ao encontrado por DORNELAS et al. (2017), que argumentam que imunossupressor Sandimmun Neoral favorece a atividade de *M. anisopliae* contra a *A. sexdens*, aumentando taxa de mortalidade para 80% em seis dias.

Figura 2 - Teste de sobrevivência com operárias de *A. sexdens*, em que (TC) Tratamento Controle, (T1) suspensão do fungo *M. anisopliae* com 10⁶ conídios/mL, (T2) dose de 0,15 g/L de ZnSO₄, (T3) dose de 0,15 g/L de ZnSO₄ +10⁶ conídios/mL do fungo *M. anisopliae*. $\chi^2 = 30,165$; $df=3$; $P < 0,001$, +Censurado: operárias sobreviventes ao final de dez dias. Fonte: Dados da pesquisa.



Os resultados indicam que o sal de zinco (tratamento T2) provocou redução da resposta imune, verificada na mortalidade das operárias. Segundo Pereira (2014), em estudo utilizando a ciclosporina como imunossupressor em operárias de *A. sexdens*, considera que a substância provoca rápida redução na população de hemócitos no período de 24 horas, esse efeito provoca redução na proteção contra patógenos. Metais pesados são conhecidos por ser estímulo típico para desencadear a apoptose (RAJARAM et al., 1995). O zinco é um dos principais metais pesados que induzem a apoptose celular (LOHMANN; BEYERSMANN, 1993).

As análises feitas entre os pares de grupos por Log-Rank apontaram diferenças significativas na comparação entre todos os tratamentos exceto a comparação entre 10^6 conídios/mL e o tratamento $ZnSO_4$ (Tabela 3).

Tabela 3 - Comparação dois a dois das curvas de mortalidade de operárias de *A. sexdens* pelo teste de Log-Rank, com nível de significância de 5%.

| Tratamentos | Trat. Controle | 10^6 | $ZnSO_4$ | $ZnSO_4 + 10^6$ |
|-----------------|----------------|---------|----------|-----------------|
| Trat. Controle | - | P<0,001 | 0,005 | P<0,001 |
| 10^6 | P<0,001 | - | 0,066 | 0,008 |
| $ZnSO_4$ | 0,005 | 0,066 | - | P<0,001 |
| $ZnSO_4 + 10^6$ | P<0,001 | 0,008 | P=0,001 | - |

Fonte: Dados da pesquisa.

Ao observar o tempo médio para matar 50% das operárias, o tratamento controle não apresentou TL_{50} até o décimo dia de avaliação (Tabela 4). Já o tratamento com apenas o $ZnSO_4$ apresentou o maior tempo letal com 7,63 dias, seguido do tratamento com a suspensão conidial com 5,89 dias. O menor tempo foi a associação do $ZnSO_4$ com *M. anisopliae* (Tabela 4). Este resultado sugere que o sal de zinco potencializou os efeitos patogênicos do fungo. Respostas com grande potencial para o controle dessa praga severa.

Tabela 4 - Tempos letais médios (TL_{50}), obtidos pela análise de Probit para concentração 10^6 conídios/mL de *M. anisopliae*, $ZnSO_4$ e associação 0,15 g/L de sulfato de zinco com 10^6 conídios/mL de *M. anisopliae*, em operárias de *A. sexdens*.

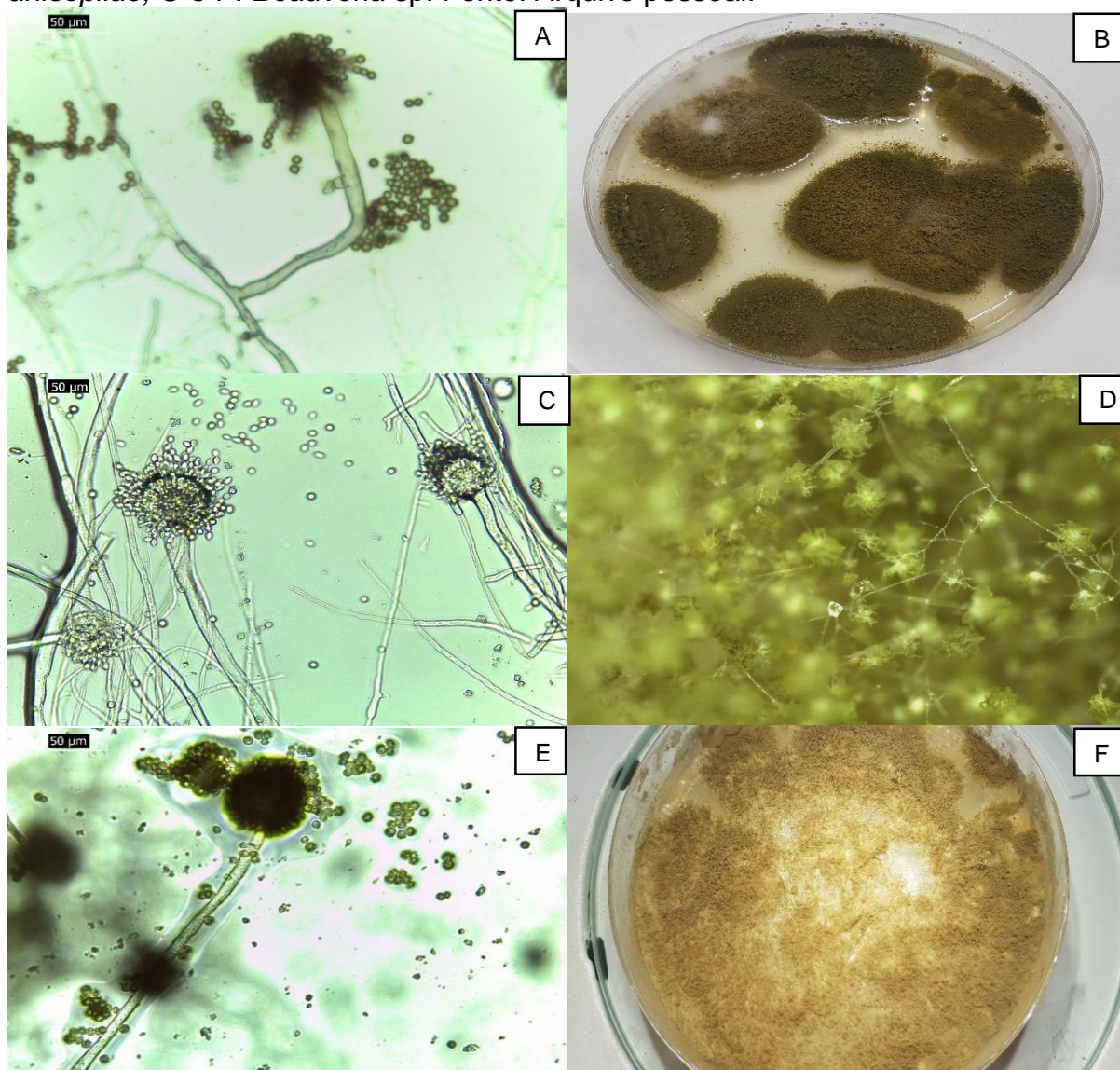
| Tratamentos | TL_{50} (Dias) | IC* | Modelo Linear | r^2 |
|-----------------|------------------|-----------------|----------------------------|-------|
| Trat. controle | 10,50 | $9,9 \pm 11,70$ | $y = -0,1573 + 0,0575 * x$ | 0,84 |
| 10^6 | 5,89 | $5,50 \pm 6,29$ | $y = -0,3115 + 0,137 * x$ | 0,93 |
| $ZnSO_4$ | 7,63 | $7,15 \pm 8,12$ | $y = -0,2128 + 0,0913 * x$ | 0,93 |
| $ZnSO_4 + 10^6$ | 4,83 | $4,33 \pm 5,32$ | $y = -0,1441 + 0,1359 * x$ | 0,89 |

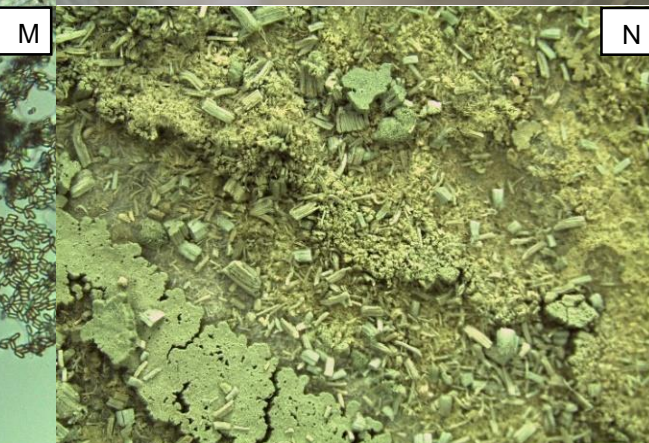
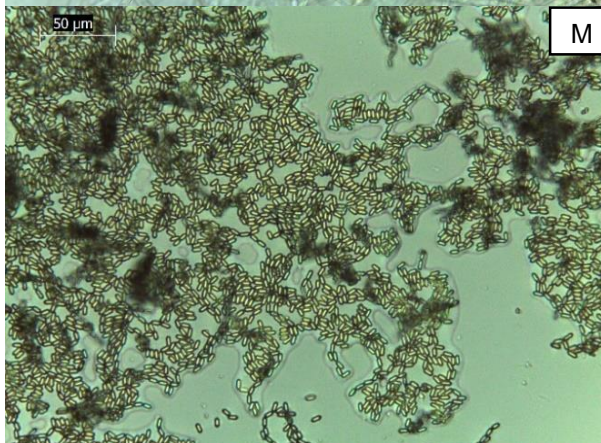
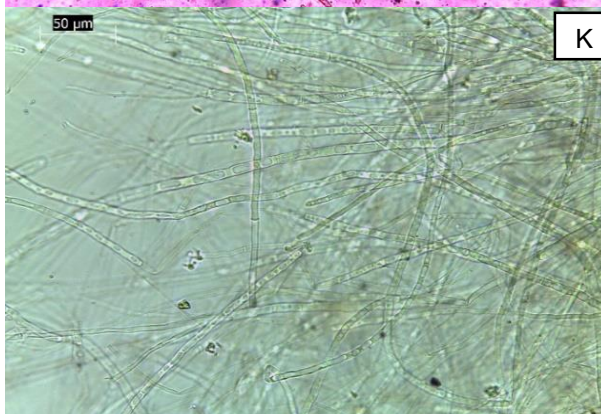
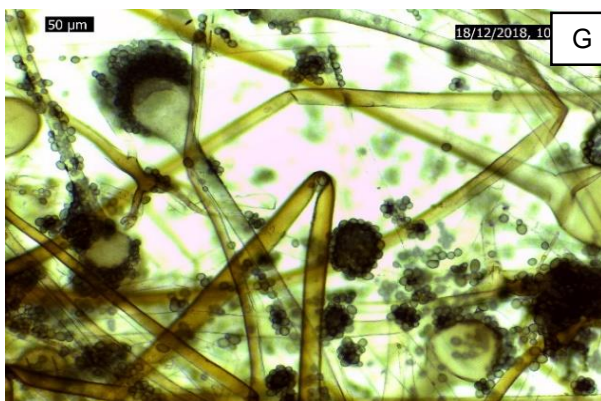
*Intervalo de Confiança. Fonte: Dados da pesquisa.

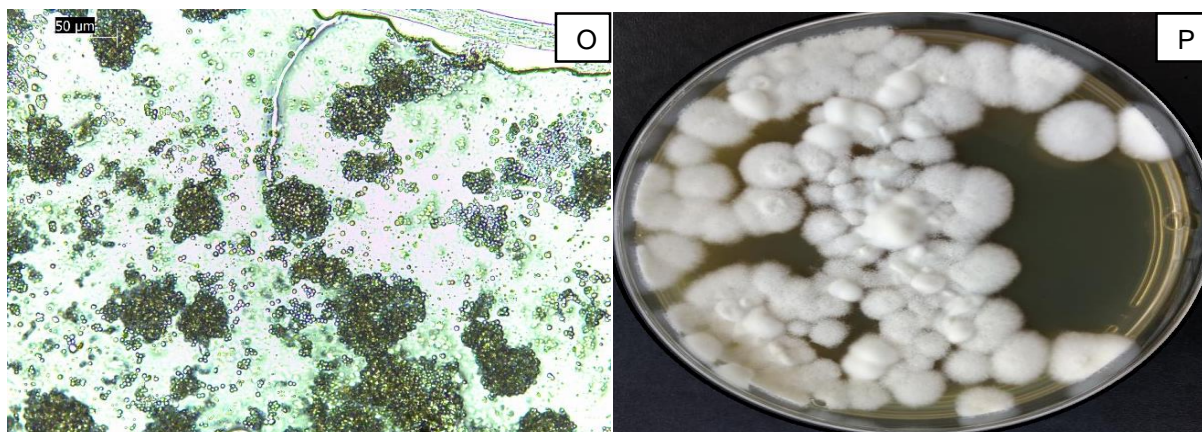
O tratamento composto apenas por $ZnSO_4$, mostrou que a mortalidade ocorrida sucedeu-se não apenas pelo efeito de estresse ou da dose aplicada, houve (11% a mais em relação a testemunha) extrusão de fungos que normalmente não seriam patogênicos, como *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp. *Fusarium* sp., *Mycelia Sterilia*, *Beauveria* sp. além do próprio *M. anisopliae* (Figura 3).

Os patógenos oportunistas são aqueles microrganismos que podem causar uma infecção após o organismo hospedeiro ter sofrido alguma perturbação, tais como fermentos, infecções primárias, imunodeficiência e envelhecimento (CASADEVALL; PIROFSKI, 2000).

Figura 3 - Imagens de fungos oportunistas que esporularam nos cadáveres das operárias do tratamento contendo apenas aplicação de 0,15 g/L do $ZnSO_4$, em que as figuras A e B: *Aspergillus* sp. 1, C e D: *Aspergillus* sp. 2, E e F: *Aspergillus* sp. 3, G e H: *Rhizopus* sp., I e J: *Fusarium* sp., K e L: *Mycelia Sterilia*, M e N: *Metarhizium anisopliae*, O e P: *Beauveria* sp. Fonte: Arquivo pessoal.







Ao observar a extrusão do patógeno nas operárias mortas no tratamento com $ZnSO_4$ com o fungo entomopatogênico, pôde-se confirmar que a infecção obteve eficiência de 60% em relação ao tratamento com apenas a suspensão conidial 10^6 que, obteve apenas 30%. Santos et al. (2007) afirmam que no caso de formigas-cortadeiras, deve-se utilizar isolados moderadamente patogênicos com outro agente que interfira no comportamento defensivo das formigas, permitindo que o fungo se estabeleça. O mesmo comprova ainda, que utilizando doses subletais de Imidaclopride associadas ao fungo *B. bassiana* a mortalidade foi 20% maior em relação ao fungo sozinho.

Todavia, enquanto mostram sua potencialidade como imunossupressores, neonicotinóides (SANTOS et al., 2007; GALVANHO et al., 2013) deveriam ser evitados por terem ação sistêmica e persistência no ambiente (PEREIRA, 2014). O que tem-se buscado, são agentes que causem imunossupressão, porém, que essas substâncias não contaminem o meio ambiente, como o zinco, por exemplo, que é um micronutriente essencial no desenvolvimento da plantas, presente em funções fisiológicas, está intimamente relacionado à síntese de proteínas dado que é um nutriente essencial para a manutenção da integridade estrutural dos ribossomos e da RNA polimerase, enzima polimerizadora de nucleotídeos para a síntese do RNA. (MARSCHNER, 2011).

Outro fator importante é que os solos do Cerrado apresentam teores totais de Cu, Zn e Mn equivalentes à metade do valor da média mundial devido ao intenso processo de intemperismo (MARQUES et al., 2004). A baixa biodisponibilidade de Zn aliada a exigência nutricional são fatores relevantes, pois a aplicação de pequenas concentrações desse micronutriente na forma de sulfato é benéfico para a planta e não há risco de causar toxicidade, tornando o controle biológico mais eficiente.

4 CONCLUSÃO

1. A concentração de 10^6 conídios/mL apresentou mortalidade intermediária, sendo escolhida para a segunda etapa do experimento.
2. O $ZnSO_4$ possibilitou que fungos oportunistas se tornassem patogênicos.
3. A associação de $ZnSO_4$ com *M. anisopliae* foi eficiente em favorecer a atividade de *M. anisopliae* aumentando a taxa de infecção e mortalidade de 30% (tratamento com apenas a suspensão do fungo) para 60%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMDAM, G.V. et al. Variation in endocrine signaling underlies variation in social life history. **The American Naturalist**, v.170, p.37-46, 2007. DOI: 10.1086 / 518183
- BRITTO, J.S et al. Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*. **International Journal of Research in Environmental Studies**, v.3, p.11-92, 2016.
- CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A. Host-Pathogen Interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. **Infection and Immunity**. Washington, v.68, n.12, p. 6511–6518, 2000.
- 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. **Ciencia Rural**, v.40, n.6, p.1243–1249, 2010. DOI: 10.1590/S0103-84782010005000100.
- COUCEIRO, J. da C. et al. Effects of entomopathogenic fungi on the mortality and immune system of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.161, n.2, p.152-159, 2016. DOI:10.1111/eea.12500. DOI: 10.1111/eea.12500
- DELLA LUCIA, T. M. C; GANDRA L.C; GUEDES R.N.C; Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. **Pest Management Science** v.70, p.14–23, 2014.
- DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Editora UFV, 2011.
- DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M. E.; PACHECO, M. R. M. Testes de patogenicidade dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em *Atta sexdens piriventris* (Santschi, 1919) em diferentes temperaturas. **Ciência e Cultura**, v.40, n.11, p.1103-1105, 1988.
- DORNELAS, A. S. P. et al. Susceptibility of *Atta sexdens* worker ants treated with the immunosuppressant Sandimmun Neoral to *Metarhizium anisopliae*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 52, n. 2, p.133-136, 2017. DOI: 10.1590/s0100-204x2017000200008.
- GALVANHO, J. P. et al. Imidacloprid inhibits behavioral defences of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera:Formicidae). **Journal of Insect Behavior**. v.26 p.1-13, 2013. DOI: 10.1007/s10905-012-9328-6.
- HAJEK, A. E.; ST. LEGER, R. J. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. **Annual Review of Entomology** v.39, p.293-322, 1994. DOI: 10.1146/annurev.en.39.010194.001453.
- HUGHES, W. O. H.; BOOMSMA, J. J. Let your enemy do the work: within-host interactions between two fungal parasites of leafcutting ants. **The Royal Society's**

Flagship Biological Research Journal, v.6, p.104, 2004. DOI: 10.1098 / rsbl.2003.0115

LOHMANN, R.; BEYERSMANN, D. Cadmium and zinc mediated changes of the Ca²⁺ dependent endonuclease in apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.190, p.1097-1103, 1993. DOI: 10.1006 / bbrc.1993.1162.

LOUREIRO, E. de S.; MONTEIRO, A. C. Patogenicidade de isolados de três fungos entomopatogênicos a soldados de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Árvore**, v.29, n.4, p.553-561, 2005. DOI: 10.1590/S0100-67622005000400007.

MARINHO, C.G.S.; DELLA LÚCIA T.M.C.; PICANÇO, M.C. Fatores que dificultam o controle das formigas-cortadeiras. **Bahia Agrícola**, v.7, n.2, p.18-21, 2006.

MARQUES J. J. et al. Trace element geochemistry in Brazilian Cerrado soils. **Geoderma**, v.121, p.31-43, 2004. DOI: 10.1016/j.geoderma.2003.10.003

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. (ed. 3), New York, Academic Press. (2011).

PEREIRA A. S. **Fungos associados e ação do imunossupressor ciclosporina A sobre formigas-cortadeiras**. 2014. 81f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Tocantins. Tocantins.

RAJARAM, R.; NAIR, B. U.; RAMASAMI, T. Chromium III-induced abnormalities in human lymphocytes cell proliferation: Evidence for apoptosis, **Biochemical and Biophysical Research Communications** v.210 p.434- 440, 1995. DOI: 10.1006/bbrc.1995.1679.

RIBEIRO, M. M. R et al. Diversity of fungi associated with *Atta bisphaerica* (Hymenoptera: Formicidae): the activity of *Aspergillus ochraceus* and *Beauveria bassiana*. **Psyche**, 2012.

SHARIFIFARD M. et al. Interactions between entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* and sublethal doses of spinosad for control of house fly, *Musca domestica*. **Journal of Arthropod-Borne Diseases**, v.5 p.28-36, 2011.

SANTOS, A.V; de OLIVEIRA, B. L; SAMUELS, R. I. Selection of entomopathogenic fungi for use in combination with sublethal doses of imidacloprid: perspectives for the control of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). **Mycopathologia, Netherlands**, v.163, n.4, p.223-240, 2007. DOI: 10.1007/s11046-007-9009-8.

SILVA, R. A. **Estudo de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok: Toxicidade a compostos extraídos de *Tibraca limbativentris* Stal (Heteroptera: Pentatomidae), efeitos de agroquímicos utilizados na cultura do arroz e aumento da patogenicidade a *T. limbativentris* com doses subletais de inseticidas químicos**. 2012. 148f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiás.

SUGANYA, M.; KARTHI S.; SHIVAKUMAR, M, S. Effect of cadmium and lead exposure on tissue specific antioxidant response in *Spodoptera litura*. **Radicals Livres e Antioxidantes**, v.6, n.1, p.90-100, 2015. DOI: 10.5530/fra.2016.1.11.

YEK, S. H, NASH, D. R; JENSEN A.B; BOOMSMA J. J. Regulation and specificity of antifungal metapleural gland secretion in leaf-cutting ants. **Proceedings of the Royal Society B**. v.279 p.4215–4222, 2012. DOI: 10.1098 / rspb.2012.1458.