

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
VETERINÁRIA

DISSERTAÇÃO

**CONTROLE DA SAÚVA MATA-PASTO *Atta bisphaerica* E SAÚVA
LIMÃO *Atta sexdens rubropilosa* ATRAVÉS DOS FUNGOS
ENTOMOPATOGÊNICOS *Metarhizium anisopliae* E *Beauveria
bassiana***

ALZIMIRO MARCELO CONTEIRO CASTILHO

2005



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
VETERINÁRIA**

**CONTROLE DA SAÚVA MATA-PASTO *Atta bisphaerica* E SAÚVA
LIMÃO *Atta sexdens rubropilosa* ATRAVÉS DOS FUNGOS
ENTOMOPATOGÊNICOS *Metarhizium anisopliae* E *Beauveria
bassiana*.**

ALZIMIRO MARCELO CONTEIRO CASTILHO

Sob a Orientação do Professor
Carlos Alberto da Rocha Rosa

e Co-orientação do Professor
Marcelo Elias Fraga

Dissertação submetida como requisito parcial para
obtenção do grau de **Mestre em ciências**, em
Microbiologia Veterinária.

Seropédica, RJ
Julho, de 2005

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA**

ALZIMIRO MARCELO CONTEIRO CASTILHO

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em ciências**, em Microbiologia Veterinária.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 29/07/2005

Carlos Alberto da Rocha Rosa Ph.D.
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Marcelo Elias Fraga Dr.
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Elen de Lima Aguiar Menezes Dra.
EMBRAPA /Agrobiologia

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Sebastião Mello Castilho† e Edi
Conteiro Castilho pelo amor e dedicação e incentivo;
As minhas filhas Paula e Marcella e a minha Irmã
Kátia e minha tia Lucy, convivência e solidariedade;
À Mônica Nascimento Silva de Mattos pelo
companheirismo, carinho, compreensão e motivação
para novas conquistas.

AGRADECIMENTOS

- Aos professores Drs. Carlos Alberto da Rocha Rosa e Marcelo Elias Fraga do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária do IV/UFRRJ pela orientação e co-orientação confiança na realização deste trabalho.
- Aos professores Dr. Aldir de Oliveira de Carvalho e Dra. Margarida Goréte Ferreira do Carmo do Departamento de Fitotecnia IA/UFRRJ pelo constante incentivo e amizade.
- A coordenação do Curso de Pós-graduação em Microbiologia Veterinárias pela atenção e disponibilidade.
- À pesquisadora Dra. Elen de Lima Aguiar Menezes do Laboratório de Entomologia e Controle Biológico da EMBRAPA/Agrobiologia pela orientação no critério de amostragem e estudos estatísticos empregados nos experimentos.
- À professora Dra. Vânia R. E. P. Bittencourt do Departamento de Parasitologia IV/UFRRJ pela orientação no critério de amostragem e estudos estatísticos empregados nos experimentos e constante incentivo.
- Aos professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária da IV/UFRRJ.
- À pesquisadora Dra. Janaina Ribeiro Costa do Laboratório de Estatística da EMBRAPA/Agrobiologia pela orientação no critério de amostragem e estudos estatísticos empregados nos experimentos.
- À pesquisadora Dra. Maria do Carmo Araújo Fernandes da PESAGRO-RIO, pelo constante incentivo.
- Aos alunos de Doutorado em Fitotecnia Arison José Pereira e Viviane Fernandes Moreira, pelo constante incentivo, apoio e amizade.
- Ao aluno de graduação do curso de Engenharia Agrônômica estudante Fábio Mathias Correia.
- Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia do IB/UFRRJ pelo auxílio técnico.
- Ao amigo, Flávio de Souza Lopes, pelo apoio e amizade.
- A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Alzimiro Marcelo Conteiro Castilho, filho de Sebastião Mello Castilho† e Edi Conteiro Castilho, nasceu em 03 de junho 1968 no Hospital dos Servidores do Estado do Rio de Janeiro na rua Sacadura Cabral Rio de Janeiro/RJ.

Iniciou suas atividades escolares no Centro Educacional Arlinda Donadello Moreira em 1974, terminando-as no Colégio Campo Grande em 1982, ambos no Estado do Rio de Janeiro.

O segundo grau foi realizado no período de 1984 a 1986 no Instituto de Educação Geraldo de Almeida, Belfor Roxo - RJ, concomitantemente com o curso profissionalizante Técnico em Contabilidade.

Em 1988, iniciou o Curso de Graduação em Ciências Biologia da Universidade de Nova Iguaçu tendo concluído no ano de 1992.

Ingressou no ano 2000 no Curso de Especialização em Tecnologia de Sementes na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - Instituto de Agronomia - Departamento de Fitotecnia, concluído em 2001.

Em março de 2004 ingressou no curso de Pós-Graduação em Microbiologia Veterinária da UFRuralRJ à nível de mestrado, com concentração na área de micologia.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Objetivos.....	02
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1 Consideração geral sobre o gênero <i>Atta</i>.....	03
2.1.1 Histórico.....	03
2.1.2 Taxonomia.....	03
2.1.3 Distribuição geográfica.....	03
2.1.4 Castas de formigas cortadeiras.....	04
2.1.5 Identificação das saúvas de maior importância econômica.....	04
2.1.6 Biologia e ecologia.....	05
2.1.7 Fundação e estabelecimento de formigueiros.....	06
2.1.8 Plantas cortadas, importância econômica, danos e prejuízo.....	07
2.1.9 Arquitetura do formigueiro.....	07
2.1.10 Inimigos naturais.....	08
2.2 Controle de formigas cortadeiras indireto ou preventivo.....	09
2.3 Controle direto ou curativo.....	09
2.3.1 Resistência de espécies florestais às formigas cortadeiras.....	09
2.3.2 Controle mecânico e cultural.....	10
2.3.3 Controle químico.....	10
2.3.4 Controle biológico.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Procedência dos isolados de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i>.....	16
3.2 Caracterização dos isolados de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i>.....	17
3.3 Teste de patogenicidade dos isolados de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> sob formigas do gênero <i>Atta sexdens rubropilosa</i> e <i>Atta bisphaerica</i>.....	17
3.4 Meios de cultura para produção de biomassa de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i>.....	18
3.5 Quantificação de esporos produzidos por <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> nos sacos de polipropileno com meio de arroz.....	18
3.6 Produção de biomassa inoculação e incubação dos fungos entomopatogênicos <i>M.</i>	

<i>anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i>	18
3.7 Teste de virulência.....	19
3.8 Teste de campo.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1 Isolados.....	22
4.2 Produção de biomassa dos entomopatógenos.....	24
4.3 Teste de patogenicidade <i>in vitro</i>	24
4.4 Avaliação da virulência dos isolados selecionados.....	24
4.5 Concentração letal.....	26
4.6 Avaliação da tecnologia de aplicação dos isolados selecionados no controle de <i>A. bisphaerica</i> e <i>A. sexdens rubropilosa</i> em condições de campo.....	27
5. CONCLUSÕES.....	29
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

ÍNDICE

FIGURAS

Figura 01 Esquema geral de um saueiro (redesenhado de GONÇALVES (1964) por Nascimento.....	08
Figura 02 Formigas “soldados” coletadas diretamente do campo com sinais de enfraquecimento ou já mortas mantidas em câmara úmida até ocorrer à exteriorização dos entomopatógenos.....	17
Figura 03 Formigas ‘soldados’ mantidas individualizadas, em câmara úmida até que se ocorre a exteriorização dos fungos.....	20
Figura 04 Dados climaticos observados durante o período de dezembro de 1997 à janeiro de 1998.....	21
Figura 05 Patogenicidade de isolados de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> estimada pela porcentagem de formigas soldados mortas de <i>A. sexdens rubropilosa</i> através de pulverização com suspensão de conídios contendo aproximadamente 10^8 ufc.mL ⁻¹	23
Figura 06 Patogenicidade de isolados de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> estimada pela porcentagem de formigas soldados mortas de <i>A. bisphaerica</i> através de pulverização com suspensão de conídios contendo aproximadamente 10^8 ufc.mL ⁻¹	23

QUADRO

Quadro 01 Etapas do desenvolvimento do saueiro.....	06
---	----

TABELAS

Tabela 01 Procedência dos isolados de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> utilizados para seleção e caracterização de patogenicidade.....	16
Tabela 02 Classificação de isolados de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> caracterizados a partir de sua morfologia e capacidade da viabilidade sob formigas “soldados” de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> e <i>Atta bisphaerica</i>	22

Tabela 03 Comparação dos tempos letais (TL ₅₀) entre os diferentes isolados de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> para soldados de <i>A. bisphaerica</i>	25
Tabela 04 Comparação dos tempos letais (TL ₅₀) entre os diferentes isolados de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> para soldados de <i>A. sexdens rubropilosa</i>	25
Tabela 05 Comparação das concentrações letais (CL ₅₀) entre os diferentes isolados de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> para soldados de <i>A. bisphaerica</i>	28
Tabela 06 Comparação das concentrações letais (CL ₅₀) entre os diferentes isolados de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i> para soldados de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	28

RESUMO

CASTILHO, Alzimiro Marcelo Conteiro. **Controle da saúva mata-pasto *Atta bisphaerica* e saúva limão *Atta sexdens rubropilosa* através dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana***. Seropédica: UFRRJ, 2005. 38p. (Dissertação, Mestrado em Microbiologia Veterinária).

Este trabalho foi conduzido em condições de laboratório e campo para se observar a eficiência de fungos entomopatogênicos no controle de *Atta sexdens rubropilosa* e *Atta bisphaerica*. Foram utilizados os isolados ENA 1 (Escola Nacional de Agronomia) ENA 2, ENA 3 e ENA 4 de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*, ENA 6, ENA 7, ENA 13 e ENA 14, inoculados em soldados. Após coleta, exemplares de soldados foram separados em grupos de 10 indivíduos e banhados em suspensões de conídios de $1,0 \times 10^6$ a $1,0 \times 10^{11}$ conídios.mL⁻¹. Cada grupo de formiga foi transferido para câmara úmida e mantido sob regime de fome a $27 \pm 1^\circ$ C. Os dois fungos foram patogênicos, embora os isolados ENA 4 de *M. anisopliae* e ENA 6 e ENA 13 de *B. bassiana* tenham sido os mais virulentos para *A. bisphaerica* e para *A. sexdens rubropilosa* dentre os testado. Esses isolados foram aqueles que apresentaram maior porcentagem de mortalidade confirmada, com TL₅₀ de 1,15 dias para o isolado ENA 4, 1,39 dias para o ENA 6 e 1,44 dias para o ENA 13, para soldados de *A. bisphaerica*. Para *A. sexdens rubropilosa* a TL₅₀ foi de 1,37 dias para o isolado ENA 4, 1,68 dias para o isolado ENA 14, 1,95 dias para o ENA 13 e 2,14 dias para o ENA 6. Quanto ao parâmetro mortalidade, as concentrações testadas proporcionaram a porcentagem de soldados mortos que variou de 45,0 a 71,67 %. Os isolados ENA 4, ENA14, ENA 13 e ENA 6 causaram as maiores médias de mortalidade de soldados em menor espaço de tempo. Os isolados ENA 4 e ENA 14 foram aplicados na forma de pulverização e polvilhamento, em formigueiros adultos com mais de três anos de idade, e após 30 dias da aplicação dos fungos entomopatogênicos, os olheiros ainda apresentavam ativos.

Palavras chaves: fungo entomopatogênico, controle microbiano, *Atta bisphaerica*, *Atta sexdens rubropilosa*

ABSTRACT

CASTILHO, Alzimiro Marcelo Conteiro. **Control of saúva mata-pasto *Atta bisphaerica* and saúva limão *Atta sexdens rubropilosa* by entomopatogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana***. Seropédica: UFRRJ, 2005. 38p. (Dissertation, Veterinary Microbiology Msc).

This survey was carried out under laboratory and field conditions for evaluating the efficiency of entomopathogenic fungi to control the ants *Atta sexdens rubropilosa* and *Atta bisphaerica*. The isolates from Agronomy National school (Escola Nacional de Agronomia) ENA1, ENA2, ENA3 and ENA4 of *Metarhizium anisopliae* as well as the isolates ENA6, ENA7, ENA13 and ENA14 of *Beauveria bassiana* were tested and inoculated on soldiers ants. After to have been collected, the soldiers were separated by groups of 10 individuals and wetted on a conidia suspension of 1.0×10^6 to 1.0×10^{11} conidia/ml. Each ants group was placed on a wet chamber and kept under no feeding condition at 27 ± 1 °C. Both fungi were pathogenic, although the isolates ENA 4 of *Metarhizium anisopliae* and ENA 6 and ENA 13 of *Beauveria bassiana* were considered the most virulent ones for *A. bisphaerica*, and for *A. sexdens rubropilosa* the isolates ENA 4 of *Metarhizium anisopliae* and ENA 14, ENA 13 and ENA 6 of *Beauveria bassiana* among the tested ones as well. The greatest mortality percentage was performed by these isolates with Lethal time (LT₅₀) of 1.15 days for the isolate ENA 4, 1.39 days for ENA 6 and 1.44 days for ENA 13, for *A. bisphaerica* soldiers. For *A. sexdens rubropilosa* the Lethal time (LT₅₀) was 1.37 days for the isolate ENA 4, 1.68 days for ENA 14, 1.95 days for ENA 13 and 2.14 days for ENA 6. In regard to the mortality index, the percentage of dead soldiers at the tested concentrations ranged from 45% to 71,67%. The isolates ENA 4, ENA 14, ENA 13, and ENA 6 caused the greater soldiers mortality averages in a shorter time period. The isolates ENA 4 and ENA 14 were applied by pulverization and spraying over plus 3 years old adult ants' nests and 30 days after the entomopathogenic fungi application there still was some activity on the underground galleries.

Key words: Entomopathogenic fungi, microbial control, *Atta bisphaerica*, *Atta sexdens rubropilosa*

1- INTRODUÇÃO

As pastagens constituem-se em fonte de alimento para diversas espécies de herbívoros, devendo ser conduzida de uma forma técnica à semelhança de outras culturas. Está se explorando nestas áreas diferentes possibilidades de incrementar a produção de gado, incluindo um manejo racional das savanas naturais e a introdução de espécies forrageiras de alto valor nutritivo adaptado às condições climáticas e edáficas próprias de cada região.

O estabelecimento e manutenção das pastagens, principalmente de gramíneas tropicais, estão sujeitos a vários fatores que uma vez menosprezados podem comprometer a produção de carne e leite. Entre esses fatores deve-se dar ênfase ao aparecimento de insetos-pragas, que pelo aumento de suas populações podem causar danos econômicos às pastagens com reflexo direto na produção (PUPO, 1977).

Apesar de existir cerca de 500 sp. de insetos vivendo nas pastagens, poucas são as que provocam danos econômicos, sendo consideradas importantes.

Dentre os insetos que ultimamente tem causado maiores danos às pastagens destacam-se cigarrinhas, percevejo das gramíneas, cochonilhas e saúvas.

As formigas conhecidas como saúvas, pertencem ao gênero *Atta* (Hymenoptera: Formicidae) destacam-se a *Atta bisphaerica* Forel 1908, vulgarmente conhecida como “saúva-mata-pastos” a qual é responsável pela redução da produção das pastagens em virtude da diminuição do rendimento e capacidade de suporte (AMANTE, 1967). Outra espécie é *Atta sexdens rubropilosa*, conhecida por “saúva limão” e forrageia quase todas as plantas (algodoeiro, cafeeiros novos, eucaliptos, roseiras, laranjeiras, mandioca, pereira, pessegueiro, couve, capins, etc).

Além dos danos diretos ocasionados pela redução da produtividade das pastagens ocorrem, eventualmente, danos indiretos como acidentes, devido ao monte de terra solta, onde localizam enormes câmaras que com frequência após fortes chuvas podem desmoronar formando enormes crateras. Poderá ocorrer, ainda, o encalhe de tratores por ocasião da aração dos pastos, pondo em risco a vida do operador (AMANTE, 1964b).

O controle por meio de produtos químicos tem demonstrado inconveniências devido à falta de especificidade, contaminação do meio ambiente e toxicidade para o aplicador. Agentes biológicos tem se apresentado como uma alternativa promissora de controle. Alguns fungos entomopatogênicos tais como *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, têm demonstrado eficiência e outras vantagens sobre os produtos químicos no controle de pragas. SILVA e DIEHL-FLEIG (1988) testaram diferentes linhagens de *B. bassiana* e *M. anisopliae* como possíveis agentes de controle microbiológico de *Atta sexdens piriventris*, espécie de grande ocorrência no Estado do Rio Grande do Sul. Por meio de bioensaios em laboratório e teste de campo os autores concluíram que os fungos poderiam ser empregados como agentes de controle da formiga. Colônias de *A. sexdens piriventris*, inoculadas com os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, apresentaram redução total de atividade externa 60 dias após a aplicação dos patógenos e esta situação manteve-se em observações realizadas até três anos após. Em áreas sem cobertura florestal, os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram encontrados infectando *Solenopsis invicta* e *A. sexdens piriventris* (ALLEN & BUREN, 1974; DIEHL-FLEIG et al., 1988; PEREIRA, 1993a).

1.1 Objetivos

Objetivos gerais:

- Levantar aspectos relacionados com fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* no controle de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa*;

Objetivos específicos:

- Seleção de isolados

- Definir a melhor concentração de conídios a ser utilizado no controle em saúvas;

- Testar substratos alternativos visando à redução do tempo de produção de conídios secos;

- Avaliar a melhor forma de aplicação desses fungos em condições de campo através de pulverização e polvilhamento.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Consideração geral sobre o gênero *Atta*

2.1.1 Histórico

Desde os primórdios do descobrimento do Brasil já se faziam relatos sobre as saúvas, como o próprio padre José de Anchieta em 1560 realçando a importância das içás como agentes destruidores de árvores. Acredita-se que, mesmo antes do descobrimento do Brasil, as formigas cortadeiras eram a causa principal do nomadismo dos nossos índios, nas regiões baixas da América do Sul (MARICONI, 1970)

Frases famosas alusivas às formigas cortadeiras foram mencionadas ao longo do tempo. Mas, cientificamente só foram estudadas a partir do século XX, atingindo, atualmente, uma boa bagagem de conhecimento das principais espécies (FOWLER, 1990).

2.1.2 Taxonomia

Dentre as ordens da Classe Insecta, destaca-se a ordem Hymenoptera, ocupando o terceiro lugar em número de espécie. Nessa ordem encontram-se as formigas, as quais pertencem à família Formicidae, cuja principal característica morfológica é presença de pecíolo (MARICONI, 1970).

No Brasil existem 1.105 espécies de formigas, divididas em sete subfamílias. Na subfamília Myrmicinae estão classificadas as formigas cortadeiras, que são conhecidas vulgarmente por saúva e quenquém, referindo-se aos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, respectivamente (DELLA LUCIA et al., 1993).

As saúvas diferem das quenquéns por serem maiores e possuírem apenas três pares de espinhos dorso do tórax, enquanto que as quenquéns possuem quatro (JUSTI Jr. et al., 1996).

2.1.3 Distribuição geográfica

O gênero *Atta*, que engloba todas as espécies de saúvas, ocorre somente nas Américas, desde o sul dos EUA (latitude 33° N) até o centro da Argentina (latitude 33° S), não sendo encontrado no Chile, Canadá e Ilhas das Antilhas (MARICONI, 1970).

Segundo DELLA LUCIA et al. (1993) e LOECK et al. (2002) no Brasil ocorrem dez espécies e três subespécies taxonômicas, aceitas dentro do gênero *Atta*: *Atta bisphaerica* Forel 1908; *Atta capiguara* Gonçalves 1944; *Atta cephalotes* L 1758; *Atta goiana* Gonçalves 1942; *Atta laevigata* F Smith, 1858; *Atta opaciceps* Borgmeier, 1939; *Atta robusta* Borgmeier 1939; *Atta sexdens piriventri* Santschi 1919; *Atta sexdens rubropilosa* Forel 1908; *Atta sexdens sexdens* L 1758; *Atta silvai* Gonçalves 1982 e *Atta vollenweideri* Forel 1839.

2.1.4 Castas de formigas cortadeiras

Segundo DELLA LUCIA et al. (1993), as formigas são consideradas insetos verdadeiramente sociáveis, com organização complexa e organizada, apresentando diferenciação morfológica (polimorfismo) e de acordo com o trabalho ou as funções que desempenham na colônia (polietismo), constituindo diferentes castas.

Os mesmos autores relatam que as saúvas apresentam castas permanentes e temporárias. Quando o saúveiro atinge a maturidade ocorre o surgimento dos indivíduos temporários (alados) reprodutores, vulgarmente conhecidos como bitus (machos) e içás (fêmeas). Os bitus diferenciam-se morfológicamente das içás ou tanajuras por serem menores e apresentarem as mandíbulas menores e as pernas anteriores muito longas, as quais são utilizadas para a cópula durante o vôo. Tanto os bitus como as içás apresentam olhos compostos bem desenvolvidos, necessários para o vôo. As içás apresentam o abdome e as mandíbulas bastante desenvolvidas.

Fazendo parte das castas permanentes, têm-se a rainha e as operárias. A rainha é a içá copulada que perdeu suas asas. As operárias apresentam diferenças quanto ao tamanho e comportamento. As operárias menores, denominadas de jardineiras e “babás”, são encarregadas de cuidar dos fungos (hifas) e da trituração final das folhas para o substrato, cuidam também da prole e permanecem sobre as cortadeiras durante o transporte das folhas, com a finalidade de protegê-las do ataque de parasitóides (forídeos), que eventualmente venham ovopositar em suas cabeças. As cortadeiras, forrageadoras ou escavadoras, apresentam tamanho intermediário e têm como funções a exploração, o corte e transporte das folhas e a escavação do ninho. Existe, ainda, uma operária pouco menor do que esta que é generalistas dentro do ninho, desempenhando, atividades como degradação da vegetação, antes da incorporação ao jardim de fungo, transporte de outras operárias, assistência à prole durante a ecdise, cuidados com a rainha, retirada do lixo e reconstrução de esponjas de fungo. As operárias maiores são chamadas de soldados, defensoras ou cabeçudas e apresentam a função de defesa da colônia e eventualmente transporte de folhas, os soldados ainda transportam seiva na cavidade cibarial (DELLA LUCIA et al., 1990).

2.1.5 Identificação das saúvas de maior importância econômica

Segundo BORGMEIER (1959), MARICONI (1970) e GONÇALVES (1982) para as principais espécies de saúvas podem ser utilizados os seguintes caracteres:

Atta sexdens – saúva limão: a cabeça da operária quando esmagada exala um cheiro de capim cidreira ou de folhas de limão. Cortam preferencialmente dicotiledôneas. A cabeça dos soldados não tem brilho e apresentam pêlos avermelhados. Os ninhos são construídos em lugares sombreados e os murunduns são depositados irregularmente. Nas regiões Centro-Oeste e Sudeste ocorrem *Atta sexdens rubropilosa*.

Atta laevigata – saúva-cabeça-de-vidro: a cabeça do soldado é bastante brilhosa. Cortam folhas de monocotiledôneas como de dicotiledôneas. Os soldados são os maiores encontrados dentro do gênero *Atta*, chegando a atingir 15mm de comprimento. Os ninhos são semelhantes aos da saúva limão, porém com uma quantidade menor de olheiros, situados no centro das crateras, às vezes, rodeados de gravetos secos a nidificação ocorre tanto em lugares ensolarados como sombreados.

Atta cephalotes – saúva-da-mata: a cabeça do soldado apresenta a parte dorsal brilhante e lisa e bastante pilosa na parte frontal. Cortam apenas folhas de dicotiledôneas. Os ninhos são construídos em lugares sombreados e úmidos e de baixa profundidade, sendo os canais principais ligados ao monte principal de terra em sentido ascendente, a fim de evitar a descida de águas às panelas.

Atta capiguara – saúva parda: os soldados são difíceis de serem reconhecidos devido as suas características, pela pouca agressividade e pequena quantidade desses indivíduos. A cabeça do soldado é semelhante ao da saúva limão, porém ao serem esmagada não exala o odor cítrico, e sim o de gordura rançosa. O ninho apresenta um grande monte de terra solta e diversos montes menores ao redor. Cortam gramíneas, tais como pastagem, arroz, milho e cana-de-açúcar.

Atta bisphaerica – saúva-mata-pasto: a cabeça dos soldados apresenta-se dividida em dois hemisférios com um sulco coronal bem profundo e são pouco menores do que os soldados da saúva parda. A cabeça é brilhosa, porém mais opaca do que a da saúva cabeça-de-vidro. O ninho apresenta murunduns sem crateras, com olheiros de aberturas estreitas na superfície. Cortam gramíneas tais como: pastagens, arroz, milho, cana-de-açúcar. Esta espécie está distribuída nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Goiás (Ilha do Bananal).

2.1.6 Biologia e ecologia

Ao atingir a maturidade, isto é, a partir de 38 meses de idade, ocorre, anualmente, a saída de machos e fêmeas adultos alados dos saueiros, com a finalidade de formarem novos ninhos. O período de revoada, na Região Sudeste e em Mato Grosso, ocorre no segundo semestre do ano, geralmente de setembro a novembro. De uma a cinco semanas antes da revoada dá-se o período de pré-revoada, quando as formigas ficam alvoroçadas e os olheiros muito limpos. Ao redor de meia hora antes da revoada, os soldados e as operárias saem para o exterior do saueiro, apresentando os soldados um comportamento bastante agressivo atacando qualquer inimigo que se aproxime da sua área (MARICONI, 1970). O mesmo autor afirma que os primeiros alados ao saírem na superfície do solo são os bitus e, após, as içás, mas só depois de terem saído muitos bitus.

O acasalamento ocorre durante o vôo e um saueiro de *A. sexdens rubropilosa*, em média, origina 2.900 içás e 14.250 bitus. A içá ao sair do saueiro transporta na cavidade posterior do cibário um pedaço do fungo, o qual permitirá a sobrevivência do novo saueiro. As revoadas ocorrem em dias quentes, claros e úmidos, após fortes chuvas na véspera, todavia já foi observada revoada em dias nebulosos. A fêmea de *A. sexdens rubropilosa* pode ser copulada por cinco a oito machos, no entanto o macho copula uma única vez, vindo a morrer no mesmo dia após a cópula. Após ter sido copulada a içá desce ao solo e livra-se das suas asas com o auxílio das mandíbulas e pernas. Após, a içá inicia a escavação do canal inicial, medindo de 8,5 cm a 15 cm de profundidade e de 9mm a 12mm de diâmetro, que permitirá o acesso a uma câmara ou panela de 18 mm a 25 mm de maior altura e de 30 mm a 45 mm no maior diâmetro em sua base, também construída pela içá. Essas estruturas são construídas em seis a 10 h de trabalho contínuo. Terminada a escavação e obstruído o canal de acesso, a içá regurgita o fungo que estava localizado na cavidade posterior do cibário, trazido do saueiro anterior. O fungo será cultivado com as fezes e secreções da rainha. Os primeiros ovos são colocados de cinco a seis dias depois de iniciada a construção do saueiro, sendo ovos de alimentação

(grandes) e de reprodução (pequenos) que irão originar as operárias do tipo jardineira e cortadeira. Os ovos grandes serão utilizados na alimentação de larvas. Com o passar do tempo à rainha passará a colocar ovos que irão originar todos os tipos de operárias e inclusive ovos para originar bitus e içás. Há controvérsias quanto às espécies de fungo utilizadas pelas formigas cortadeiras em sua alimentação. Isto é devido às dificuldades encontradas pela ausência de frutificação e de esporos que são impedidos de serem formados pelas próprias operárias. O primeiro fungo a ser identificado foi *Rozites gongylophora* coletado por Möeller (1893), encontrado em um jardim de fungo abandonado por *Acromyrmex disciger*. Atualmente, autores afirmam que o fungo cultivado por todas as cortadeiras é *Leucocoprinus gongylophorus*. A alimentação do fungo parece estar correlacionada com a vantagem que é trazida para as cortadeiras, ou seja, a desintoxicação do material vegetal que contem compostos secundários prejudiciais a sua sobrevivência. Após o período de 80 a 100 dias, cerca de três meses, as cortadeiras retiram a terra que estava obstruindo o canal de acesso à superfície do solo e saem para cortar as folhas. Os soldados surgem após 22 meses, praticamente dois anos após (MARICONI, 1970).

2.1.7 Fundação e estabelecimento de formigueiros

Penetração da içá no solo e formação da panela inicial (Quadro 01):

Quadro 01. Etapas do desenvolvimento do saueiro

Regurgitação do fungo	48 horas
Colocação do primeiro ovo	5 dias
Incubação dos ovos (1ª larva)	30 dias
Período larval (1ª pupa)	52 dias
Período pupal (1ª adulto)	62-66 dias
Abertura do primeiro olheiro	80-100 dias
Abertura do segundo olheiro	17 meses
Abertura do 3º ao 10º olheiro	20 meses
Aparecimento dos soldados	22 meses
120 olheiros	24 meses
100 olheiros	36 meses
Primeira revoada (vão nupcial) – saueiro adulto	38 meses

Segundo de AUTUORI (1947)

Segundo AUTUORI (1950), a rainha de *A. sexdens rubropilosa* pode viver de 20 a 22 anos. Já *Acromyrmex niger* e *A. octospinosus*, em condições de laboratório, podem viver sete e 10 anos, respectivamente. Cortadeira e os soldados podem apresentar uma longevidade máxima de 120 e 390 dias, respectivamente.

A sobrevivência das içás é bastante difícil, chegando algumas vezes, atingir a 100%. Para *A. Sexdens rubropilosa* a mortalidade das içás atinge 99,5%, sobrevivendo,

portanto, apenas 0,05 % que originarão os novos saúveiros. Os responsáveis por esta alta taxa de mortalidade são os inimigos naturais, tais como pássaros, tatus, tamanduás, formigas, besouros predadores, parasitóides como as moscas da família Phoridae e outros fatores abióticos, como a inundação das câmaras por ocasião do período chuvoso (MARICONI, 1970).

2.1.8 Plantas cortadas, importância econômica, danos e prejuízo

As saúvas e quenquéns cortam as mais variadas espécies de plantas para servirem de substrato para o fungo do qual se alimentam. Existem espécies que cortam monocotiledôneas, dicotiledôneas, outras se especializaram em cortar folhas jovens e ainda aquelas que cortam monocotiledônias e dicotiledônias. Além dos danos diretos ocasionados pela redução da produtividade das pastagens ocorrem, eventualmente, danos indiretos como acidentes, devido ao monte de terra solta, onde se localizam enormes câmaras que com frequência após fortes chuvas podem desmoronar formando enormes crateras. Poderá ocorrer ainda, o encalhe de tratores por ocasião da aração dos pastos, pondo em risco a vida do operador (AMANTE, 1964).

O mesmo autor afirma que o gênero *Atta* é responsável pela redução da produção das pastagens em virtude da diminuição do rendimento e capacidade de suporte. AMANTE (1967a) ressalta ainda que o corte das gramíneas e leguminosas proporcionam um desenvolvimento de plantas daninhas e facilitam o processo de erosão.

Estimativas consideram que para manter um saúveiro pelo período de um ano são necessárias 86 árvores de eucalipto, 161 árvores de pinos, ou seja, 1 ton de folhas, o equivalente a 344 árvores de eucalipto 644 árvores de pinos, o que representa uma perda de 15 % de árvore/ha. Todavia, esses dados não são reais, pois leva em consideração um fator de conversão que não representa a realidade, podendo estar subestimado ou superestimado (FOWLER et al., 1990).

DELLA LUCIA et al. (1993) afirmam que as saúvas têm trazido sérios problemas às culturas florestais, chegando a trazer perdas totais de árvores em reflorestamentos, nos quais não foram realizados os devidos controles. O eucalipto, de forma geral, suporta três desfolhas sucessivas, ao passo que as coníferas não, isto sem contar que, mesmo não ocorrendo essas desfolhas sucessivas, haverá perda no incremento volumétrico anual.

2.1.9 Arquitetura do formigueiro

As saúvas são insetos sociais que vivem em formigueiros que podem conter milhares de indivíduos alojados, ninhos subterrâneos constituindo verdadeiras “cidades”. Na superfície, as saúvas constroem caminhos que são denominados de trilhas ou carreiros. As trilhas variam de local, de acordo com a necessidade de obtenção de folhas das respectivas fontes, pois são construídas com o objetivo de transportarem este material. As trilhas de saúvas podem atingir 70m de comprimento por 20 cm de largura GONÇALVES (1964).

As câmaras ou painéis são construídas para diferentes propósitos e, sendo assim, são classificadas em câmaras de fungo, de terra, de lixo, de lixo + terra e vazia (fig. 1). O acúmulo de terra na superfície é denominado de sede aparente e o conjunto de câmaras debaixo do solo de sede real. Na espécie *Atta capiguara*, a sede aparente não coincide com a sede real, o que dificulta o seu controle GONÇALVES (1964).

A quantidade de olheiros de uma colônia varia de dois a 14, sendo que apenas cinco são normalmente utilizados. Um formigueiro de saúva limão com 77 meses de idade apresentou 1920 câmaras e a escavação de uma colônia de saúva cabeça-de-vidro apresentou 7164 câmaras. Se o solo for do tipo arenoso as panelas podem ultrapassar 6m de profundidade. As quenquéns apresentam formigueiros pequenos e geralmente formados de apenas uma panela, mas podem chegar a três panelas. As câmaras são rasas e situadas a poucos metros da superfície (GONÇALVES, 1964).

Na superfície do solo, pode ser observado um acúmulo de terra solta, chamado de murundu, que é o produto das escavações subterrâneas. Nos meses que antecedem a revoada o depósito de terra na superfície é mais intenso e praticamente não ocorrendo nos períodos de chuva (dezembro a abril). O tipo de murundu varia de acordo com a espécie (MARICONI, 1970).

Debaixo da superfície são encontrados os canais, galerias ou túneis que ligam as câmaras ou que possibilitam o acesso à superfície. Na superfície as aberturas dos canais recebem a denominação de olheiros. Os canais podem ser classificados em canais de aterro, ventilação e alimentação (MARICONI, 1970).

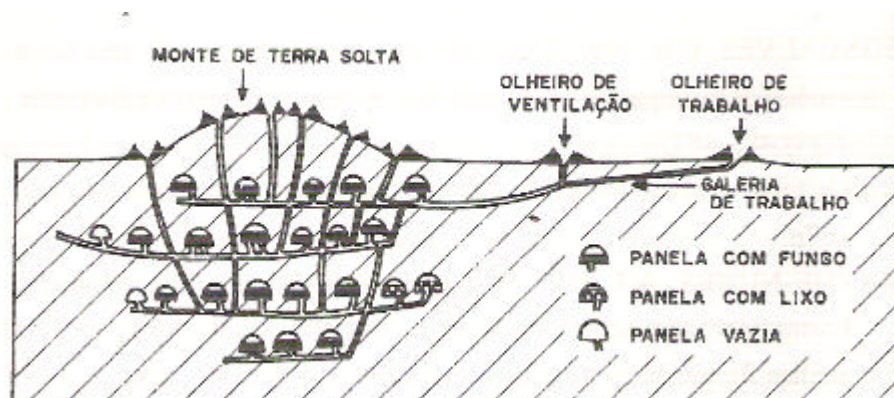


Figura 1. Esquema geral de um saueiro Gonçalves, 1964.

2.1.10 Inimigos naturais

TOWNSEND (1921) afirma que as aves e os pássaros domésticos estão dentre os predadores mais eficazes das iças durante a revoada.

A ordem Coleoptera é relatada por BORGMEIER (1937) como sendo importantes predadores das iças durante as revoadas. Esses coleópteros decapitam as iças de várias espécies de *Atta*.

WEBER (1945) relata ter coletado endoparasitos (nematóides) de *Acromyrmex octospinosus*, algumas espécies comumente deterioram ninhos.

LISBOA (1948) destaca as formigas lava-pés (*Solenopsis* spp.), que atacam tanto operárias quanto ovos, larvas e pupas, não raramente chegando a extinguir os formigueiros.

D'ARAÚJO e SLVA et al. (1968) relatam a presença de *Taeniolobus sulcipes* (Coleóptera: Carabidae) e *Vescia angrenis* (Hemíptera: Reduviidae) em saueiros iniciais em São Paulo. Os mesmos autores destacam as formigas *Nomamyrmex esenbecki* e as *Nomamyrmex hartigi* (Dorylianae).

Dentre os mamíferos, o tamanduá e o tatu são citados por MARICONI (1970), como predadores das operárias nas trilhas ou diretamente no interior dos olheiros, porém com pouca eficácia. O mesmo autor destaca como predadores, as aranhas e ácaros desempenhando o papel de inimigo natural das formigas cortadeiras, e salienta as primeiras como principais predadoras das içás na época da revoada.

Dentre os parasitas sociais destaca-se *Pseudoatta Argentina*, que invade os ninhos de *Agromyrmex* descrita por WEBER (1972).

PASSOS Jr. et al. (1975) estudaram os efeitos da aplicação de *Steinemema carpocapsae* sobre a saúva - limão *Atta sexdens rubropilosa*. Por inoculação no mais alto nível populacional do nematóide sobre o alimento (folhas), obteve taxas de mortalidade de 27,3 %, 90,7 % e 96,4 % para as castas de jardineiras, operárias e soldados, respectivamente.

Segundo WALLER e MOSER (1990), os ácaros podem ser foréticos nas operárias e formas aladas. Esses autores relatam que os dípteros da família Phoridae, representada por mais de 20 espécies de diminutas moscas, são parasitas de operárias de *Atta* e *Acromyrmex*.

SCHILINDWEIN (1991) cita que, além desses inimigos naturais, encontram-se os lagartos, lagartixas e rãs e sapos como predadores de formigas.

2.2 Controle de formigas cortadeiras indireto ou preventivo

A presença de sub-bosque tem trazido resultados extremamente favoráveis em relação à redução do número de formigueiros por área. Acredita-se que a dificuldade da içá fundar e estabelecer um formigueiro em área com sub-bosque seja um dos fatores desfavoráveis, além da maior presença de inimigos naturais que podem agir contra as içás, por ocasião da fundação das novas colônias. A maior disponibilidade de alimento existente em uma área com sub-bosque parece poupar a floresta plantada do ataque das cortadeiras (ANJOS et al., 1998).

O fato tem demonstrado resultados interessantes, pois a incidência de saueiros chegam a ser 1800 % maior do que em uma área com sub-bosque denso. Em área cujo sub-bosque foi mantido, observou-se uma redução de 11,5 vezes a média de novas colônias, durante o período de dois anos de observações (FORTI, 1997).

2.3 Controle direto ou curativo

2.3.1 Resistência de espécies florestais às formigas cortadeiras

Diversas espécies de formigas cortadeiras encontram dificuldades em estabelecerem seus formigueiros em determinadas áreas de reflorestamento, devido ao seu hábito alimentar. Isto é, as espécies que cortam seletivamente monocotiledôneas não

encontrarão condições de sobrevivência em reflorestamentos com dicotiledôneas (Eucalipto, seringueira, teca etc.) ou com Gymnosperma (*Pinus* spp.) (FORTI, 1997).

Dentro do próprio gênero *Eucalyptus* ocorrem espécies mais resistentes aos ataques das cortadeiras como é o exemplo de *Eucalyptus citriodora* em relação à saúva cabeça-de-vidro (*Atta laevigata*). Segundo esses autores a adubação balanceada é fator de promoção do aumento da resistência do vegetal, pois já foi verificado que a adubação pesada com fósforo em eucalipto possibilitou uma redução de 35 % no desfolhamento.

Espécies florestais nativas e plantas não nativas tem apresentado efeito repelente ou nocivo ao fungo e às saúvas (ANJOS et al., 1998).

2.3.2 Controle mecânico e cultural

O controle mecânico consiste na escavação do formigueiro com o objetivo de localizar e matar a rainha. É recomendado para áreas muito pequenas e quando o formigueiro tiver menos de quatro meses de idade, pois a partir daí a rainha passará a se aprofundar no solo dificultando o trabalho (AMANTE, 1975).

Tratos culturais como aração e gradagem também podem eliminar formigueiros, principalmente, para as formigas quenquéns e sauveiros com idade inferior a quatro meses. Após essas operações deve-se fazer um repasse na área e destruir com enxadões os formigueiros restantes. No entanto, as medidas culturais de controle não têm a eficiência desejada e tendo que lançar mão de outros métodos (BERT FILHO et al., 1993).

O uso de cultura armadilha tem despertado a atenção dos pesquisadores. O gergelim é uma delas, sendo plantado entre as fileiras de árvores, visto que suas folhas são altamente atacadas e exercem uma ação inibidora sobre o crescimento do fungo, além de apresentar ação tóxica sobre as saúvas. Todavia, o uso de cultura armadilha não tem sido bem sucedido. Outras plantas como *Senna siamaeai* uma leguminosa arbórea, apresenta compostos voláteis em suas flores capazes de atrair *Atta opaciceps*, como também o extrato de flores de *Mahonia aquifolium* para *A. sexdens rubropilosa* (BERT FILHO et al., 1993).

2.3.3 Controle químico

Desde a década de 1950 o brometo de metila é utilizado no combate a saúva no Brasil (DURVAL, 1949). AUTUORI (1950) conduziu extensas pesquisas com o MM33 contendo brometo de metila a 18 % dissolvido em bissulfureto de carbono, além de outras substâncias. Segundo o mesmo autor ao final da década de 50 houve um amplo emprego dos inseticidas formulados em pó secos e que eram insuflados através de bombas manuais. Logo em seguida tais produtos passaram a ser adotados sob a forma de concentrados emulsionáveis, destacando-se aldrin, clordane e heptacloro. Encontravam-se também diversas formulações de pó formicidas misturados com fungicidas.

DORNA FILHO (1959) afirmou que quando foi introduzida a utilização do bissulfeto de carbono, se iniciava a era de maior eficiência no combate a saúva.

AMANTE (1962) relata que o emprego de iscas granuladas é o método de combate mais eficiente, econômico e prático. Daí em diante, foram muitas as tentativas de se obterem iscas granuladas e doses eficientes (GONÇALVES, 1960; MARICONI &

CASTRO, 1962; VANNETTI & ALBUQUERQUE, 1963; FREIRE & VANETTI, 1968; AMANTE, 1968abc; CHERRETT, 1969; KOBER et al., 1970; FREIRE, 1971).

A utilização da isca granulada Mirex descrita por ECHOLS (1965 e 1966 ab), contendo 0,45 % de ingrediente ativo (Dodecacloro), 8,5 % de óleo de soja como atraente efetivo e 91,05 % de polpa de citros como veículo foi a melhor opção até janeiro de 1993, tendo existido várias marcas comerciais, com características semelhantes e mesmo princípio ativo.

Os métodos de combate às saúvas diferem sensivelmente daquelas aplicadas no combate aos insetos de modo geral isolados. E ainda as colônias reagem nitidamente contra os agentes estranhos introduzidos no formigueiro, isolando a sede ou “amuando-se”. Assim, torna-se imprescindível determinar qual a melhor técnica a ser utilizada para combater as formigas cortadeiras, a qual representa séria ameaça nas áreas de culturas e pastagens (AMANTE, 1975).

Segundo AMANTE (1975) os produtos químicos utilizados no combate as formigas foram: verde paris, enxofre, arsênico e o cianureto, puros ou misturados, insuflados, queimados ou dissolvidos. Eram colocados dentro das colônias através dos canais naturais.

Segundo dados da ANDEF (1989) no Brasil foram comercializados 16000 toneladas dessas iscas em 1989, correspondente a um aumento superior a 50 % no consumo de iscas formicidas, em menos de cinco anos. Esse mercado movimentava mais de 11 milhões de dólares anuais. Entretanto, apesar dessas iscas terem constituído os únicos meios de controle em grande escala, seu princípio ativo, o Dodecacloro, já era proibido em quase todo o mundo. São pesticidas altamente persistentes e estáveis no ambiente, sua movimentação nos ecossistemas é afetada pelas águas das enxurradas e pelo vento. Os clorados são citados como responsáveis por efeitos mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos (GIBSON et al., 1972; JONES & HODGES, 1974; BROOKS, 1975).

Os problemas advindos de seu uso tornavam-se ainda mais graves, em razão do uso indiscriminado dos grânulos sobre as áreas, ignorando-se a localização do formigueiro. A distribuição de iscas nos agroecossistemas visa baratear os custos de controle de formigas saúvas (DELLA LUCIA, 1992). Segundo o mesmo autor tais aspectos preocuparam os técnicos, pesquisadores e pessoas atuantes nessa área e a procura de novos princípios ativos para serem incorporados às iscas com menor impacto ambiental tem continuado intensamente.

O emprego de inibidores de quitina é encontrado nas iscas Formilin[®] (Diflubenzuron), as quais vem sendo estudada e empregada desde 1988 (BUSOLI et al., 1988). Segundo LOECK et al. (1993), o diflubenzuron inibe o desenvolvimento do fungo simbiótico.

Encontram-se disponíveis no mercado as iscas granuladas Lakree[®] à base de Clorpirifrós para o controle de *Atta capiguara*. Os princípios ativos Carbossulfan e Terbufós são comercializados como Suscon[®] para proteção de mudas de eucaliptos, roseiras e citros (DELLA LUCIA et al., 1993). ALVES et al. (2001) ressaltam ainda que a utilização intensiva de agroquímicos tenha causado diversos problemas, entre eles pode-se citar a resistência de pragas a inseticidas, exigindo um aumento da concentração e do número de aplicações.

2.3.4 Controle biológico

O uso de microrganismos para o controle de pragas representa atualmente um avanço ecológico para solucionar problemas ocasionados pelo emprego indiscriminado de inseticidas. Sendo que os grupos mais importantes são os fungos, bactérias, vírus, protozoários, nematóides, rikétsias e micoplasma. Dentre estes agentes biológicos de controle de insetos, os fungos causam cerca de 80 das enfermidades (ALVES, 1986).

Os fungos entomopatogênicos vêm sendo estudados no Brasil há mais de 60 anos. Aproximadamente, 85 gêneros de fungos entomopatogênicos ocorrem no Brasil. Desses, mais de 20 incidem enzoóticamente ou epizooticamente sobre pragas de importância econômica (ALVES, 1986).

Esses fungos geralmente são amplamente distribuídos e apresentam elevado número de hospedeiros. Dentre esses fungos mais comuns, destacam-se os gêneros *Entomophthora*, *Hisurteella*, *Nomuraea*, *Beauveria* e *Metarhizium* (FERRON, 1978).

O primeiro trabalho de controle microbiano foi realizado por METSCHNIKOFF (1979), que aplicou o *M. anisopliae* para controle de larvas de um curculionídeo, importante praga da cultura da beterraba. KRASSILSTCHK continuou as pesquisas chegando a produzir em 1874 cerca de 55 kg do mesmo fungo, conseguindo um controle de 55 % a 80 % dos insetos em pequenas áreas, após 10 a 15 dias de aplicação (BALFOUR-BROWNE, 1960; LATCH, 1965; MARTIGNONI, 1968).

A partir dessa época, as diversas raças de *M. anisopliae* vêm sendo estudadas sobre muitas espécies de insetos. Acredita-se que esse patógeno ocorra naturalmente sobre mais de 300 espécies de insetos das mais diferentes ordens, incluindo pragas importantes das plantas cultivadas. (ALVES, 1986).

A variabilidade genética entre isolados de uma mesma espécie de fungos é amplamente relatada na literatura. Muitos dos trabalhos conduzidos para espécies de interesse entomológico foram feitos com *M. anisopliae* e *B. bassiana*, em muitos casos, como testes iniciais visando a sua utilização em programas de controle microbiano. Este procedimento tem sido empregado há muitos anos pelo Laboratório de patologia e controle microbiano de insetos da ESALQ/USP, sendo na maioria dos casos, encontrados materiais promissores para o controle de diferentes espécies de insetos (MOINO JUNIOR, 1993; VIEIRA et al., 1997; TAMAI, 1997; MANZINI et al., 1998; LOPES, 1999; TANZINI, 2002). Resultados destes trabalhos evidenciaram a grande variabilidade genética existente entre os fungos entomopatogênicos, sendo assim importante e necessária à realização de uma seleção de isolados altamente patogênicos para determinada praga. No tocante a caracterização de raças do *M. anisopliae* pode ser utilizada a especificidade, eletroforese, sorologia, cromatografia e virulência, além das características morfológicas e culturais do fungo (ALVES, 1986; MOINO JUNIOR, 1993; VIEIRA et al., 1993; ALMEIDA et al., 1997; TAMAI, 1997; MANZINI et al., 1998; LOPES, 1999; TANZINI, 2002).

Estudando diversos isolados de *M. anisopliae* provenientes de algumas regiões do Brasil, SOUZA GÓMEZ e ALVES (1983) selecionaram os isolados SPL-52T e PL-39 como os mais apropriados para serem utilizados no controle microbiano de insetos. Os caracteres considerados foi produção de conídios sobre cadáveres de *Diatraea saccharalis*. Isolados de *M. anisopliae* tem sido selecionados para o controle de *Mahanarva posticata* utilizando-se os caracteres mencionados nos perfis biológico e bioquímico. Os isolados mais adequados ao controle da cigarrinha-das-folhas são os que

apresentam o padrão A de zimograma para esterase. Esse tipo de padrão eletroforético ocorre em mais de 90 % dos fungos isolados de *M. posticata* nas regiões de Alagoas, Pernambuco e Rio de Janeiro. O padrão B, menos específico para *M. posticata* tem sido constatado sobre *Deois. saccharalis*, *M. fimbriolata*, *Tyantha perditor*, *Deois flavopicta*, *Notozulia enteriana* e outros insetos (ALVES et al., 1983).

A idéia da utilização do *M. anisopliae* para controle de cigarrinha da cana-de-açúcar vem desde 1910, quando RORER propôs a produção de fungo em larga escala. O mesmo autor, em 1913, relatou que após ter efetuado aplicação de 2,8 Kg de “massa de fungo” por hectare, conseguiu uma média de 92 insetos mortos por perfilho de cana-de-açúcar, o que representava 460.000 insetos mortos por hectare. Após a introdução da cigarrinha da folha no nordeste do Brasil, o fungo *M. anisopliae* passou a ser utilizado em grande escala.

GUAGLIUMI (1970) relata ter obtido os primeiros resultados com o fungo, em ensaios contra a cigarrinha das raízes. O autor, em 1971 e 1972, relatou que esse entomopatógeno provocou 80 % de mortalidade de cigarrinha-das-folhas após 15 dias da aplicação. GUAGLIUMI et al (1974), efetuando experimento com *M. anisopliae* visando o controle de *M. posticata* observaram 30 % a 40 % de mortalidade de ninfas e 20 % a 30 % de infecção em adulto.

No ano de 1976, o IAA/PLANALSUCAR iniciou um programa de produção do *M. anisopliae*. Em 1977 foram tratados cerca de 2000 ha de cana-de-açúcar com o fungo, em 1982 o patógeno foi aplicado em cerca de 85.000 ha. Esse projeto é o maior projeto de controle microbiano por *M. anisopliae* existente no mundo. A área tratada com inseticidas se manteve inalterada, durante os últimos anos, em torno de 20.000 ha e a área tratada com o fungo passou de 6.000 ha em 1977 para 150.000 ha em 1984.

VEIGA (1979) relata ter obtido 65 % a 90 % de controle de *Aeneolamia selecta* na região de Bonito e Agrestina.

Na União Soviética este patógeno é produzido e formulado com o nome de Boverin, sendo aplicado em condições de campo contra *L. decemlineata* e *C. pomonella* (FERRON, 1978; ALVES, 1986). A utilização de *B. bassiana* em larga escala é feita na China visando o controle de *Ostrinia nubialis* e *Dendrolimus punctatus* (FERRON, 1981; HUSSEY & TINSLEY, 1981). Nos Estados Unidos a pesquisa com este patógeno tem sido realizada com mais de 750 espécies de insetos incluindo percevejos, besouro, lagartas, formigas (*Solenopsis* spp.) e pragas de produtos armazenados (NAS, 1979).

A utilização de fungos entomopatogênicos no controle das formigas cortadeiras teve destaque quando ALVES e SOUSA GÓMEZ (1983) isolaram uma linhagem de *B. bassiana* e *M. anisopliae* a partir de rainhas de *A. sexdens rubropilosa* e determinaram que o LT_{50} do *M. anisopliae* isolado SPL-54-A para “cortadeiras” foi de $67,2 \pm 0,06$ hs, sendo que para “soldados” o LT_{50} foi de $97,4 \pm 11,2$ hs e por outro lado, o LT_{50} de *B. bassiana* isolado SA-63-A para “cortadeiras” foi de $85,9 \pm 6,3$ hs e “soldados” foi de $94,5 \pm 7,9$ hs.

Tal alternativa foi reforçada após a coleta de machos de formigas *Labidus praedator* infectados naturalmente com *M. anisopliae*. Esse isolado foi extremamente virulento em bioensaios realizados com soldados de *A. sexdens rubropilosa*. (LIMA et al., 1988).

STIMAC et al. (1993) constataram que a patogenicidade de *B. bassiana* para formiga lava-pé variou com os diferentes isolados de fungos e diferentes técnicas experimentais usadas.

LOUREIRO e MONTEIRO (2004) relatam ter obtido diferenças na capacidade dos entre os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* de produzirem a morte de formigas de *Atta sexdens sexdens*, tendo os isolados AM 9 de *B. bassiana*, E9 de *M. anisopliae* e CG 189 de *P. farinosus* provocado as maiores médias de mortalidade de operárias de *Atta sexdens sexdens*. Nas concentrações de $1,0 \times 10^8$ e $1,0 \times 10^9$ conídios.mL⁻¹ foram as mais eficientes, tendo provocado menor tempo letal.

Segundo SOUSA GOMÉZ (1993), os isolados mais efetivos devem ser obtidos pela seleção do comportamento dos conídios, taxa de potência dos isolados sobre insetos, produção de conídios e crescimento das colônias, assim como atividades enzimáticas e resistência a ultravioleta.

A produção de enzimas nesses patógenos tem sido estudada com várias finalidades, dando uma delas a de correlacioná-la com os processos de patogenicidade e virulência (ALVES, 1986).

KODAINI (1961, 1962) e ROBISON (1966) estudaram o processo de penetração dos fungos *Aspergillus flavus*, *B. bassiana*, *M. anisopliae*, *Paecilomyces farinosus* e *Cordyceps militaris* através do tegumento de *Tenebrio molitor*, comparando com outros fungos não patogênicos e que não penetram a exocutícula. Os autores atribuíram a capacidade de produção de enzimas quitinolíticas ou proteolíticas à eficiência de penetração, embora estejam envolvidos no processo, aspectos de ordem mecânica como pressão das hifas.

ZACHARUK (1970a) descreveu a penetração física devido a pressão causada pelo grampo de penetração, que rompe as áreas membranosas e quitinosas do hospedeiro, e a penetração química que é o resultado da formação de enzimas.

ALVES (1986) afirmou que via de penetração normal dos fungos é pelo tegumento através de atividades enzimáticas ou pressão mecânica exercida pelo tubo germinativo e apressório. Outra via de penetração que pode ocorrer em controle biológico, é a oral ou penetração do fungo por espiráculos respiratórios.

PRASERTPHON e TANADA (1968) afirmam que os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana*, se desenvolveram na hemolínfa de insetos e que não invadem tecidos e órgãos até a morte do inseto.

PARIS e SEGRETON (1978) relatam que a virulência de *B. bassiana* estava relacionada à produção de lipase, o que facilitaria a seleção das raças com essas características.

AL-AIDROS e SEIFERT (1980) demonstraram que um mutante do *M. anisopliae* possui habilidade de degradar amido e quando crescia sobre meios de cultura contendo essa substância, comportava-se em forma hipervirulenta para o mosquito *Culex pipiens pipiens* em teste *in vitro*.

ROBERTS (1981) relatou a presença de toxinas Beauvericina produzida por *B. bassiana* e destruxina produzida por *M. anisopliae* que apresentam vantagens no seu baixo período de carência em condições de campo.

A relação entre a produção de toxinas na patogenicidade dos fungos podem ser a causa da morte dos insetos ao longo da infecção fúngica (FARGUES et al., 1984; SAMUELS et al., 1988a; SAMUELS et al., 1988b; ALVES, 1986a).

ROBERTS e CAMPEBL (1977) afirmaram que os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* são frequentemente isolados de insetos com hábitos terrestres, sendo estas espécies de entomopatógenos muito promissoras para o controle microbiano.

FARGUES e ROBERT (1985) relatam que o solo é um meio caracterizado por alta umidade, moderadas temperaturas e não é afetado diretamente pelas radiações ultravioleta. Estas características conferem aos fungos entomopatogênicos um ambiente apropriado para sua sobrevivência, podendo permanecer ativo por alguns meses ou anos. Segundo ALVES (1986) os fungos entomopatogênicos podem ser isolados por diferentes processos, como transferência da estrutura do fungo, do inseto colonizado de porções do tecido atacado, através de sementeira direta ou indireta de conídios, indicando o meio de BDA para cultura de fungo.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Procedência dos isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana*

Foram utilizados dois isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana*, ENA 4 e ENA 5 respectivamente, provenientes da coleção do Departamento de Entomologia e Fitopatologia (DENF) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRuralRJ), que estavam armazenados em tubos de ensaio contendo meio BDA (batata, dextrose e Agar), sob condições não controladas de ambiente; e 13 isolados obtidos a partir de formigas “soldados” do gênero *Atta* coletadas diretamente do campo em diferentes localidades do Estado do Rio de Janeiro (Tabela 01), procurando-se selecionar indivíduos que apresentavam sinais de enfraquecimento ou já mortos.

Os indivíduos foram mantidos em placas de Petri contendo papel de filtro previamente esterilizados e umedecidos com água destilada e esterilizada (Figura 02). As placas foram mantidas em temperatura ambiente.

Dos indivíduos que apresentaram exteriorização dos fungos foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA tendo pH 7,0 acrescido de antibiótico. As placas foram incubadas a 25 °C em estufa BOD.

Tabela 1 - Procedência dos isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* utilizados para seleção e caracterização da patogenicidade.

Isolados	Nº de registro	origem	Hospedeiro
<i>M. anisopliae</i>	ENA 01	UFRRJ*	<i>Atta sexdens rubropilosa</i>
	ENA02	ECOLOGIA/RJ*	<i>Atta sexdens rubropilosa</i>
	ENA03	INCRA/RJ	<i>Atta bisphaerica</i>
	ENA04	DENF	<i>Atta sexdens rubropilosa</i>
	ENA05	DENF	<i>Zullia enteriana</i>
	ENA09	CAMPO GRANDE/RJ	<i>Atta sexdens rubropilosa</i>
	ENA11	CACARIA/RJ*	<i>Atta sexdens rubropilosa</i>
	ENA12	VASSOURAS/RJ	<i>Atta sexdens rubropilosa</i>
<i>B. bassiana</i>	ENA06	CAMPO GRANDE/RJ	<i>Atta sexdens rubropilosa</i>
	ENA07	UFRRJ*	<i>Atta bisphaerica</i>
	ENA08	ITAGUAÍ/RJ	<i>Atta sexdens rubropilosa</i>
	ENA13	UFRRJ*	<i>Atta sexdens rubropilosa</i>
	ENA14	MIQUEL PEREIRA/RJ	<i>Atta sexdens rubropilosa</i>
ENA15	VASSOURAS/RJ	<i>Atta sexdens rubropilosa</i>	

(*) Município de Seropédica, RJ.

ENA – Escola Nacional de Agronomia

Denf – Departamento de Entomologia e Fitopatologia



Figura 2. Formigas “soldados” coletadas diretamente do campo com sinais de enfraquecimento ou já mortas mantidas em câmara úmida até ocorrer à exteriorização dos entomopatógenos.

3.2 Caracterização dos isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana*

A caracterização dos isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* obtidos das formigas e dos dois tubos do DENF foi efetuada após a germinação nas placas de isolamento e foram observadas as características das colônias com base na chave de identificação de SANSON (1988) e TULOCH (1978), que consiste no crescimento, coloração das colônias dos fungos, formato e tamanho dos conídios em exames ao microscópio óptico. Após sua caracterização, estes foram armazenados em tubos de ensaio contendo meio BDA.

3.3 Teste de patogenicidade dos isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* sob formigas do gênero *Atta sexdens rubropilosa* e *Atta bisphaerica*

Foram coletadas formigas “soldados” do gênero *Atta* diretamente do formigueiro que foram mantidas em Erlenmeyer de 250 mL previamente esterilizados. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, onde cada tratamento contou com 10 indivíduos e três repetições, e o tratamento testemunha recebeu 1,0 mL de água destilada e esterilizada. Posteriormente, uma alíquota de 1,0 mL de cada suspensão foi pulverizada sobre as formigas, utilizando-se pulverizador De Vilbes.

A partir dos isolados caracterizados que estavam armazenados em tubos de ensaio com meio BDA foram efetuados testes de patogenicidade para comprovação dessas características. Foram efetuados suspensões dos conídios acrescentando-se solução salina 0,85 % de NaCl acrescido de 0,05 % de Tween 80 aos tubos de ensaio, os quais foram agitados em vortex por 3 min, obtendo-se uma suspensão bem densa de conídios. Estas foram filtradas em lenço de papel escotex e aferidas com auxílio de hemacitômetro na concentração de $2,5 \times 10^8$ conídios.mL⁻¹. Após a pulverização os Erlenmeyer foram mantidos em temperatura ambiente e eram observados diariamente por um período de 120 h para retirada das formigas mortas. Essas foram mantidas individualizadas em

recipientes plásticos, previamente esterilizados, acrescidos de papel de filtro umedecido com água destilada e esterilizada, utilizada como câmara úmida para permitir a esporulação dos fungos.

3.4 Meios de cultura para produção de biomassa de *M. anisopliae* e *B. bassiana*

Visando a redução no tempo de produção de conídios secos destes fungos entomopatogênicos, foram experimentados quatro meios a base de arroz:

- 1) arroz parboilizado 100 g, caldo de batata 50 mL;
- 2) arroz parboilizado 100 g, caldo de batata 50 mL e dextrose 5,0 g;
- 3) arroz parboilizado 100 g, água destilada 50 mL e pepitona de soja 5,0 g;
- 4) arroz parboilizado 100 g e quitina líquida de uso agronômico 50 mL
- 5) testemunha arroz parboilizado 10 g e água destilada 50 mL.

Os meios foram armazenados em sacos plásticos de polipropileno. Em cada saco foi inoculado 3,0 mL de suspensão (3×10^7 conídios.mL⁻¹). As culturas foram mantidas em estufa incubadora tipo BOD a 25 ± 1 °C. Foram avaliados os tempos de início de esporulação em cada tratamento.

3.5 Quantificação de esporos produzidos por *M. anisopliae* e *B. bassiana* nos sacos de polipropileno com meio de arroz

A quantificação dos conídios foi efetuada a partir dos testes de produção de biomassa, inoculação e incubação. Nesses sacos foram testados três tratamentos com cinco repetições, quando foram introduzidas farinhas de trigo comercial em diferentes quantidades: 3,0, 6,0 e 9,0 g e o tratamento testemunha. Estes foram agitados manualmente promovendo atrito necessário para soltura dos conídios. Logo após foram peneirados, separando os grãos de arroz do “pó de conídios”, em seguida foram pesados em balança de precisão para estimar a quantidade de conídios em cada tratamento. Após a pesagem foram retiradas um grama de conídios de cada saco e diluído em 20 mL de solução salina a 8,5 % de NaCl e 0,05 % de Tween 80, estes foram diluídos sucessivamente e semeados em placas contendo meio de cultura BDA (batata dextrose Agar), acrescido de pentabiótico e colocados em estufa de crescimento a uma temperatura de 25 ± 1 °C por 48 h. Após este período foi estimada a quantidade de células viáveis através do método de placas de contagem.

3.6 Produção de biomassa inoculação e incubação dos fungos entomopatogênicos *M. anisopliae* e *B. bassiana*

O substrato utilizado como meio de cultura foi o arroz parboilizado, enriquecido com vitaminas e sais minerais, que foram acondicionados em sacos plásticos de polipropileno, medindo 35 cm de comprimento por 22 cm de largura, com 100 g de arroz e 50 mL de água (ALVES, 1986). Estes foram lacrados e autoclavados por duas vezes, à 120 °C espaçados de 24 h. Após autoclavagem estes foram agitados manualmente até que todos os grãos estivessem totalmente soltos. Após a conclusão do meio de arroz, os isolados que foram selecionados no teste de patogenicidade e que estavam armazenados

em tubos de ensaio contendo meio BDA foram suspensos em solução salina a 0,85 % de NaCl e 0,05 % de Tween 80, posteriormente agitados em agitador de bancada por ± 3 a 4 min e em seguida filtrados em lenço de papel, cada suspensão foi quantificada com auxílio de hemacitômetro 6×10^6 conídios.mL⁻¹. Os ensaios foram realizados no Laboratório do DENF da UFRRJ. De cada suspensão foram retiradas alíquotas de 3 mL utilizando-se de seringas descartáveis e que foram introduzida em cada saco plástico contendo o meio de arroz. Cada tratamento contou com cinco repetições, o delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado. Os sacos foram desinfetados com algodão embebido em álcool 96 °GL e após a retirada da agulha estes foram vedados com fita adesiva e colocados em estufa incubadora do tipo BOD a uma temperatura de 25 ± 1 °C. A cada 24 h os sacos eram agitados manualmente a fim de evitar que os grãos de arroz ficassem aderidos uns aos outros.

3.7 Teste de virulência

Neste trabalho foram testados os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* que foram caracterizados nos testes de patogenicidade e que estavam armazenados em tubos de ensaio contendo meio de cultivo BDA inclinado, em estufa tipo BOD e mantidos a temperatura de 25 ± 1 °C.

A partir dessas colônias foram preparadas suspensões de conídios em solução salina 0,85 % de NaCl acrescido de Tween 80 a 0,05 % na concentração de $1,0 \times 10^6$; $1,0 \times 10^7$; $1,0 \times 10^8$; $1,0 \times 10^9$; $1,0 \times 10^{10}$; $1,0 \times 10^{11}$ conídios.mL⁻¹ de suspensão.

De cada suspensão foram retiradas alíquotas de 1,0mL e estas foram pulverizadas com auxílio de pulverizador De Vilbes, sobre as formigas ‘soldados’ de *A. sexdens rubropilosa* e *A. bisphaerica*. Para cada concentração foram utilizados três Erlenmeyers de 250 mL, previamente esterilizados, contendo 10 formigas cada mais o tratamento testemunha onde foi pulverizado água destilada e esterilizada.

Os bioensaios, com formigas ‘soldados’, foram realizados a 22 °C, fotoperíodo de 12 h e na ausência de alimentação.

Foram efetuadas observações diárias por um período de 120 h quando eram retiradas as formigas mortas e colocadas individualizadas em recipientes plásticos forrado com papel de filtro previamente esterilizados (Figura 02). Foram determinados a TL₅₀ (tempo letal para matar 50 % dos indivíduos) e CL₅₀ (concentração letal para matar 50 % dos indivíduos), para cada isolado, através do método estatístico de Probit.



Figura 3. Formigas 'soldados' mantidas individualizadas, em câmara úmida até que se ocorre a exteriorização dos fungos.

3.8 Teste de Campo

O ensaio foi desenvolvido no período de dezembro 1997 a janeiro de 1998 (figura 3) nos campos da UFRuralRJ e Pesagro-RJ, no município de Seropédica, RJ. Quando foram localizados formigueiros de saúvas de *A. sexdens rubropilosa* e *A. bisphaerica*, de aproximadamente três anos de idade e demarcadas com estacas, nas quais foram inscritos os números dos isolados de fungos utilizados, os quais foram qualificados como melhores nos testes de virulência (TL_{50} e CL_{50}). O experimento contou com 18 formigueiros e dois tratamentos um com pulverização e outro com polvilhamento e mais o tratamento testemunha que recebeu água e o outro que recebeu farinha de trigo comercial. Os isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana*. A escolha dos olheiros de trabalho para a aplicação dos isolados baseou-se no fluxo de entrada e saída de formigas, isto é, escolheu-se aqueles que apresentaram maior movimentação. Em cada olheiro escolhido foram inoculados 4 litros contendo aproximadamente 10^9 conídios. mL^{-1} , utilizando-se um pulverizador manual de 4 litros, distribuídos uniformemente em cada olheiro. O polvilhamento foi efetuado utilizando-se 12 g de conídios que foram distribuídos uniformemente com polvilhadeira manual.

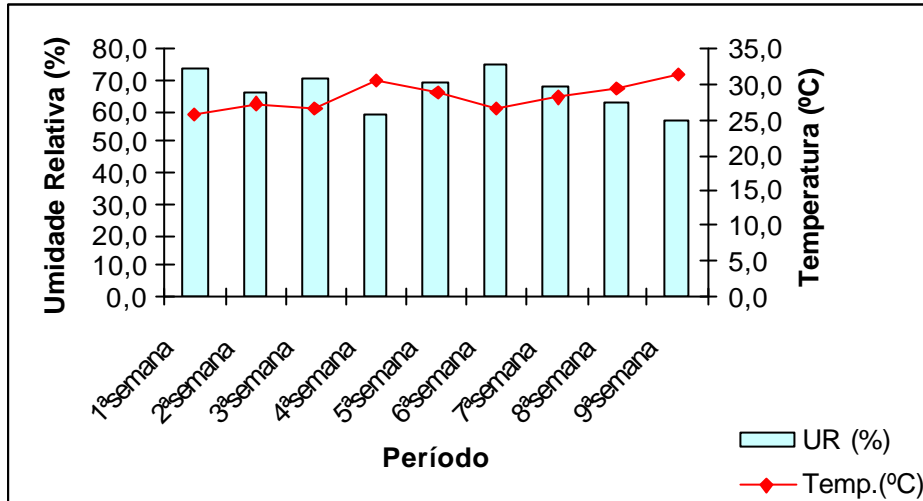
A inoculação foi repetida semanalmente durante quatro semanas e todos os formigueiros passaram a serem observados duas vezes por semana a partir da primeira aplicação.

Após trinta dias da primeira aplicação foram recolhidas 100 formigas (soldados e cortadeiras) diretamente de cada formigueiro tratado e levadas para laboratório e estas eram deixadas em Erlenmeyers sem alimentação até a sua morte, quando eram lavadas em álcool 70 % e colocadas individualizadas em caixas plásticas forradas com papel de filtro para verificar a exteriorização dos respectivos entomopatógenos sobre os cadáveres das formigas.

Decorridos trinta dias após a aplicação foram coletadas formigas diretamente dos formigueiros que sofreram aplicações e coletadas 100 formigas e levadas para laboratório a fim de observar a exteriorização dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana*. Todas as

formigas (soldados e cortadeiras), coletadas 30 dias após a aplicação dos fungos, estavam apenas infectadas por *Aspergillus* sp. Todavia, das amostras de solo foi encontrado um nível de $3,3 \times 10^7$ conídios.g de solo.

Figura 4. Dados climáticos observados durante o período de dezembro de 1997 à de janeiro 1998



UR Média = 66,8 %
Temp. Média = 28,3 °C

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolados

Das 12 diferentes localidades do Estado do Rio de Janeiro, obtiveram-se as formigas naturalmente infectadas por *M. anisopliae* e *B. bassiana*, pois quando colocadas em meio BDA formaram-se colônias morfológicamente características dessas espécies, baseando-se na chave de classificação de SANSON (1988) e TULOCH (1978)

Todos os oitos isolados testados promoveram a morte das formigas ‘soldados’ *Atta sexdens rubropilosa* e *Atta bisphaerica*, os isolados foram classificados em dois grupos (Tabela 02) sendo mais virulentos, os que causaram uma porcentagem igual ou acima de 50 % dentro de 72 h; e os menos virulentos, os que levaram acima desse tempo para causar essa mesma porcentagem de mortalidade (figura 03 e 04). Quando comparados com o tempo que cada isolado levou para matar todos os indivíduos.

Nos experimentos realizados *in vitro*, por meio de pulverização sobre formigas soldados de *A. sexdens rubropilosa* e *A. bisphaerica* foi possível estimar a porcentagem da mortalidade causada por todos os isolados, sendo que ao final de 168 h todas as formigas estavam mortas.

Com base nos resultados do teste de patogenicidade efetuado pode-se verificar a eficiência dos isolados ENA 1, ENA 2, ENA 3 e ENA 4 de *M. anisopliae* e ENA 6, ENA 7, ENA 13, ENA 14 de *B. bassiana* em relação aos outros isolados testados.

Apesar de promoverem a morte dos indivíduos os isolados ENA 5, ENA 8, ENA 9 ENA 10, ENA 11 e ENA 15 levaram maior tempo para matar as formigas.

Mesmo passado 11 anos de armazenamento em água mineral não gasosa e esterilizada, sob condições de laboratório, o isolado (um dos oito isolados de *M. anisopliae*), adquirido da micoteca do DENF/UFRuralRJ, ENA 4 apresentou-se viável (Tabela 02).

Tabela 02 - Classificação de isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* caracterizados a partir de sua morfologia e capacidade da virulência sob formigas “soldados” de *Atta sexdens rubropilosa* e *Atta bisphaerica*.

Isolados	Capacidade de virulência
ENA 1	+
ENA 2	+
ENA 3	+
ENA 4	+
ENA 5	-
ENA 6	+
ENA 7	+
ENA 8	-
ENA 9	-
ENA 11	-
ENA 12	-
ENA 13	+
ENA 14	+
ENA 15	-

(+) mais virulento, (-) menos virulento.

Figura 5. Patogenicidade de isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* estimada pela porcentagem de formigas soldados mortas de *A. sexdens rubropilosa* através de pulverização com suspensão de conídios contendo aproximadamente 10^8 ufc.mL⁻¹.

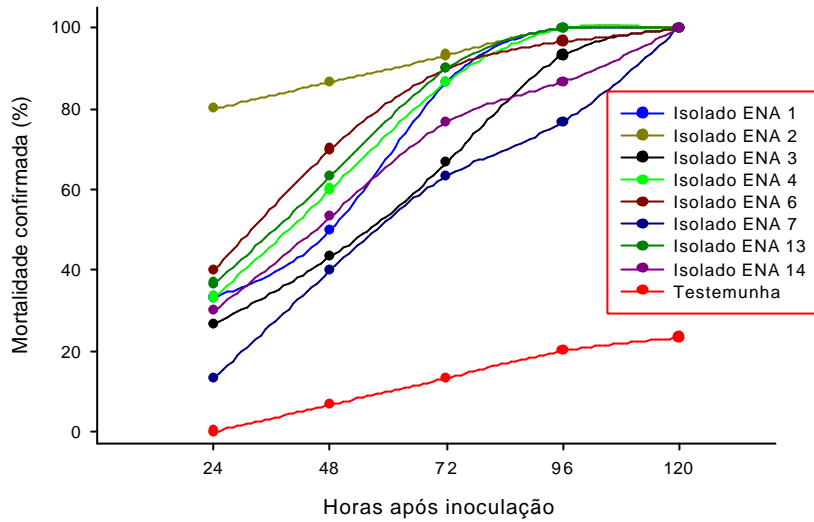
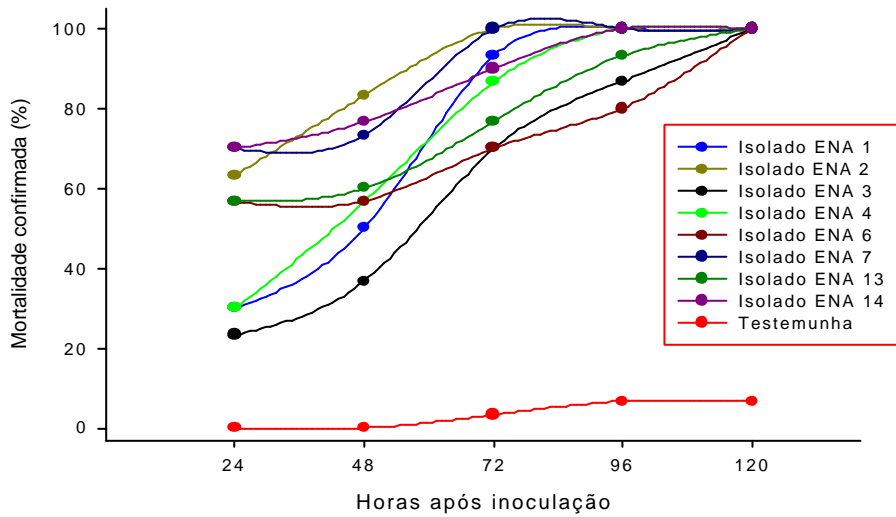


Figura 6. Patogenicidade de isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* estimada pela porcentagem de formigas soldados mortas de *A. bisphaerica* através de pulverização com suspensão de conídios contendo aproximadamente 10^8 ufc.mL⁻¹.



4.2 Produção de biomassa dos entomopatógenos

Os resultados obtidos no experimento 2 indicaram que o meio de arroz parboilizado é o mais indicado para produção em relação aos outros meios testados quando comparados a quantidade de conídios produzidos no tempo inicial de produção que após 14 dias apresentaram colonização total dos fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana*.

No meio de arroz parboilizado + caldo de batata e o arroz parboilizado + caldo de batata + dextrose ocorreu fermentação e não havendo produção de conídios em todas as repetições. Essa fermentação pode ter sido decorrente da quantidade utilizada do caldo da batata e da dextrose uma vez que a Universidade da Florida produz *B. bassiana* em meio líquido contendo de 1 % a 2 % de levedura e de 1 % a 2 % de açúcar, que é então usada na inoculação de arroz cozido.

O meio com arroz parboilizado + peptona de soja apresentou uma esporulação fraca, obtendo-se 3,0 g de conídios com aproximadamente 10^7 conídios.g⁻¹ e o arroz parboilizado + quitina líquida também apresentou fraca esporulação obtendo-se 5,0 g de conídios com aproximadamente 10^8 conídios.g⁻¹, já o arroz parboilizado + água foram obtidos 9,0 g de conídios com aproximadamente 10^9 conídios.g⁻¹. Resultados semelhantes foram obtidos por ALVES (1986).

4.3 Teste de patogenicidade *in vitro*

Os resultados obtidos no experimento três demonstram que após 120 h a $2,5 \times 10^8$ conídios.mL⁻¹ quatro isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* apresentaram valores de mortalidade confirmada entre 77,50 % e 20 % para soldados de *A. bisphaerica* e 66,66 % a 31,66 % para soldados de *A. sexdens rubropilosa*. Sendo que quatro isolados de *M. anisopliae* apresentaram mortalidade confirmada acima de 50 % já os isolados de *B. bassiana* apresentaram três isolados acima de 50 % e um apresentou 20 % de mortalidade confirmada para soldados de *A. bisphaerica*.

Para *A. sexdens rubropilosa* três isolados de *M. anisopliae* apresentaram mortalidade confirmada acima de 50 % e um isolado ficou abaixo apresentando 46,66 % para o isolado de *B. bassiana* a mortalidade confirmada foi de três isolados acima de 50 % e um isolado abaixo apresentando 31,66 %.

A partir desses resultados os isolados com maior desempenho para *A. bisphaerica* foram (ENA 4, ENA 6, ENA 13, ENA 2, ENA 3, ENA 14, ENA 1 e ENA 7) e para *A. sexdens rubropilosa* (ENA 4, ENA 13, ENA 14, ENA 2, ENA 3, ENA 6, ENA 1 e ENA 7). Os valores da concentração letal (CL₅₀) de *M. anisopliae* variaram de $1,29 \times 10^2$ até $1,74 \times 10^{12}$ e para *B. bassiana* a CL₅₀ variaram de $7,49 \times 10^5$ até $2,88 \times 10^8$ para *A. bisphaerica*.

4.4 Avaliação da virulência dos isolados selecionados

A porcentagem de mortalidade dos isolados para TL₅₀ demonstram que houve diferenças significativas entre eles sendo que os isolados ENA 4 de *M. anisopliae* foi o melhor para soldados de *Atta bisphaerica* e para *B. bassiana* foram os isolados ENA 6 e ENA 13 que não apresentaram diferenças significativas entre eles, os isolados ENA 2, ENA 3, ENA 14 e ENA 7 também provocaram a morte dos soldados. Para soldados de *A. sexdens rubropilosa* o isolado ENA 4 também apresentou maior eficiência já para *B.*

bassiana os melhores isolados e que não apresentaram diferença significativa entre eles foram os isolados ENA 13, ENA 14, ENA 2, ENA 3 e ENA 4 respectivamente os isolados ENA 1 e ENA 7 também provocaram a morte dos soldados porém levaram maior tempo para promover a morte dos soldados (Tabela 3 e 4). Esses resultados são discordantes do encontrados por PEREIRA et al. (1993a) com o isolado 447, em operárias de *Solenopsis invicta*, que obtiveram 100 % de infecção e mortalidade. STIMAC et al. (1993) verificaram que o tratamento de colônias de *S. invicta*, em laboratório, com 1 g e 2 g de conídios de *B. bassiana*, matou cerca de 90 % das formigas. BROOME (1974) citado por PEREIRA et al. (1993b), relatou que a mortalidade de operárias de *Solenopsis* sp. Provocada pelo fungo *B. bassiana* em laboratório, variou em torno de 35 % e QUATTLEBAUM (1980), citado por PEREIRA et al. (1993b) constatou que a mortalidade de operárias de *Solenopsis* sp., na mesma condição anterior, foi de 94 %. Resultados semelhantes foram obtidos por SILVA e DIELH-FLEIG (1988).

Tabela 3 Comparação dos tempos letais (TL₅₀) entre os diferentes isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* para soldados de *A. bisphaerica*

Isolados	Mortalidade confirmada (%) ¹	TL ₅₀ e IC ² (dias)	Equação da reta	X ² Calculado
----- <i>Metarhizium anisopliae</i> -----				
ENA 1	53,33 C	2,21 (1,28 – 3,82)	Y= 4,251724 + 2,168331 logX	11,50
ENA 2	60,00 B	1,87 (1,19 – 2,94)	Y= 4,226904 + 2,842559 logX	4,06
ENA 3	55,00 C	2,08 (1,09 – 3,97)	Y= 4,415365 + 1,833416 logX	5,86
ENA 4	77,50 A	1,15 (0,61 – 2,19)	Y= 4,81504 + 2,894167 logX	1,41
----- <i>Beauveria bassiana</i> -----				
ENA 6	64,16 B	1,39 (0,52 – 3,75)	Y= 4,777481 + 1,550309 logX	2,14
ENA 7	20,00 C	5,15 (2,21 – 12,06)	Y= 2,676178 + 3,262102 logX	3,99
ENA 13	63,33 B	1,44 (0,55 – 3,78)	Y= 4,755611 + 1,543221 logX	4,07
ENA14	55,00 C	2,05 (0,92 – 4,59)	Y= 4,543898 + 1,454963 logX	2,37
Testemunha	6,66			
C.V.(%) = 13,87				

¹Médias com letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott (p=0,05).

²TL₅₀ = Tempo letal / IC (95 %) = Intervalo de confiança. Significância ao nível de 5 % de probabilidade.

Tabela 4 Comparação dos tempos letais (TL₅₀) entre os diferentes isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* para soldados de *A. sexdens rubropilosa*

Isolados	Mortalidade confirmada (%) ¹	TL ₅₀ e IC ² (dias)	Equação da reta	X ² Calculado
----- <i>Metarhizium anisopliae</i> -----				
ENA 1	46,66 C	2,65 (1,69 – 4,16)	Y= 3,824226 + 2,776277 logX	14,68
ENA 2	57,50 B	1,96 (1,17 – 3,31)	Y= 4,306917 + 2,358944 logX	1,60
ENA 3	54,16 B	2,14 (1,04 – 4,39)	Y= 4,463943 + 1,620698 logX	4,38
ENA 4	66,66 A	1,37 (0,61 – 3,11)	Y= 4,738206 + 1,909517 logX	0,97
----- <i>Beauveria bassiana</i> -----				
ENA 6	54,16 B	2,14 (1,11 – 4,16)	Y= 4,413738 + 1,768307 logX	6,60
ENA 7	31,66 D	3,57 (2,25 – 5,68)	Y= 3,092711 + 3,447097 logX	2,39
ENA 13	59,16 B	1,95 (1,37 – 2,82)	Y= 3,963908 + 3,571529 logX	11,14
ENA 14	59,16 B	1,68 (0,66 – 4,31)	Y= 4,686997 + 1,383894 logX	2,67
Testemunha	6,66			
C.V. (%) = 17,75				

¹Médias com letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott (p=0,05).

²TL₅₀ = Tempo letal / IC (95 %) = Intervalo de confiança. Significância ao nível de 5 % de probabilidade.

Comparações dos limites fidiciais mostraram que TL₅₀ para o isolado ENA 7 de *B. bassiana* diferiu significativamente do TL₅₀ do isolado ENA 4 de *M. anisopliae* tanto para “soldados” de *A. bisphaerica* e *A. sexdens rubropilosa*.

4.5 Concentração letal

Os resultados deste experimento (Tabela 5 e 6) referem-se as porcentagens de mortalidade de formigas para as soldados *A. bisphaerica* e *A. sexdens rubropilosa* para diferentes isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana*.

Com base na análise estatística, as porcentagens de mortalidade confirmada de soldados de *A. bisphaerica* demonstram que os isolados ENA 14, ENA 13 e ENA 6 não diferem entre si proporcionando uma taxa de mortalidade superior acima de 66,44% a 68,33 % em concentrações que variaram entre 10⁵ e 10⁶, seguida dos isolados ENA 2, ENA 4, ENA 7, ENA 1 e ENA 3, que apresentaram porcentagens de mortalidade entre 63,89% a 43,89% e concentração variando de 10⁶ a 10¹² conídios.mL⁻¹. Para as formigas soldados de *A. sexdens rubropilosa* os melhores isolado foram ENA 14 e ENA 6 que apresentaram porcentagens de mortalidade variando de 71,67 % a 68,33 % seguidos dois isolados ENA 2, ENA 4, ENA 13, ENA 1, ENA 3 e ENA 7 que apresentaram porcentagem de mortalidade entre 63,89 % a 43,89 % respectivamente.

As Tabelas 5 e 6 também sumarizam a virulência relativa para formigas “soldados” de *A. bisphaerica* e *A. sexdens rubropilosa* expostas a oito isolados de fungos. A concentração letal mediana (CL₅₀) dos isolados testados contra *A. bisphaerica* variou de 1,29 x 10² a 2,94 x 10⁹ conídios.mL⁻¹, e baseando-se nos limites fiduciais, não houve diferença significativa entre os isolados.

Para *A. sexdens rubropilosa*, os valores de (CL₅₀) variaram de 1,08x10⁻⁵ a 2,93 x 10¹⁰ conídios.mL⁻¹, e também não houve diferença significativa entre isolados.

Quando comparamos os resultados verifica-se que *B. bassiana* apresenta dois isolados como melhores para *A. bisphaerica* e um isolado de *M. anisopliae* ENA 6, que diferente nas concentrações variando de 10⁵ e 10⁶ conídios.mL⁻¹, e o tempo letal varia de 2,05 dias a 1,44 dias respectivamente. No caso de *A. sexdens rubropilosa* os isolados que apresentaram maior eficiência foram os isolados ENA 14 de *B. bassiana* e o isolado ENA 6 de *M. anisopliae* que apresentaram concentração letal entre 71,67 % a 68,33 % conídios.mL⁻¹ e o tempo letal variou de 1,68 dias a 2,14 dias. Os resultados estão de acordo com estão de acordo com (LOUREIRO, 2004) que quando comparou os valores dos intervalos de confiança, observou que ocorre diferença significativa entra as concentrações testadas. Verificou-se que as concentrações 1,0 x 10⁹ 1,0 x 10⁸ conídios.mL⁻¹ do isolado E9 de *M. anisopliae* causaram tempos letais de 2,50 e 3,26 dias respectivamente. Já para o isolado AL observou-se um TL₅₀ de 3,27 dias para a concentração de 1,0 x 10⁶ conídios.mL⁻¹.

ALVES et al. (1983) testaram a patogenicidade de uma linhagem de *B. bassiana* e uma de linhagem de *M. anisopliae*, isolado de *A. sexdens rubropilosa*, proveniente da região de Piracicaba, SP, sobre soldados e cortadeiras desta mesma espécie. Constataram que ambos os fungos foram patogênicos a formiga, sendo que os soldados foram mais sensíveis à *B. bassiana* e as cortadeiras à *M. anisopliae*. A patogenicidade de *B. bassiana* para a formiga lava-pés variou com os diferentes isolados de fungos de diferentes técnicas experimentais usadas (STIMAC et al., 1993).

4.6 Avaliação da tecnologia de aplicação dos isolados selecionados no controle de *A. bisphaerica* e *A. sexdens rubropilosa* em condições de campo.

Os resultados indicaram que em termos de atividade e mortalidade de formigas nos ninhos, na primeira semana após a aplicação, o nível de atividade diminuiu em todos os olheiros onde foram pulverizados e polvilhados com os isolados ENA 4 de *M. anisopliae* e ENA 13 de *B. bassiana*, os quais foram os melhores qualificados no teste *in vitro*. No 15^o dia, mais de 40 % dos olheiros não apresentaram atividade de formigas. Passados 20 dias, 65,5 % dos ninhos estavam inativos. Após 30 dias os olheiros ainda apresentavam pouca atividade.

Todas as formigas (soldados e cortadeiras), coletadas 30 dias após a aplicação dos fungos, estavam apenas infectadas por *Aspergillus* sp. Todavia, das amostras de solo foi encontrado um nível de $3,3 \times 10^7$ conídios.g/solo.

Esses resultados são discordantes aos obtidos por STIMAC et al. (1988) que obteve uma variação de mortalidade de 60,7 % a 100 % utilizando uma dose mínima de 12,5 g e máxima de 200 g.

Tabela 5 Comparação das concentrações letais (CL₅₀) entre os diferentes isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* para soldados de *A. bisphaerica*

Isolados	Mortalidade Confirmada (%) ¹	CL ₅₀ e IC ² (Conídios mL ⁻¹)	Equação da reta	X ² Calculado
----- <i>Metarhizium anisopliae</i> -----				
ENA 1	45,00 C	1,29 x 10 ² (5,87 x 10 ⁻³⁹ - 1,70 x 10 ³⁸)	Y= 4,977174 - 0,001210235 logX	9,61
ENA 2	63,89 B	5,44 x 10 ⁶ (9,26 x 10 ⁶ - 3,19 x 10 ⁸)	Y= 3,567308 + 0,2127025 logX	29,94
ENA 3	43,89 C	2,94 x 10 ⁹ (4,40 x 10 ⁷ - 1,96 x 10 ¹¹)	Y= 3,444598 + 0,1645811 logX	8,47
ENA 4	60,56 B	1,74 x 10 ¹² (3,19 x 10 ⁷ - 9,53 x 10 ²⁰)	Y= 5,882606 - 0,007209718 logX	6,73
----- <i>Beauveria bassiana</i> -----				
ENA 6	68,33 A	1,12 x 10 ⁶ (7,38 x 10 ³ - 1,89 x 10 ⁸)	Y= 3,735052 + 0,20822868 logX	23,53
ENA 7	50,56 C	2,88 x 10 ⁸ (2,62 x 10 ⁷ - 3,18 x 10 ⁹)	Y= 2,820892 + 0,2575522 logX	30,36
ENA 13	68,89 A	4,39 x 10 ⁵ (6,02 x 10 ² - 3,19 x 10 ⁸)	Y= 3,9787993 + 0,1809966 logX	5,81
ENA 14	69,44 A	7,49 x 10 ⁵ (3,17 x 10 ³ - 1,76 x 10 ⁸)	Y= 3,794259 + 0,205272 logX	14,53
testemunha	0,00			
C.V.(%) = 18,03				

¹Médias com letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott (p=0,05).

²CL₅₀ = Concentração letal / IC (95 %) = Intervalo de confiança. Significância ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 6 Comparação das concentrações letais (CL₅₀) entre os diferentes isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* para soldados de *Atta sexdens rubropilosa*

Isolados	Mortalidade Confirmada (%) ¹	CL ₅₀ e IC ² (Conídios/ml)	Equação da reta	X ² Calculado
----- <i>Metarhizium anisopliae</i> -----				
ENA 1	45,56 C	1,24 x 10 ¹⁰ (3,90 x 10 ⁶ - 4,00 x 10 ¹³)	Y= 3,975456 + 0,1014714 logX	8,04
ENA 2	62,78 B	3,83 x 10 ⁶ (1,21 x 10 ⁴ - 1,20 x 10 ⁹)	Y= 3,967355 + 0,15683 logX	27,46
ENA 3	43,89 C	7,75 x 10 ⁹ (4,57 x 10 ⁷ - 1,31 x 10 ¹²)	Y= 3,510174 + 0,150628 logX	12,13
ENA 4	62,22 B	1,08 x 10 ⁻⁵ (5,87 x 10 ⁻³⁹ - 1,70 x 10 ³⁸)	Y= 5,102262 + 0,0206044 logX	5,82
----- <i>Beauveria bassiana</i> -----				
ENA 6	68,33 A	1,12 x 10 ⁵ (3,36 - 3,73 x 10 ⁹)	Y= 4,3320092 + 0,1322844 logX	19,34
ENA 7	43,89 C	2,93 x 10 ¹⁰ (4,92 x 10 ⁶ - 1,75 x 10 ¹⁴)	Y= 3,900324 + 0,1050544 logX	11,64
ENA 13	58,89 B	2,55 x 10 ⁶ (77,21 - 8,47 x 10 ¹⁰)	Y= 4,41728 + 0,009093858 logX	18,15
ENA 14	71,67 A	6,94 x 10 ⁴ (5,04 - 9,53 x 10 ⁸)	Y= 4,255732 + 0,153721 logX	12,62
Testemunha	3,33			
C.V.(%) = 18,95				

¹Médias com letras iguais na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott (p=0,05).

²CL₅₀ = Concentração letal / IC (95 %) = Intervalo de confiança. Significância ao nível de 5 % de probabilidade.

5 – CONCLUSÕES

Atta sexdens rubropilosa e *Atta bisphaerica* são suscetível à ação patogênica dos fungos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* na concentração de 10^6 até 10^{11} observada em cadáveres inoculados com suspensões de todos os fungos testados.

Os fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* mostraram diferentes capacidades de produzir a morte de formigas, tendo os isolados ENA 4 de *M. anisopliae* e de ENA14, ENA 13 e ENA 6 *B. bassiana* provocado as maiores médias de mortalidade de soldados de *Atta sexdens rubropilosa* e *Atta bisphaerica*.

Os isolados ENA 1, ENA 2, ENA 3, ENA 4, ENA 6, ENA 13 e ENA 14 causaram mortalidade em menor tempo do que o isolado ENA 7.

A concentração de conídios de todos os isolados necessária para matar 50% da população de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa* é a mesma.

Os isolados ENA 4 *Metarhizium anisopliae* e ENA 13 de *Beauveria bassiana* são capazes de reduzir a atividade das formigas *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa* quando aplicados nos olheiro, seja por pulverização ou por polvilhamento.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-ADIDROS, K. SEIFERT, A.M. Polisacharide and protein degradation, germination and virulence against mosquitoes, In the entomopatogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **J. Invertebr. Pathol**, v. 36, p. 29-34, 1980.
- ALLEN, G.E.; BUREN, W.F. Microsporidian and fungal diseases of *Solenopsis invicta* Buren in Brazil. **J. New Yst Entomol. Soc.**, v.82, p.125-130, 1974.
- ALVES, J.E.M.; ALMEIDA, A.F.; LARANJEIRO, A.J. Os porta-iscas no contrle de saúvas (*Atta*, Formicidae) em florestas implantadas de eucaliptos: Análise de eficiência em 4 densidades. **Silvicultura**, v. 10, n. 39, p. 32-33, 1984.
- ALVES, S.B. Controle de cupins com fungos entomopatogênicos In: 14 SIMPÓSIO SOBRE O MANEJO DA PASTAGEM, 1994, Piracicaba. **Anais**. Piracicaba. FEALQ, 1994. p.99-105. ALVES, S.B. Fungos entomopatogênicos. In: Alves, S.B. Coord. Controle microbiano de insetos. São Paulo, p. 73-126, 1986.
- ALVES, S.B.; PEREIRA, R.M.; ALMEIDA, J.E.M.; SILVEIRA NETO, S.; MOINO JR, A. Microbial control of *Heterotermes tenuis* (Isoptera:Rhinotermitidae) in Brazil. In: ESA Annual Meeting. **Abstract**: Las Vegas-EUA, p. 323, 1998.
- ALVES, S.B.; SOUSA, G.D.R. Virulência do *Metarhizium anisopliae* (METCH.) SOROK. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. para duas castas de *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908). **Poliagro**, v. 5, n. 1, p. 1-19, 1983.
- ALVES, S.B.; TANZINI, M.R. Utilização de fungos entomopatogênicos para o controle de *Leptopharsa heveae* (Hem.: Tingidae) na cultura da seringueira. In: VII SICONBIOL, 2001, Poços de Caldas. VII Siconbiol. Lavras : Siconbiol, v. 1, p. 442, 2001.
- AMANTE, E. Ensaio competitivo no combate à saúva *Atta sexdens rubroilosa* Forel 1908, com brometo de metila, aldrim (pó) a 2,5 % e bissulfureto de carbono, **Divulg. Agron.** v. 5, p. 2-11, 1962.
- AMANTE, E. Nota prévia sobre a estrutura do ninho de uma nova formiga saúva (*Atta* sp.) (Hymenoptera, Formicidae). **O Biológico**, v. 30 n. 4, p.96-97, 1964.
- AMANTE, E. Saúva tira boi da pastagem. **Coopercotia**, São Paulo, n. 23, v. 207, p. 38-40, 1967b.
- AMANTE, E. **A saúva *Atta capiguara*, praga das pastagens**. Secr. Agric. S.Paulo, Departamento Produção Veg., Instruções práticas. n. 41, p. 12, 1967a.

- AMANTE, E. Emprêgo de nova isca à base de dodecacloro (Mirex 0,45 %) no combate à formiga saúva: *Atta sexdens rubropilosa* FOREL, 1908 e *Atta laevigata* (F. SMITH, 1958) -Hymenoptera, Formicidae. **O Biol.**, v. 34, n. 6, p. 123-128, 1968a.
- AMANTE E. Combate à formiga saúva *Atta capiguara* Gongalves (1944) praga das pastagens, com formicidas: concentrados emulsionáveis, gases liquefeitos, pós-secos e iscas granuladas. **O Biológico**, v. 34, n. 7, p.149-158, 1968b.
- AMANTE, E. Competição entre iscas granuladas à base de aldrim e Mirex (dodecacloro) no combate à formiga saúva: *Atta sexdens rubropilosa* FOREL, 1908 e *Atta laevigata* (F. SMITH, 1958) Hymenoptera Formicidae. **O Biol.**, v. 34, n. 7, p.168-171, 1968.
- AMANTE, E. Novo método para o combate da saúva. **A granja**, Porto Alegre, RS. p. 30-38, 1975.
- ANJOS, N.; DELLALUCIA, T.M.C.; NAYHÊ-NUNES, A.J. Guia Prático sobre **Formigas Cortadeiras**. Ponte nova –MG, Editora Graff Cor Ltda., 100 p., 1998.
- ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE DEFENCIFOS AGRÍCOLAS (ANDEF). **Relatório Técnico**. S.P., 1989.
- AUTUORI, M. combate a formiga saúva. **O Biológico** v. 13, p.196-199, fig 6, 1947a.
- AUTUORI, M. Contribuição para o conhecimento da saúva **Ciência e Cultura**, v. 1-2, p.4-12, fig. 8, 1950.
- AUTORI, M. MM33, um novo formicida à base de metila no combate à formiga saúva (*Atta spp*). **O Biológico**, v.16 n(11) p.196-180, 1950.
- BALFOUR-BOWNE, F.L. The green muscardine disease od insects, with special reference to an epidemic in swarm of locusts in Eritrea. **Proceeding of Royal Entomological Society of London**, v. 35, p. 65-74, 1960.
- BERTI FILHO, E. (Coord.) et ali. **Manual de Pragas em Florestas: Cupins ou térmitas**. Piracicaba-SP, IPEF, 56p, 1993.
- BORGMEIER, T. *Canthon dives* (Col., Copridae) predador das fêmeas de *Atta laevigata* Smith, (Hym., Formicidae). **Revista de Entomologia**, v.7, p.117-118, 1937.
- BORGMEIER, T. Revision der gatung *Atta* Fabricius (Hymenoptera, Formicidae). **Studia Entomologica**, v.2 n.(1-4), p.321-390, 1959.
- BROOKS, G.T. Chlorinated insecticides. **Biological and environmental aspects**, New York, CRC Press. p. 197, 1975.

- BROOME, J.R. Microbial control of the important fire ant, *Solenopsis richteri* Forel (Hymenoptera: Formicidae). Ph.D. **dissertation**, Mississippi State University, Mississippi State, MS, 1974.
- BUSOLI, A.C.; FERNANDES, O.A. & BORGIO, A. Formilin. Alternativa para o controle das formigas cortadeiras. **Atualidades Agrícola**, v. 5, p. 517, 1988.
- CHERRETT, J.M. Baits for the control of leaf-cutting ants: I Formulation. **Tropical Agriculture**, v. 46, p. 81-90, 1969.
- D'ARAUJO e SILVA, A.G.; GONÇALVES, C.R.; GALVÃO, D.M.; GOLÇALVES, A. J.L.; GOMES, J.; SILVA, M.N. e SIMONE, L. **Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil. Seus parasitos e predadores**. Parte II. Primeiro Tomo. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, Serviço de Defesa Sanitária Vegetal, p. 622, 1968.
- DELLA LUCIA, T.M.C.; VILELA, E.F.; MOREIRA, D.D.O.; BENTO, J.M.S. & ANJOS, N. Egg-laying in *Atta sexdens rubropilosa*, under laboratory conditions. In: VANDER MEER, R. K.; JAFFÉ, K. & CEDEÑO, A. (EDS.). **Applied Myrmecology: A World Perspective**. BOULDER, Westview Press. p. 173-179, 1990.
- DELLA LÚCIA, T.M.C; ANJOS, N.; SILVA, A.M.; BARCELOS, J.A.V.; BENTO, J.M.S.; FOWLWER, H.G.; FORTI, L.C.; FREITAS, G.D.; MORAES, E.J.; MOREIRA, D.D.O.; OLIVEIRA, A.C.; OLIVEIRA, M.A.; PINHÃO, M.A.S.; VILELA, E.F., YASSU, W.K. **As formigas cortadeiras**. Viçosa 1993.
- DELLA LUCIA, T.M.C. & VILELA, E.F. As formigas cortadeiras. **Sociedade de investigações Florestais SIF** Viçosa-Minas gerais, 262, 1993.
- DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M.E., PACHECO, M.R.M. Teste de patogenicidade dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em *Atta sexdens piriventris* (SANTSCH, 1919) em diferentes temperaturas. **Ciência e Cultura**, v. 40, n. 11, p.1103-1105, 1988.
- DORNAS FILHO, J. Aspectos da economia colonial. (Ed). **Coleção Estudos Brasileiros** Vol. 1. Editora Itatiaia Ltda. B. Horizonte 2^o p.272, 1959.
- DURVAL, G. Fumigação experimental de saueiros com brometo de metila. **O Biológico**, v.15 n. 1: p. 1-20, 1949.
- FARGUES, J. Adesion of fungal spore tho the insecta cuticle in relation to patogenicity. In: ROBERTS, W.D. & AIST, **J.R. Infection processes offungy**. New York, Rockefeller Foundation, p.185-196, 1984.

- FERRON, P. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. **Annual Review of Entomology**, v. 23, p. 409-442, 1978.
- FERRON, P. Pests control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. In: BURGUES, H.D. (Ed.). **Microbial control of pests and plant Diseases 1970-1980**, London, Academic Press, 465-482, 1981.
- FORTI, L.C. BOARETTO, M.A.C. **Formigas Cortadeiras: Biologia, Ecologia, Danos e Controle**. Botucatu-SP, 61p, 1997.
- FOWLER, H.G.; FORTI, L.C.; Di ROMAGNANO, L.F.T. Methods for the evaluation of leaf-cutting ant harvest. In: VANDER MEER, R.K.; JAFFÉ, K. & CEDEÑO, A. **Applied myrmecology: a world perspective**. Boulder, Westview Press. p.218-241, 1990.
- FREIRE, J.A.H.; VANETTI, F. Nota prévia sobre o emprego de iscas granuladas no controle da saúva *Atta sexdens rubropilosa* FOREL, 1908. **Revista Ceres**, v.14: p.225-228, 1968.
- FREIRE, J.A.H. **Emprego de iscas granuladas no controle da saúva** Tese de Mestrado, UFV, Viçosa. 45, 1971.
- GIBSON, J.R.; IVIE, J.W.; DOROUGH, H.W. Fate of Mirex and its major photodecomposition product in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 20 n(6), p.1246-1248, 1972.
- GONÇALVES, C.R. Distribuição, biológica e ecológica das saúvas. **Divulg. Agron.** v.1: p.2-10, 1960.
- GONÇALVES, C.R. As formigas cortadeiras. **Bol. do Campo**. V.20 n(181): p.7-23, 1964.
- GONÇALVES, C.R. *Atta silvae*, nova espécie de formiga saúva (Hymenoptera, Formicidae). **Arq. Univ. Fed. Rur. Rio de Janeiro** 5(2): 173-178, 1982.
- GUAGLIUMI, P.A. cigarinha-das-pastagens ataca a cana-de-açúcar no Nordeste do Brasil. **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v.76 n(4): p.89-91, 1970.
- GUAGLIUMI, P.; MARQUES, E.J.; VILLAS BOAS, A.M. Contribuição ao estudo da cultura e aplicação de *Metarhizium anisopliae* (METSCH) SOROKIN no controle da cigarinhada folha *Marhanarva posticata* (STAL) no Nordeste do Brasil. Recife, **CODECAP. Boletim Técnico**, 85p., 1974.
- HUSSEY, N.W.; TINSLEY, T.W. Impression of insect pathology in the People's Republic of China, p.785-795. In: H.D. Burgues (Ed). **Microbiol control of pests and plant diseases**. London, Academic Pres, p. 861, 1981.

- JONES, A.S. & HUDGES, C.S. Persistence of mirex and its effects on soil microorganisms. *J. agric. Food Chem.* v.22, p.435-439, 1974.
- KOBER, E.A.M.; JUREMA, L.F.; GESSINGER, G.; GASPARI, A.J.; RODRIGUES, I.C. Experimento de campo com iscas tóxicas formicidas tendo por objetivo o controle de *Atta sexdens* variedade *piriventris*, SANTSCHI, 1919 (saúva). **Divulgação Agronômica**, 28:1-20, 1970.
- LATCH, G.C.M. *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin strains in New Zealand and their use for controlling pasture-inhabiting insects. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, v.8, p. 384-386, 1965.
- LIMA, A.F.; VIEGAS, E.C.; RACCA F^o.F. *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) SOROK no controle de *Atta sexdens rubropilosa* FOREL, 1908 (Hymenoptera, Formicidae). X CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA. **Resumo**: p.196, 1988.
- LISBOA, A. Combate às formigas. **Min. Agri., Serv. Inf. Agric.**, p.71, 1948.
- LOECK, A.E. ; MARTINS, J.F.S. ; BOTTON, M. ; GUSMÃO, L.G. ; CARBONARI, J.J. ; CANEVER, M.D. ; MOREIRA, M.R. ; ROSENTHAL, M. ; D', A. Método de Avaliação de Inseticidas Para O Controle da Lagarta-Da-Folha Na Cultura do Arroz Irrigado. In: XX REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, **Anais** : CAMBORIU. p.222-223, 1993.
- LOECK, A.E. . Tecnologia de aplicacón de agroquímicos para la proteción de plantas. . In: Peske, S.T.; Trigo, L.; Trigo, M.F.. (Org). Produción de soya.. Santa Cruz, Bolivia, p.221-266, 2002.
- LOPEZ, L.L.V.; CARBONELL, T. Characterization of spanish strains of *Verticillium lecani*. **Revista Ibero Americana**, v. 16, n. 3, p.136-142, 1999.
- LOUREIRO, E de S.; MONTEIRO, A.C. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Paecilomyces farinosus*, patogênicos para operárias de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae), **Arq. Inst. Biol.** São Paulo, v. 71, n.1, p.35-40 Jan/março 2004.
- MANZINI, A.C.; ALVES, S.B.; LOPES, R.B.; ALVES, L.F.A. Seleção de isolados e estratégia de aplicação de fungos entomopatogênicos para o controle de *Blattella germanica*. In: SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP, 6, 1998, Piracicaba. **Resumos**: Piracicaba-SP, p.503, 1998.
- MARICONI, F.A.M. & PAIVA CASTRO, U. Combate à saúva com iscas. São Paulo **Agrícola** V.4: p.26-28, 1962.
- MARICONI, F.A.M. As saúvas. São Paulo, **Agronômica Ceres**. 167, 1970.

- MARTIGNONI, M.E. Mass production of insects pathogens. In P. De Bach (Ed). **Biological Control Of Insects and weeds**. New York, Reinhold Pub.Co., p.884, 1968.
- MOINO JUNIOR, A. **Utilização de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok e *Beauveria bassiana* (Balls.) Vuill. para o controle de pragas de grãos armazenados**. Piracicaba, Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiros”, Universidade de São Paulo, p.100, 1993.
- NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. **Microbial Processes: Promising Tachnologies for Developing Countries**. Washington, D.C. 198, 1979.
- ODUM, E.P. **Fundamental of ecology**. Philadelphia, W.B. **Saunders Company**. 574p, 1971.
- PARIS, S.; SEEGRETAİN, G. Étude de l’activité lipasique esterasiqne intracellulaire de *Beauveria tenella*. **Annales:** de Micologie, v.129, p. 71-77, 1978.
- PASSOS JÚNIRO, N.C.; ALVES, S.B.; NETO, S. Patogenicidade de *Steinemema carpocapsae*, formulação Exhibit, sobre diferentes castas de saúva limão, *Atta sexdens rubropilosa*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 15, MG. **Resumo**. Caxambu: SEB, p.342, 1975.
- PEREIRA, R.M.; ALVES, S.B.; STIMAC, J.L. Growth of *Beauveria bassiana* in fire ant nest soil with amendements. **J. Invertebrate Pathol.**, Orlando, v.62, n.1, p.9-14, 1993b.
- PEREIRA, R.M., STIMAC, J.L.; ALVES S.B. Soil antagonism affecting the dose-response of the red imported fire ant *Solenopsis invicta*, to *Beauveria bassiana* conidia. **J. Invertebr. Pathol**, v. 61, p.156-161, 1993b.
- PUPPO, N.I.H **Pastagens e Forrageiras**. Instituto Campineiro de Ensino Agrícola. Campinas, SP. p.311, 1977.
- QUATTLEBAUM, E.C. **Evolution of fungal in and nematode pathogens to control the red imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren**. Ph. Dissertation, Clemson University, Clemson, 1980.
- ROBERTS, D.W.; CAMPBELL, A.S. Stability of entomopathogenic fungi. Misc. Publ. **Entomol. Soc. Am.** v.10, p.19-76, 1977.
- ROBERTS, D.W. Toxins of entomophthogenic fungi, p. 441-464. In: H. D. BURGUES (Ed). **Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980**. London, Academic Press, p. 949, 1981.

- ROBINSON, R.K. Studies on penetration of insect in tegument byn fungi. **Pest Art.new Summ.**, v.12, p.131-142, 1966.
- SAMSON, R.A.; EVANS, H.C.; LATGÉ, J.P. **Atlas of entomopathogenic fungi.** Springer-Verlang, Netherlands , p.187, 1988.
- SCHILLINDWEIN, M.N. **Resposta polimórficas de formigas cortadeiras de *atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908) (Hymenoptera: Formicidae) aos vegetais explorados em experimentos de campo.** Tese de Mestrado, USP, SP. P.124, 1991.
- SILVA, M.E.; DIEHL-FLEIG, E. Avaliação de diferentes linhagens de fungos entomopatogênicos para controle da formiga *Atta sexdens piriventris* (Santschi, 1919) (Hymenoptera: formicidae). **Anais: Soc. Entomol. Bras.**, Londrina, v.17, n.2, 1988.
- SOUSA GOMEZ, D.R.; ALVES, S.B. Caracterizacion de once aislemientode *Metarhizium anisopliae* (METSCH) SOROK I. Estandarizacion, virulência y actividad enzimática. **Rev. Invest** v.1 n.(3): p.83-101, 1983.
- STIMAC, J.L.; PEREIRA, R.M.; ALVES, S.B.; WOOD, L. Mortality in laboratory colonies of *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae) treated with *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes). **J. Economic Entomol**, Leanham, v.86, n.4, p.1083-7, 1993.
- TAMAI, M.A. **Avaliação de fungos entomopatogenicos para o controle de *Tetranychus urticae* Koch.** Piracicaba. Dissertação de (Mestrado)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiros”, Universidade de São Paulo, p. 86, 1997.
- TANZINI, M.R.; ALVES, S.B. Selection of entomopathogenic fungi in the control of *Leptopharsa heveae*. In: International Congress of Entomology, 21, 2002, Foz do Iguaçu. **Abstracts: of International Congress of Entomology.** Londrina : EMBRAPA Soja, v. 1. p. 543-543, 2002.
- TOWNSEND, C.H.T Aformiga saúva. Instruções práticas para a sua extinção Secr. Agric., Com. Est. S. Paulo, p17, 1921.
- TULLOCH, N. The genus *Metarhizium*. Transaction of british **Mycological Society**, Cambridige, v. 66, p. 407-411, 1976.
- VANETTI, F. & ALBUQUERQUE, G.M.P. Novos resultados experimentais sobre o controle da formiga saúva *Atta sexdens rubropilosa* FOREL, 1908. **Divulgação Agrônômica**, v.10, p.9-23, 1963.
- VEIGA, A.F.S.L. O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (METSCH) SOROK. como opção para o controle biológico das cigarrinhas-das-pastagens

- (Homoptera:Cercopidae), no Estado de Pernambuco. **Boletim do Grupo de Pesquisadores do Controle Biológico**, Brasília, v.(1): p.3-4, 1979.
- VIEIRA, S.A.; ALVES, S.B.; STIMAC, T.L.; ESTAVAM, R.C. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* para o controle de *Periplaneta americana* (L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 14, ENCONTRO NACIONAL DE FITOSSANITARISMO, **Anais**: Piracicaba: FEALQ, p.347, 1993.
- VIEIRA, G.F.; BUENO, V.H.P.; AUAD, A.M. Resposta Funcional de *Scymnus* (Pullus) *Argentinicus* (Weise)(Coleopteracoccinellidae) A Diferentes Densidades do Pulgao Verde *Schizaphis Graminum* (Rond.)(Homoptera: Aphididae). **Anais**: DA SOCIEDADE ENTOMOLOGICA DO BRASIL, v. 26, n. 3, p. 495-502, 1997.
- WALLER, D.A. & MOSER, J.C. Invertebrat enemies and nest associates of leaf-cutting ant *Atta texana* (Buckley) (Formicidae, Attini) In: **VANDER MEER, R.K.; JAFFÉ, K. & CEDEÑO, A.** (eds). *Appliedmyrmecology: a worldperspective*. Boulder, Westview Press. p.255-273, 1990.
- WEBER, N.A. The biology of the fungus growing ants. Part 8. The Trinidad, British West Indies Species. *Revista de Entomologia*, v.16, p.1-8, 1945.
- WEBER, N.A. Gardening ants: the Attines. **Memoirs of the American Philosophical Society**, v. 92, p.146, 1972.
- DELLA LUCIA, T.M.C., CAMERON, R.S., VILELA, E. F., BENTO, J.M.S. Aceitação de iscas granuladas com SULFLURAMIDA, UM NOVO PRINCÍPIO ATIVO, POR FORMIGAS CORTADEIRAS NO CAMPO. *REVISTA ÁRVORE*. v.16, n.2, p.218 - 223, 1992.
- FARGUES, J., ET P. H. ROBERT. Persistance des conidiospores des hyphomycètes entomogènes *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sor., *Nomuraea rileyi* (F.) Samson et *Paecilomyces fumoso-roseus* Wise dans le sol, en conditions contrôlées. *Agronomie* v.5, p.73-80 1985.
- KODAIANE, Y. Biochemical studies on the muscardine fungi in the silkworms, *Bombyx mori*. J. Fac. Textile Sericult. Shinshu Univ., Ser.E, v.29, p.1-68, 1961a.
- KODAIANE, Y. Studie on the new toxic substances to insects, destruxim A and B, produced by *Oospora destructor*. Part 1. isolation and purification of destruxin A and B. *Agr. Biol.Chem*, v. 26, p. 36-42, 1962.
- METSCHNIKOFF, E. Maladies des hannetons duble. *Zapiski Imperatorskogo obshchestva sel's kago khozyaistra yuznoi rossi*, p. 15-50, 1979.

- PRASERTPHON, S. & TANADA, Y. The formation and circulation, in galleri, of hyphal bodies of entomopathorous fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.11, p.260-280, 1968.
- SAMUELS, R.I; CHARNLEY, A.K. & REYNOLDS, S.E. The role of destruxins in the pathogenicity of three strains of *Metarhizium anisopliae* for the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Mycopathologia* v. 104, p. 51-58, 1988a.
- SAMUELS, R.I; CHARNLEY, A.K. & REYNOLDS, S.E. application of reversedphase HPLC in separation and detection of the cyclodepsipeptide toxins produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Chromatographic Science*. .v. 26, p. 15-19, 1988b.
- STIMAC, J.L.; ALVES, S.B. & CAMARGO M.T.V. Controle de *Sollenopsis* spp. (Hymenoptera: Formicidae) com *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Em condições de laboratório e campo. *Na. Soc. Entomol. Bras.*, v.18, p.95-103, 1989.
- ZACHARUK, R.Y. Finestructure of the fungus *Metarhizium anisopliae* infecting three species of larval Elateridae (Coleoptera). II. Conidial germ tubes and appressoria. *Journal of Invertebrate Patology*, v.15, p.81-91, 1970a.