



ALISSON WILIANIS TEIXEIRA SILVA

**EFEITO DE DIFERENTES CEPAS DE *Bacillus thuringiensis*
EM
LARVAS E ADULTOS DA FORMIGAS-CORTADEIRAS *Atta
sexdens* (Hymenoptera: Formicidae)**

Lavras – MG

2022

ALISSON WILIANIS TEIXEIRA SILVA

**EFEITO DE DIFERENTES CEPAS DE *Bacillus thuringiensis* EM
LARVAS E ADULTOS DA FORMIGAS-CORTADEIRAS *Atta sexdens* (Hymenoptera:
Formicidae)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva
Orientador

Dra. Nathaly Lara Castellanos
Co-orientadora

Dr. Wesley Pires Flausino Máximo
Co-orientador

**LAVRAS-MG
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Silva, Alisson Wilians Teixeira.

Efeito de diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis* em larvas e adultos das formigas-cortadeiras *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) / Alisson Wilians Teixeira Silva. - 2022.

77 p.

Orientador(a): Luciano Vilela Paiva.

Coorientador(a): Nathaly Lara Castellanos, Wesley Pires Flausino Máximo.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Controle biológico. 2. Entomopatógenos. 3. Formigas-cortadeiras. I. Paiva, Luciano Vilela. II. Castellanos, Nathaly Lara. III. Máximo, Wesley Pires Flausino. IV. Título.

ALISSON WILIANS TEIXEIRA SILVA

**EFEITO DE DIFERENTES CEPAS DE *Bacillus thuringiensis* EM
LARVAS E ADULTOS DA FORMIGAS-CORTADEIRAS *Atta sexdens* (Hymenoptera:
Formicidae)**

**EFFECT OF DIFFERENT STRAINS OF *Bacillus thuringiensis* ON
LARVAE AND ADULTS OF LEAF-CUTTING ANTS *Atta sexdens* (Hymenoptera:
Formicidae)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADO em 28 de janeiro de 2022
Dr. Fernando Hercos Valicente – EMBRAPA
Dr. Ubiraci Gomes De Paula Lana – EMBRAPA
Dr. Ronald Zanetti Bonetti Filho – UFLA

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva
Orientador

Dra. Nathaly Lara Castellanos
Co-orientadora
Dr. Wesley Pires Flausino Máximo
Co-orientador

**LAVRAS-MG
2022**

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,
Aos meus irmãos,
À minha avó Sônia,
Ao meu avô Alcindo (*in memoriam*),
Aos grandes amigos que a vida me contemplou,
Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, em especial minha mãe que nunca mediu esforços para que eu e meus irmãos tivéssemos o privilégio de estudar.

Agradeço a Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal por me capacitar para o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço à empresa Klabin pelo financiamento deste projeto e a agência Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES – pela concessão da bolsa de mestrado.

Agradeço ao meu orientador Professor Dr. Luciano Vilela Paiva pela paciência e dedicação em compartilhar seus conhecimentos.

Agradeço aos meus co-orientadores Nathaly L. Castellanos e Wesley P. F. Máximo, por se dedicarem imensamente para a realização desse trabalho e por todo o conhecimento compartilhado.

Agradeço a todos os colegas do Laboratório Central de Biologia Molecular – UFLA – pelas ajudas durante a execução das atividades de pesquisa e pelos momentos de descontração, tornando o ambiente de trabalho mais leve e divertido.

Agradeço ao professor Ronald, a Léia e a toda equipe do Laboratório de Manejo Integrado de Pragas Florestais pelo auxílio durante a execução dos experimentos.

Agradeço aos amigos que a UFLA me proporcionou Fernanda, Amanda, Viviana, Cleiton, Sérgio e Vinícius.

Agradeço ao Pedro, amigo que trago há muitos anos e que tornou a vivência em Lavras mais alegre e feliz.

Agradeço aos amigos e colegas de apartamento Mateus e Miguel pelo companheirismo, pelos momentos de risadas e por serem “cobaias” de meus experimentos culinários.

Não poderia passar por aqui sem agradecer as pessoas mais importantes e incentivadoras de minha jornada acadêmica Sâmera, Ana Paula, Juliano, Aurinete, Claudinéia, Bárbara, Rafaeli, Dalilha, Bruna, Tesfahun, Andressa e Geraldo. Essas pessoas me fizeram apaixonar por esse incrível universo da ciência vegetal. Agradeço a toda a equipe do Laboratório de Biotecnologia Vegetal e Biologia Molecular da EPAMIG de Caldas

Impossível não agradecer aos grandes amigos da minha vida, em especial aos que sempre me incentivaram a estudar Samantha, Sâmera, Eduardo, Daniel, Daniela, Bianca e Thais. Aos demais, sempre estarão presentes em minha memória.

Agradeço aos grandes professores que passaram por minha vida, em especial aqueles que sempre me incentivaram a alçar voos mais altos e que me mostraram que o ato de ensinar também é um ato de afeto, amor e de esperança.

Agradeço ao meu país Brasil e a cidade de Lavras por me acolher durante esses anos.

Agradeço a todos os cientistas que lutam diariamente para o desenvolvimento social, em consideração àqueles que lutam com garra para o enfrentamento desses tempos sombrios que nos rodeiam. Em especial, aos cientistas que perderam sua vida durante o combate à pandemia do SARS-CoV-2. A estes, dias melhores virão!

Agradeço todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

A todos vocês meu muitíssimo obrigado!

EPÍGRAFE

E o passado é uma roupa que não nos serve mais...

(Belchior)

RESUMO

As formigas cortadeiras *Atta sexdens* são as principais pragas que acometem o setor florestal em países neotropicais e podem causar grandes prejuízos em todas as fases das plantas em campo. O manejo das formigas cortadeiras é predominantemente realizado com a aplicação de inseticidas à base de produtos químicos. Entretanto, além da toxicidade ao meio ambiente e aos seres humanos esses agrotóxicos não possuem seletividade quanto a seus alvos, o que pode diminuir a população de polinizadores, predadores e inimigos naturais. Além do mais, os princípios ativos desses inseticidas tendem a ser banidos do mercado nos próximos anos, o que causará uma demanda por produtos eficientes para o controle efetivo desses insetos. Nesse sentido, alternativas mais sustentáveis para o controle dessas pragas florestais têm sido o foco de diversos centros de pesquisa. O uso da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (Bt) no controle de pragas agrícolas tem sido empregado a muitas décadas e possui como vantagens uma maior especificidade aos alvos e por ser atóxico a mamíferos e ao meio ambiente. Em condições adversas de crescimento *B. thuringiensis* produz esporos associados a proteínas cristais as quais possuem atividades inseticidas. As toxinas produzidas pela bactéria Bt são utilizadas com sucesso no controle de larvas de insetos das ordens Lepidoptera e Coleoptera, ao contrário de Hymenoptera como as formigas cortadeiras. Assim sendo, o presente trabalho traz uma abordagem inédita a respeito das diferenças na suscetibilidade encontradas entre larvas e adultas forrageadoras de *A. sexdens* às oito cepas de *B. thuringiensis* (T06 - *entomocidus*, T07 - *aizawai*, T10 - *darmstadiensis*, T16 - *indiana*, T23 - *japonensis*, T24 - *neoleonensis*, T27 - *mexicanensis* e T29 - *amargiensis*). Ficou evidente a eficiência das cepas T24, T06 e T16 no controle das larvas, com mortalidade de 79,6%, 73,7% e 67,6%, respectivamente. T24 foi considerada a melhor cepa para o controle das larvas de *A. sexdens* devido à porcentagem de mortalidade, ao tempo letal médio ($5,000 \pm 0,339$ dias) e à concentração letal média ($7,48 \times 10^5$ esporos mL⁻¹). Foi verificado, também, que as cepas de Bt não induziram mortalidade significativa nas formigas forrageadoras adultas. Além do mais, o presente trabalho evidencia o principal fator que torna as formigas forrageadoras adultas menos suscetíveis aos esporos de Bt em comparação às larvas. A câmara infrabucal presente na cabeça das formigas forrageadoras adultas retém a maior parte dos esporos antes de chegarem ao intestino que é o sítio de ação das toxinas Bt. As cepas de Bt podem ser empregadas no controle biológico de larvas, no entanto, evidencia-se a necessidade de um mecanismo de entrega das toxinas para as larvas dentro das colônias no campo. Alternativamente, a solubilização e a ativação das toxinas Bt podem viabilizar a utilização dessas cepas no manejo integrado tanto de *A. sexdens* no setor florestal.

Palavras-chave: Bactéria Entomopatogênica; Larvas; Forrageadoras; Protoxinas.

ABSTRACT

The leafcutter ants *Atta sexdens* are the most important forest pests in tropical countries and can cause major economic damage mainly during seedling establishment. The management of this forest pests is done predominantly with baits and chemical-based insecticides. However, beyond the toxicity against the environmental and human health these pesticides are not target-specific and can cause death of pollinators, predators and natural enemies. Furthermore, the active principle of this pesticides may also be banned from the market in the coming years, which will cause a demand for efficient products for the successful control of these insects. In this way, sustainable alternatives for the management of forest pests has been the focus of several research centers. The entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt) has been used for many decades in agricultural pests' control and has the advantage to be target specific, safe for mammals and environmentally friendly. In adverse growing conditions, *B. thuringiensis* produces spores associated with Crystal proteins which have insecticide activity. The toxins produced by Bt bacteria are used successfully in Lepidoptera and Coleopteran larvae insects, these youngest insects cause the largest damage to agricultural crops. However, contrary to this fact, *A. sexdens* larvae has not mobility and forager adults are the main concern and the focus for the control. Therefore, the present work brings an unprecedented approach, identify differences in susceptibility to the eight strains of *B. thuringiensis* (T06 - *entomocidus*, T07 - *aizawai*, T10 - *darmstadienis*, T16 - *indiana*, T23 - *japonensis*, T24 - *neoleonensis*, T27 - *mexicanensis* e T29 - *amargiensis*) between larvae and foragers of *A. sexdens*. The efficiency of strains T24, T06 and T16 in controlling larvae was evident, with mortality of 79.6%, 73.7% and 67.6%, respectively. T24 was considered the best strain to control *A. sexdens* larvae due to mortality percentage, mean lethal time (5.000 ± 0.339 days) and mean lethal concentration (7.48×10^5 spores mL⁻¹). It was also evident that Bt strains did not induce significant mortality in adult forager ants. Furthermore, the present work highlights the main factor that makes adult forager ants less susceptible to Bt spores compared to larvae. The infrabuccal pocket (present in adult forager ant's head) filters out most of Bt spores before reaching the midgut, the main target of Bt toxins. Bt strains can be used in the biological control of larvae, however, a delivery method for the toxin is required in the field to reach the larvae inside the nest. Alternatively, the solubilization and activation of Bt toxins may enable the use of these strains in the integrated management for both adult foragers and larvae of *A. sexdens*.

Keywords: Entomopathogenic Bacterias; Larvae; Foragers; Protoxin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Morfologia externa da formiga <i>Atta sexdens</i> (Hymenoptera: Formicidae).	17
Figura 2 - Distribuição geográfica da espécie <i>Atta sexdens</i> (Hymenoptera: Formicidae).	18
Figura 3 - Arquitetura externa de ninhos de <i>Atta sexdens</i> (Hymenoptera: Formicidae).	19
Figura 4 - Arquitetura interna dos ninhos de <i>Atta sexdens</i> (Hymenoptera: Formicidae).	20
Figura 5 - Polimorfismo de tamanho das operárias <i>Atta sexdens</i> (Hymenoptera: Formicidae).	21
Figura 6 - Ilustração do ciclo metamórfico de holometábolos.	23
Figura 7 - Ovos de <i>Atta sexdens</i> (Hymenoptera: Formicidae) agrupados.	24
Figura 8 - Ovo e larvas de <i>Atta sexdens</i> (Hymenoptera: Formicidae).	24
Figura 9 - Início do estágio de pré-pupa da <i>Atta sexdens</i> (Hymenoptera: Formicidae).	25
Figura 10 - Desenvolvimento das pupas da <i>Atta sexdens</i> (Hymenoptera: Formicidae).	26
Figura 11 - Sistema digestivo de larvas da <i>Atta sexdens</i> (Hymenoptera: Formicidae).	28
Figura 12 - Morfologia interna do sistema digestivo de formigas.	30
Figura 13 - Sistema digestivo de <i>Atta sexdens</i> (Hymenoptera: Formicidae) adultas.	30
Figura 14 - Mecanismo de nomenclatura das protoxinas Bt	34
Figura 15 - Estrutura típica das proteínas Cry	36
Figura 16 - Ilustração do mecanismo de ação geral das proteínas Cry	37
Figura 17 - Exemplo de larvas mortas encontradas no lixo da minicolônia	75

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Mortalidade das larvas de <i>Atta sexdens</i> (Hymenoptera: Formicidae) alimentadas com diferentes dietas contendo suspensão das respectivas cepas de Bt e o controle negativo contendo H ₂ O.....	47
Gráfico 2 - Sobrevivência e tempo letal médio das três melhores cepas	48
Gráfico 3 - Análise do aspecto físico dos insetos juvenis recuperados das minicolônias após o bioensaio de mortalidade	51
Gráfico 4 - Mortalidade das larvas de <i>A. sexdens</i> expostas à diferentes concentrações de esporos das cepas T06, T16 e T24.....	55
Gráfico 5 - Mortalidade das forrageadoras submetidas à ingestão de dieta líquida contendo os esporos de Bt.....	57
Gráfico 6 - Consumo diário de dieta líquida contendo os esporos de Bt e o controle negativo contendo H ₂ O.....	57
Gráfico 7 - Decantação dos esporos de Bt na dieta líquida em função do tempo	58
Gráfico 8 - Mortalidade das forrageadoras submetidas à ingestão de dieta semissólida contendo os esporos de Bt.....	59
Gráfico 9 - Acúmulo de esporos provenientes de dieta líquida e semissólida no aparato digestivo de forrageiras	61

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	Formigas cortadeiras.....	16
2.1.1	Distribuição geográfica	17
2.1.2	Bioecologia das formigas cortadeiras <i>Atta sexdens</i>	19
2.1.3	Organização social e castas	20
2.1.3.1	Castas reprodutivas e fundação da colônia	22
2.1.3.2	Estágios de desenvolvimento.....	22
2.1.3.2.1	Ovos.....	23
2.1.3.2.2	Larvas	24
2.1.3.2.3	Pré-pupas e pupas.....	25
2.1.3.2.4	Adultos	26
2.1.3.3	Cuidados com a prole	26
2.1.3.4	Hábito alimentar e sistema digestivo	27
2.1.3.4.1	Larvas	27
2.1.3.4.2	Adultos	28
2.1.4	Controle formigas cortadeiras.....	31
2.2	<i>Bacillus thuringiensis</i>	32
2.2.1	Genes Cry	33
2.2.2	Protoxinas	34
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1	Local experimental e material biológico.....	39
4.2	Suspensão bacteriana e diluição seriada	39
4.3	Contagem dos esporos	40
4.4	Bioensaio de sobrevivência das larvas	40
4.5	Análise do aspecto físico dos insetos juvenis submetidos ao bioensaio de mortalidade	41
4.6	Bioensaio de concentração letal média (CL ₅₀) em larvas	42
4.7	Bioensaio de sobrevivência de formigas adultas	43
4.7.1	Bioensaio de sobrevivência com dieta líquida	43

4.7.2	Bioensaio de sobrevivência com dieta semissólida.....	44
4.8	Decantação dos esporos de Bt na dieta líquida.	44
4.9	Acúmulo de esporos no sistema digestório de forrageadoras.....	45
4.9.1	Bioensaio com dieta líquida	45
4.9.2	Bioensaio com dieta semissólida	45
4.10	Dissecação do aparato digestório das formigas adultas e das larvas	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1	Efeito das cepas de Bt na sobrevivência das larvas	46
5.2	Aspectos físicos dos insetos juvenis recuperados da minicolônia ao fim do bioensaio de sobrevivência	49
5.3	Efeito de diferentes concentrações de esporos na sobrevivência das larvas ..	54
5.4	Efeito da dieta líquida com esporos de Bt em forrageadoras	56
5.5	Efeito da dieta semissólida com esporos de Bt em forrageadoras.....	59
5.6	Acúmulo dos esporos de Bt nos órgãos das forrageiras	60
6	CONCLUSÃO.....	62
	REFERÊNCIAS.....	64
	APÊNDICE	75

1 INTRODUÇÃO

As formigas cortadeiras do gênero *Atta* e *Acromyrmex* representam grande importância econômica uma vez que causam impacto significativo no setor agroflorestal. Com o hábito de forrageamento das formigas, isto é, o corte sistemático das folhas, diminui-se expressivamente a área fotossintética da maioria das plantas cultivadas e, por consequência, a produtividade dessas culturas (CRUZ et al., 2000; MARSARO JÚNIOR et al., 2007; MATRANGOLO et al., 2010; SOUZA-SOUTO et al., 2007).

As formigas cortadeiras são ampla e geograficamente difundidas na América do Sul, principalmente no Brasil. Este fato agrava as preocupações quanto seus impactos nos países de ocorrência. Outro fator importante é que elas apresentam o hábito de forrageamento durante todo o ano, tornando seu controle mais oneroso e difícil, caracterizando-se, assim, como a principal praga do setor florestal (DELLA LUCIA et al., 2011; MARICONI, 1970; MARSARO JÚNIOR et al., 2007).

As formigas provocam perdas diretas, causando morte e redução no crescimento vegetativo das árvores, e também perdas indiretas caracterizadas pelo aumento da suscetibilidade das árvores a outras pragas e patógenos. Em *Pinus*, as formigas cortadeiras podem provocar perdas de 12% no crescimento em altura e 17,4% em diâmetro, além disso, podem ocasionar mortalidade de 11,7% (LEWIS; NORTON, 1973; MARSARO JÚNIOR et al., 2007; MATRANGOLO et al., 2010; RIBEIRO; WOESSNER, 1980; SILVA, 2008). Estima-se que o *Eucalyptus grandis* pode perder até 13% do volume de madeira caso ocorra o desfolhamento total durante os seis primeiros meses após o plantio. O comprometimento do volume de madeira acentua-se, também, quando há um aumento da área total de ninhos de *Atta* no sítio de plantio. A desfolhação completa reduz significativamente o crescimento do *E. grandis*, entretanto, se as desfolhações ocorrerem de forma consecutivas o resultado será a morte das árvores (ZANETTI, 2014; ZANUNCIO et al., 1996)

De modo geral, o controle efetivo desses insetos-praga é realizado, em sua maioria, com a aplicação de inseticidas químicos. Além de serem potenciais causadores de danos à saúde humana e outros mamíferos, aos recursos hídricos e à biota dos solos, os produtos químicos não são seletivos, podendo afetar a população de polinizadores e inimigos naturais (TIRADO MONTIEL et al., 2001).

Nesse sentido, a busca por tecnologias mais sustentáveis para controlar efetivamente a população dessas pragas agrícolas tem se tornado o foco de diversos centros de pesquisas

públicos e privados. O controle biológico é uma alternativa eficaz para o manejo integrado de pragas e vem sendo utilizado no Brasil desde a década de 60 pelo Instituto Biológico (LANDERS; OLIVEIRA, 2018). Dentre os agentes apropriados para o manejo biológico, a utilização de entomopatógenos, como a bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt), é um dos meios mais eficazes para o controle alvo-específico de insetos. Bt é utilizado, principalmente para controle de insetos fitófagos como os da ordem Lepidoptera, minadores como os Coleopteras e, potencialmente, formigas do gênero *Atta*, pertencentes à ordem Hymenoptera (PALMA et al., 2014).

A tecnologia Bt utiliza toxinas produzidas pela bactéria *B. thuringiensis* em produtos formulados como os biopesticidas, os quais possuem em sua formulação esporos e proteínas cristais. Outra tecnologia a qual as proteínas Cry são empregadas é na engenharia genética com finalidade de produzir plantas geneticamente modificadas expressando genes inseticidas por recombinações heterólogas (CAPALBO; ARANTES; SUZUKI, 2005; MACHADO 2020). Essas protoxinas são altamente específicas para seus alvos e quando entram em contato com o intestino médio desses insetos as toxinas causam perfurações nas membranas, resultando na lise celular e no extravasamento de seu conteúdo, levando o inseto à morte (PALMA, et al., 2014).

O controle biológico das populações de formigas cortadeiras da espécie *A. sexdens* através de cepas da bactéria *B. thuringiensis*, pode ser uma forma mais prática, eficaz e sustentável para lidar com as perdas de produtividade das lavouras, evitando a morte das mudas, principalmente durante o estabelecimento do plantio. No entanto, as cepas Bt são expressivamente utilizadas em insetos juvenis ainda em estágio larval. De modo geral, as larvas se diferenciam dos adultos não apenas morfológicamente, mas também fisiologicamente, assim, a eficiência no controle de larvas e adultos da mesma espécie pode ser distinta. Em contrapartida aos insetos das ordens Lepidoptera e Coleoptera, cujas larvas são os principais causadores de danos econômicos, no caso das formigas são as adultas, com o hábito de forrageamento, que são as principais preocupações do setor florestal.

Os estágios imaturos dos insetos são mais sensíveis às toxinas Bt, dessa forma, a testagem da suscetibilidade de larvas de *A. sexdens* a diferentes cepas de Bt, a avaliação da concentração letal média e o tempo letal médio das melhores cepas poderá auxiliar nas tomadas de decisões para o controle das formigas cortadeiras. Entretanto, para o controle ser mais eficiente em campo, as formigas adultas também precisam ser atingidas. Eventuais diferenças morfológicas e fisiológicas entre as formas adultas e juvenis podem estar relacionado com a

diferença na maior suscetibilidade observada nos insetos imaturos (HALL; DUNN, 1958; NOWATZKI et al., 2006).

A compreensão dessas diferenças entre formigas forrageadoras adultas e larvas, quanto à toxicidade das endotoxinas, é fundamental para traçar diferentes estratégias para o controle biológico dessa praga. No entanto, há carência de informações básicas na literatura científica que possibilitam solucionar os problemas causados pelo hábito de forrageamento das formigas adultas e facilite na tomada de decisões para o controle efetivo dessas pragas. O levantamento de informações pode viabilizar o uso de *B. thuringiensis* como um agente no controle de formigas cortadeiras da espécie *A. sexdens*.

De acordo com o exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis* em larvas e adultos da formiga-cortadeira *Atta sexdens*. Buscou-se verificar, dentre as oito cepas de Bt testadas (subespécies: *entomocidus*, *aizawai*, *darmstadiensis*, *indiana*, *japonensis*, *neoleonensis*, *mexicanensis*, *amargiensis*), qual seria a mais eficaz no controle da espécie *A. sexdens*, o seu tempo letal médio e sua concentração letal média. Além disso, objetivou-se caracterizar se a presença da cavidade infrabucal poderia estar influenciando na suscetibilidade das formigas forrageadoras adultas quanto à toxicidade de Bt em comparação às larvas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Formigas cortadeiras

Formigas são um dos maiores exemplos de sucesso evolutivo observado nos insetos eussociais. (BOURKE, 2008; WARD, 2014). A eussocialidade é quando duas ou mais gerações se sobrepõem na sociedade, os adultos cuidam dos estágios juvenis e quando ocorre a divisão de castas reprodutivas e não reprodutiva entre os adultos (WILSON, 1971). As formigas se caracterizam pela fusão do primeiro segmento abdominal ao tórax, através do pecíolo¹. Apresentam uma robusta constrição entre o primeiro e o segundo segmento abdominal (FIGURA 1). Esta classe de insetos pertence à ordem dos Hymenopteras.

Existem, atualmente, mais de 13900 espécies de formigas catalogadas (ANTCAT, 2021), mas acredita-se que o número pode ser bem superior. As formigas são consideradas um

¹ Em zoologia refere-se ao primeiro ou, em alguns casos, o primeiro e o segundo segmento metassomal.

dos primeiros organismos a desenvolver o hábito de cultivar seu próprio alimento. Especula-se que cerca de 50 milhões de anos antes do surgimento da espécie humana, formigas da subfamília Myrmicinae já cultivavam fungos destinados a suprir suas necessidades nutricionais. Dentro dessas subfamílias, a tribo Attini são dependentes obrigatórias dos fungos que cultivam, com o destaque para o cultivo de *Leucogaricus gongylophorus* (MULLER; REHNER; SCHULTZ, 1998; SCHNEIDER, 2003).

Figura 1 - Morfologia externa da formiga *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae).



Fonte: April Nobile – www.AntWeb.org

Dentre as mais de 200 espécies da tribo Attini conhecidas todas são cultivadoras obrigatórias de fungos. Diferentes espécies de formigas são capazes de domesticar diferentes espécies de fungos, bem como determinar novas espécies. Foi observado que uma única espécie de formigas pode cultivar diferentes fungos e pode haver permutas ocasionais entre fungos de colônias distintas e até mesmo entre espécie de formigas distintas. O forrageamento das formigas advém de o fato dessas espécies cultivarem fungos para suprir a necessidade nutricional da colônia. As formigas cortadeiras utilizam material vegetal, principalmente as folhas, como substrato para o crescimento vegetativo de seu fungo simbiote (MULLER; REHNER; SCHULTZ 1998).

2.1.1 Distribuição geográfica

A distribuição geográfica de formigas agricultoras da tribo Attini compreende o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. O Brasil é um dos países com maior quantidade de

espécies de formigas cortadeiras. Este fato causa uma preocupação relevante, principalmente, devido ao potencial agroflorestal do país. A tribo Attini possui 13 gêneros com 230 espécies descritas. Dentre as diferentes espécies dessa tribo destacam-se os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* – formigas cortadeiras – que utilizam material vegetal fresco como substrato para seu fungo simbiote. Das 15 espécies do gênero *Atta* ocorrentes no Brasil, 5 possuem grande impacto econômico, principalmente a espécie *Atta sexdens* (FIGURA 2). Já, quanto ao gênero *Acromyrmex*, dentre as 26 espécies, 20 ocorrem naturalmente no Brasil e 9 delas causam impacto direto na economia. As formigas do gênero *Atta* são conhecidas popularmente como saúvas, sendo a espécie *A. sexdens* chamadas de saúva-limão, pelo odor cítrico exalado por glândulas presentes em sua cabeça. Já, as formigas do gênero *Acromyrmex* são conhecidas popularmente como quenquéns (BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES, 2001; FORTE; BARRETTO, 1997; DELABIE et al., 1998; BROWN Jr., 2000; SCHNEIDER, 2003; SCHULTZ; BRADY, 2008).

A abundância e diversidade das formigas cortadeiras, tanto do gênero *Atta* quanto *Acromyrmex* é maior no intervalo latitudinal 20° sul e 30° sul, região essa que compreende o estado de Minas Gerais, o principal centro produtor silvícola, compreendendo um grande povoamento de *Eucalyptus* e *Pinus* os quais abastecem tanto o mercado nacional quanto internacional (DELLA-LUCIA et al., 1993; FLOWER; CLAVER, 1991; IBÁ, 2019).

Figura 2 - Distribuição geográfica da espécie *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae).



Legenda: As regiões em verde compreendem a distribuição nativa das formigas *A. sexdens*. As regiões em branco são as localidades onde não há ocorrência da espécie.

Fonte: antmaps.org

2.1.2 Bioecologia das formigas cortadeiras *Atta sexdens*

Após o acasalamento as fêmeas de *A. sexdens*, já em solo, perdem suas asas e procuram um local para dar início à escavação de um novo ninho. De princípio, a escavação feita pela rainha é uma pequena galeria com profundidade média de 8,5 a 15 cm e ali permanece retida por até 90 dias. A primeira câmara começa a ser construída após esses 90 dias e possui uma profundidade média de 20 cm. Ao longo dos próximos meses as câmaras tendem a aumentar de tamanho, sendo a presença de olheiros, isto é, orifícios de entrada e saída das formigas, uma evidência do crescimento das câmaras. Após 18 meses é comum a presença de 8 câmaras e ao longo dos três primeiros anos, com um ninho já bem estabelecido, é possível observar a presença de 1000 olheiros. E a partir desse período é possível observar a presença de todas as castas (FORTI et al., 2011; JACOBY, 1937).

Devido à remoção do solo, as formigas tendem a depositá-lo em cima do ninho na parte externa, formando um monte de terras que pode facilitar a identificação da espécie presente no campo, já que a arquitetura característica é peculiar de cada espécie. A figura 3 apresenta um ninho característico de formigas cortadeiras da espécie *A. sexdens*. De modo geral, as formigas de *A. sexdens* têm preferência por instalar seus ninhos em áreas sombreadas e possuem seus orifícios espalhados pelo território de forrageamento (FORTI et al., 2011).

Figura 3 - Arquitetura externa de ninhos de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae).



Fonte: <http://www.unibras.com.br/tecnico-detalle/arquitetura-dos-ninhos-de-formigas-cortadeira/>

A arquitetura interna dos ninhos de *A. sexdens* possui uma complexidade estrutural (FIGURA 4). Os ninhos são constituídos de túneis e câmaras, também chamadas de painelas, as quais possuem diferentes funções e são escavadas pelas operárias. As câmaras são organizadas espaçadamente e se conectam por túneis. Algumas delas são responsáveis por abrigar fungos

contendo ovos e larvas e outras contêm pupas. Em determinadas épocas do ano algumas panelas podem abrigar formigas aladas e outras as operárias e rainhas. Há também uma panela específica para o descarte de materiais indesejáveis, como materiais em decomposição formigas mortas e fungos exauridos, normalmente chamada pelos especialistas de lixo (MARCONI, 1970; FORTI, 2011).

Figura 4 - Arquitetura interna dos ninhos de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae).



Legenda: É possível observar na imagem as diferentes câmaras interligadas por túneis, a complexidade estrutural e o tamanho do ninho.

Fonte: Dr. Luiz Carlos Forti

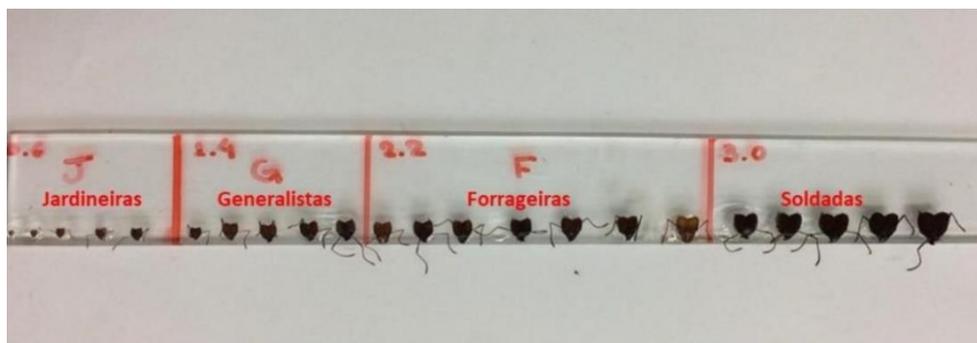
<http://www.unibras.com.br/tecnico-detalle/arquitetura-dos-ninhos-de-formigas-cortadeira/>

2.1.3 Organização social e castas

As castas podem ser definidas como conjuntos de indivíduos de uma espécie que apresentam especialização de tarefas em determinado período temporal, sendo classificadas por faixa etária ou então pelo tamanho (OSTER; WILSON, 1978; WILSON 1980). São divididas em grupos reprodutores (içás e bitus) e não reprodutores (operárias), entretanto algumas das operárias podem realizar a ovoposição de ovos tróficos os quais são utilizados na alimentação.

As operárias são divididas em quatro subcastas polimórficas: as jardineiras, as generalistas, as forrageadoras e as soldadas com menor e maior tamanho da cápsula cefálica, respectivamente, conforme apresenta a figura 5 (BUENO, 2020).

Figura 5 - Polimorfismo de tamanho das operárias *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae).



Fonte: Bueno (2020).

Ao longo do tempo mudanças de atividades realizadas pelas operárias na colônia são observadas, característica conhecida como polietismo. O polietismo advém de fatores físicos relacionados à estatura do indivíduo na sociedade, etários no qual ocorre a diferenciação de atividade exercida ao longo do envelhecimento ou então pode ocorrer a combinação de ambos os fatores (DEIHL-FLEIG, 1994; HINZE; LEUTHOLD, 1999). Acredita-se que os indivíduos mais novos ficam limitados às atividades internas da colônia como o cuidado com a rainha e com os ovos e pupas, enquanto os indivíduos mais velhos exercem as funções externas ao ninho como o forrageamento e a defesa da colônia (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

De modo geral, a subcasta das jardineiras realiza as atividades de cuidados do jardim de fungos, incorporando o material vegetal utilizado como substrato para o crescimento do fungo. Outras atividades exercidas por elas são os cuidados com os ovos e pupas e, também, para com a rainha. Já a subcasta das generalistas possuem um leque de atividades um pouco mais amplo, tendo como função o processamento do material vegetal que será incorporado ao fungo, transporte dos resíduos, auxílio durante a ecdise da ninhada e também nos cuidados com a rainha. Quanto à subcasta das forrageiras, suas funções se resumem ao corte e transporte do material vegetal e na escavação para a ampliação das câmaras onde se localizam os ninhos. A subcasta das soldadas fica responsável pela defesa da colônia, estando prontas para combater qualquer tipo de organismo que venha a comprometer a integridade da colônia (WILSON, 1980; BUENO, 2020).

2.1.3.1 Castas reprodutivas e fundação da colônia

As fêmeas (içás ou tanajuras) e machos (bitus) férteis, que por característica são alados, durante o período da revoada, realizam o voo nupcial. Durante o voo nupcial a fêmea recebe material genético de diferentes machos, o que é denominado por poliandria. Esse material genético advindo dos machos é, então, armazenado em uma estrutura cognominada de espermateca até o momento da fertilização dos ovos (GILLOT, 1980; HUGHES, 2014; ORTIZ, 2007). Esses insetos são haplodiploides, isto é, seu sistema sexual é determinado pela fecundação do óvulo pelos espermatozoides armazenados previamente na espermateca da fêmea, deste modo, dão origem a outras fêmeas diploides, férteis ou não. Por outro lado, na ausência de fecundação, são gerados machos haploides férteis, através da partenogênese arrenótoca, em que a única função é a reprodução (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; IMAI; TAYLOR; CROZIER, 1994).

Após a cópula com diferentes machos a fêmea começa a escavar galerias no solo que darão origem às câmaras do ninho. Ela deposita micélios do fungo, trazidos consigo em sua cavidade infrabucal, para poder dar início ao novo jardim de cultivo. Posteriormente, realiza a fertilização de alguns ovos que darão origem, após cerca de 60 dias, às operárias adultas. Logo em seguida à emersão, essas formigas adultas começam suas atividades de trabalho dentro da colônia. (AUTORI, 1942; DELLA LUCIA et al., 1995; HOLLDOBLER; WILSON, 1990; MACHADO 2020).

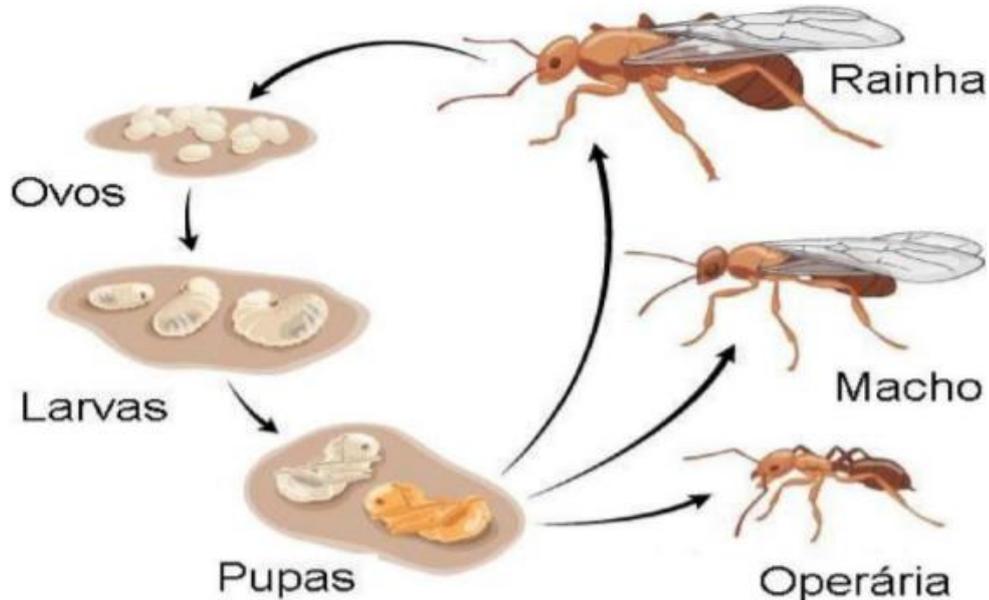
O início de uma nova colônia é considerado um dos momentos mais críticos para o seu estabelecimento e sucesso. Neste período é comum a rainha se alimentar de estáfilos – agrupamento de gongilídeos –, de ovos tróficos, ovos reprodutíveis e até mesmo de larvas e pupas. Entretanto, o mais frequente é a alimentação por ovos tróficos que são produzidos por operárias para a alimentação da rainha (AUGUSTIN; LOPES, 2007). De modo geral, os ovos tróficos se diferenciam dos ovos reprodutivos pelo formato, coloração e a presença ou ausência de retículo coriônico (LACERDA; SIMÕES, 2006; SAKAGAMI, 1982; SAKAGAMI; ZUCCHI, 1993; SOMMEIJER et al., 1984).

2.1.3.2 Estágios de desenvolvimento

As formigas são insetos classificados como holometábolos, ou seja, seu ciclo metamórfico é completo passando de ovo, larva, pré-pupa, pupa e adulta (FIGURA 6). Durante

esse processo metamórfico, a larva perde órgão juvenis, como o intestino, os quais voltam a se formar durante o processo. Ao entrarem na vida adulta, os órgãos maduros já estarão bem formados (HAMMER; MORAN, 2019).

Figura 6 - Ilustração do ciclo metamórfico de holometábolos.



Fonte: www.askabiologist.asu.edu

2.1.3.2.1 Ovos

Os cuidados das operárias com a colônia iniciam-se com os ovos (FIGURA 7) que, por característica, são muito pequenos (cerca de 0,49 mm de comprimento e 0,31 mm de largura). De modo geral, eles ficam localizados na região central do jardim de fungos em grupos que variam de dezenas a centenas de unidades. É comum observar no jardim de fungos as operárias locomovendo grupos de ovos entre as mandíbulas (SCHNEIDER, 2003). De acordo com Autuori (1949) a eclosão dos primeiros ovos ocorre, em média, aos 23 dias após a ovoposição pela rainha, dando origem após alguns dias às larvas.

Figura 7 - Ovos de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) agrupados.

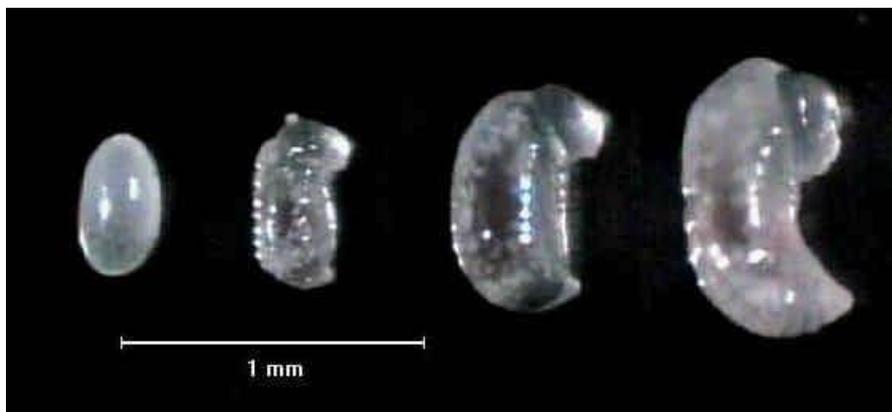


Fonte: Schneider (2003).

2.1.3.2.2 Larvas

As larvas das formigas (FIGURA 8) não possuem olhos e nem pernas (WHEELER; WHEELER, 1979; SCHNEIDER, 2003). A sua coloração é leitosa e levemente translúcida, sendo possível observar o trato digestivo o qual possui uma coloração mais escura em tom de marrom. É possível observar, com o auxílio de uma lupa eletrônica, que há a presença de pelos por todo o corpo da larva, principalmente na proximidade da mandíbula. Esses pelos auxiliam durante a alimentação, mantendo o fungo próximo à cavidade bucal. O aparelho bucal das larvas é a única parte do corpo que possui movimentos livres. As mandíbulas são mais rígidas e possuem estruturas espinhosas que, além dos pelos, também auxiliam a manter o fungo próximo à cavidade bucal (PETRALIA; VINSON, 1979; SCHNEIDER, 2003; WEBER, 1972;).

Figura 8 - Ovo e larvas de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae).



Fonte: Schneider (2003).

Não é possível diferenciar os ínstaras das larvais de *A. sexdens* levando em consideração o seu tamanho. Por ser muito característico o polimorfismo presente no gênero *Atta* qualquer tamanho larval é passível de entrar em metamorfose, o que dificulta essa predição. É possível identificar apenas o primeiro ínstar larval, pois são recém-emergidas e ainda possuem um tamanho muito próximo ao dos ovos, e o último ínstar, já que a larva se torna uma pré-pupa nesta etapa do desenvolvimento (SCHNEIDER, 2003).

2.1.3.2.3 Pré-pupas e pupas

Após o crescimento das larvas, no último ínstar larval, elas irão entrar no início do processo de metamorfose. Nesse momento ocorre a interrupção de sua alimentação e o trato digestivo que outrora era visível tende a desaparecer. Os primeiros indícios de que a larva entrou em processo de pré-pupa (FIGURA 9) é a interrupção da movimentação do aparelho bucal. Durante esta etapa começa a ser visível, primeiramente, as estruturas que darão origem às pernas e posteriormente às antenas. As operárias adultas retiram a cutícula antiga das pupas com a mandíbula e mastigam-nas e habitualmente lambem a cutícula exposta recentemente (SCHNEIDER, 2003).

Figura 9 - Início do estágio de pré-pupa da *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae).



Fonte: Schneider (2003).

As pupas de *Atta* são cada vez mais parecidas com as formigas adultas, pois é possível fazer a diferenciação das estruturas da cabeça, do tórax e do abdômen. Com o passar do tempo,

as pupas que apresentavam coloração branca tendem a modificar sua pigmentação tornando-se cada vez mais escuras em tom de marrom-avermelhado, conforme mostra a figura 10. Ocorre a retirada do tegumento das pupas pelas adultas operárias e, então, uma nova operária adulta emerge, entretanto, seu exoesqueleto ainda não está esclerotizado (SCHNEIDER, 2003).

Figura 10 - Desenvolvimento das pupas da *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae).



Fonte: Schneider (2003).

2.1.3.2.4 Adultos

As operárias apresentam uma coloração do tegumento um pouco mais clara ao emergirem, mas com o tempo ocorre o escurecimento gradativo do exoesqueleto até atingir a coloração característica da espécie. Essa peculiaridade permite predizer a idade das adultas, possibilitando a diferenciação entre indivíduos de castas e subcastas distintas (SCHNEIDER, 2003).

2.1.3.3 Cuidados com a prole

As larvas e pupas de *Atta sexdens rubropilosa* são incapazes de se locomoverem. Elas necessitam de cuidados intensivos das operárias adultas, seja para a eclosão dos ovos, para a

migração, limpeza, alimentação e até mesmo para a ecdise durante a troca do exoesqueleto (SCHNEIDER, 2003; SCHREIBER, 1974; WEBER, 1996)

2.1.3.4 Hábito alimentar e sistema digestivo

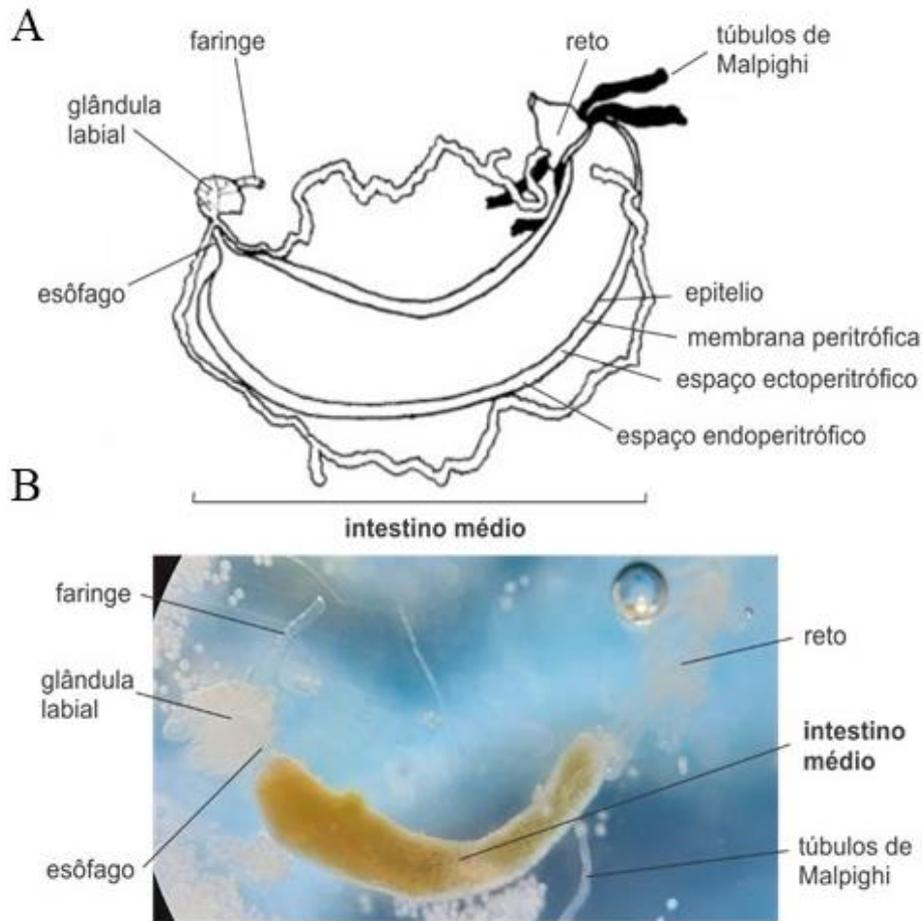
2.1.3.4.1 Larvas

De modo geral, após a emergência das larvas, durante o estabelecimento da colônia, a rainha as posiciona de forma ventral, com o aparato bucal voltado para cima. Esta característica de organização facilita o processo de alimentação das larvas. De princípio, a alimentação delas é por ovos tróficos oferecido pela rainha. Ao emergir as primeiras operárias adultas, estas passam a alimentar as larvas com hifas de fungo, ricas em proteínas. A quantidade e qualidade nutricional fornecida pelos fungos são suficientes para suprir as necessidades das larvas. Espinhos presentes próximo à mandíbula das larvas facilitam o processo de alimentação, aproveitando ao máximo os nutrientes extraídos das células dos micélios. Ao contrário das forrageiras, as larvas não possuem a câmara infrabucal, deste modo, são capazes de se alimentar por partículas sólidas (BASS; CHERRETT, 1995 DELLA-LUCIA; BENTO, 1993; MULLER et al., 2001).

As larvas são consideradas castas especialistas na digestão de nutrientes dentro da colônia e participam efetivamente da segurança da colônia suplementando as operárias com nutrientes e enzimas o que garante o cuidado constante da ninhada. Alguns estudos demonstram que as larvas suplementam as adultas com proteinases enquanto estas garantem o fornecimento de carboidratos para as larvas (ERTHAL JR, 2007; SCHNEIDER, 2003).

O sistema digestivo das larvas (FIGURA 11) é composto por três regiões: intestino anterior (boca, faringe, glândula labial e esôfago), intestino médio que compreende a maior parte do sistema digestivo das larvas e o intestino posterior composto pelo reto e ânus. De modo geral o pH do intestino das larvas varia de acordo com a região, sendo do mais ácido ao levemente ácido próximo ao intestino anterior (pH 3,0 – 6,5) e do levemente ácido ao neutro (pH 5,2 – 7,6) na região do intestino médio (ERTHAL JR, 2007). Em *A. sexdens*, a região anterior do intestino médio das larvas mostrou um pH neutro ($6,61 \pm 0,59$) com uma ligeira tendência à acidificação na região posterior ($5,69 \pm 0,35$) (SILVA et al., 2021).

Figura 11 - Sistema digestivo de larvas da *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae).



Legenda: Sistema digestivo das larvas de formigas cortadeiras (intestino anterior, intestino médio e intestino posterior). (A) Ilustração representativa do sistema digestivo das larvas. (B) Visão lateral do sistema digestivo das larvas dissecado.

Fonte: (Ilustração Erthal Jr, 2007. Adaptado).

2.1.3.4.2 Adultos

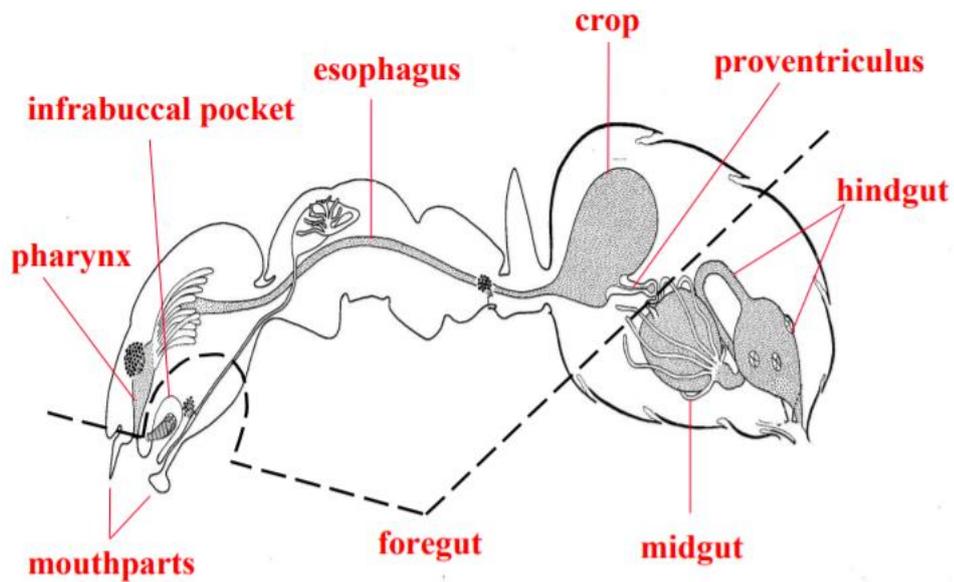
O sistema digestivo das formigas cortadeiras se divide em intestino anterior, compreendendo a boca, câmara infrabucal, faringe todos considerados partes da cabeça; esôfago, papo e proventrículo, os quais fazem parte do intestino anterior; intestino médio (ventrículo ou estômago); e intestino posterior (piloro, intestino fino ou íleo, reto e ânus) (FIGURA 12 e 13) (CAETANO, 1984). Como observado pelo autor, ocorre variações polimórficas no tamanho do aparato digestório de acordo com as castas. Em *A. sexdens* o pH do papo é ligeiramente ácido (5.5 ± 0.5), do intestino médio é mais neutro (6.7 ± 0.4), enquanto o do íleo (6.0 ± 0.6) e o reto (4.4 ± 0.9) é um pouco mais ácido (SILVA *et al.*, 2021).

O hábito alimentar das adultas é diferenciado em relação às larvas sendo que, o fungo representa apenas 9% do valor nutricional das operárias adultas (BASS; CHERRETT, 1995). As adultas do gênero *Atta* utilizam o aparato bucal, antenas e as pernas dianteiras para o manuseamento de pedaços dos fungos sem ingeri-los (SCHNEIDER, 2003). O restante da dieta requisitada por elas é proveniente da seiva que é ingerida durante o corte e o preparo do material vegetal que será incorporado no fungo (FORTI; ANDRADE, 1999; LITLEDYKE; CHERRETT, 1976; SCHNEIDER, 2003; STRADLING, 1978;).

Em segundo lugar, formigas adultas, em contraste às larvas, se alimentam principalmente de dietas líquidas. As operárias de *A. sexdens* retém, durante a ingestão, partículas superiores a 1,0 e 2,0 μm de diâmetro. De modo geral, os alimentos passam por um “filtro biológico” onde ocorre a retenção dessas partículas. Esse filtro, chamado de câmara infrabucal, é uma estrutura de grande importância evolutiva para as formigas cortadeiras. Além de protegê-las contra a infecção por patógenos, é o local onde ocorrem as primeiras degradações de polímeros como quitina e amido (FLOWER et al., 1991; FEBVAY; KERMARREC, 1986; MOREIRA; ERTAHL JR; SAMUELS, 2011). Em *Solenopsis invicta* a morfologia bucal das operárias adultas as impedem de ingerir alimentos com diâmetro da partícula maior que 0,88 μm (GLANCEY et al., 1981). Os alimentos, ao serem ingeridos, ficam retidos por cerca de 24 horas na cavidade infrabucal. As partículas sólidas são descartadas, posteriormente, em forma de *pellets*. Já os alimentos líquidos são separados em hidrossolúveis e lipossolúveis os quais se deslocam para o papo e para as glândulas pós-faringianas, respectivamente. Após a absorção, os alimentos líquidos são incorporados na hemolinfa e distribuídos para todo o corpo do inseto (BUENO, 2005; MOREIRA; ERTAHL JR; SAMUELS, 2011 IN DELLA-LUCIA 2011).

Enzimas importantes no processo digestivo, durante a alimentação das formigas, são produzidas pelas glândulas salivares, também chamadas de glândulas labiais. Essas enzimas secretadas auxiliam, principalmente, na digestão de estáfilos do fungo (MOREIRA; ERTAHL JR; SAMUELS, 2011). A dieta líquida é, então, armazenada no papo e pode ser transferida, por trofalaxia, para outras formigas. A trofalaxia é considerada outro método de alimentação das formigas, embora aconteça com menor frequência em formigas-cortadeiras. Trata-se da troca de alimentos entre os espécimes, o qual é um comportamento comum entre insetos sociais. Além de ser uma forma de troca de nutrientes, comunicação, é também uma forma de intercâmbio de enzimas digestivas entre as castas (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; MOREIRA; ERTAHL JR; SAMUELS, 2011).

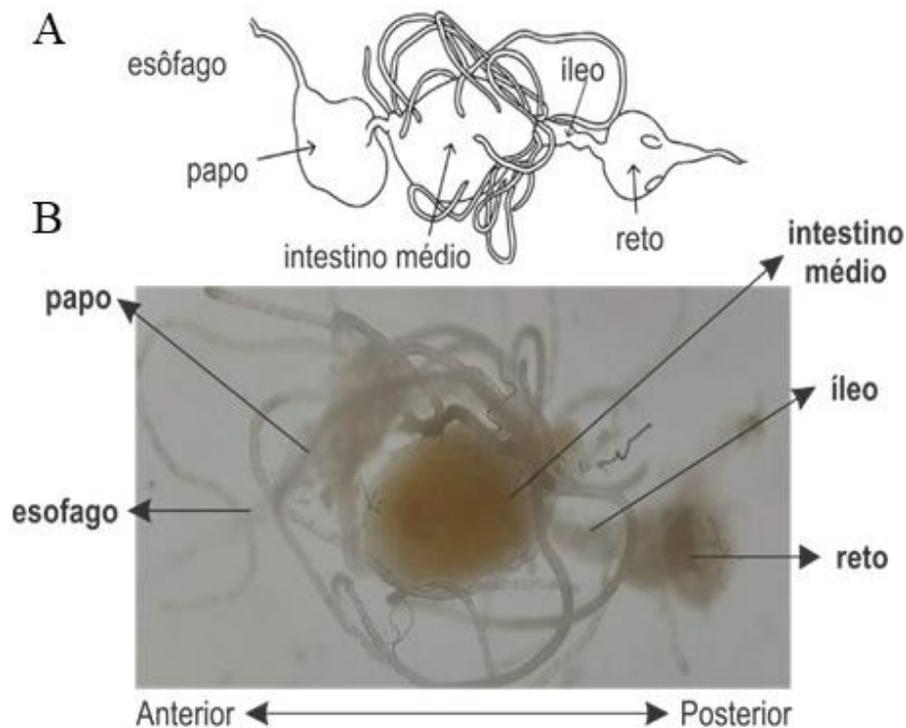
Figura 12 - Morfologia interna do sistema digestivo de formigas.



Legenda: Morfologia de órgão presentes na cabeça: cavidade bucal, faringe (*pharynx*) e câmara infrabucal (*infrabuccal pocket*); intestino anterior (*foregut*): esôfago (*esophagus*), papo (*crop*) e proventrículo (*proventriculus*); intestino médio (*midgut*); e intestino posterior (*hindgut*): reto e anus

Fonte: Cannon (1998).

Figura 13 - Sistema digestivo de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) adultas.



Legenda: Sistema digestivo das formigas adultas. (A) Esquema representativo dos órgãos digestivos. (B) Visão lateral do sistema digestivo dissecado.

Fonte: (Ilustração Rytter; Shik, 2016. Adaptado).

A digestão dos alimentos nas formigas cortadeiras está intimamente relacionada à fisiologia e bioquímica de seus fungos simbiotes (MOREIRA; ERTAHL JR; SAMUELS, 2011). Acredita-se que formigas operárias deixaram de produzir algumas enzimas digestivas, pois seus fornecimentos passaram a ocorrer pelo fungo. Além disso, os alimentos fornecidos pelo fungo passaram a ser de fácil assimilação, possibilitando melhor processo digestivo (BOYD; MARTIN, 1975a). Essa hipótese foi levantada quando se observou que enzimas presentes no fluido retal de formigas do gênero *Atta* eram provenientes de fungos por elas cultivados (BOYD; MARTIN, 1975b). No entanto, as operárias agem apenas como “transportadoras” dessas proteases, distribuindo-as pela colônia e iniciando o processo de degradação do material vegetal através da defecação em folhas recém-cortadas (MOREIRA; ERTAHL JR; SAMUELS, 2011).

2.1.4 Controle formigas cortadeiras

O controle populacional de formigas cortadeiras é realizado através de aplicação de produtos químicos, seja por iscas tóxicas, pós-secos e através da termonebulização. Em alguns casos, a utilização desses métodos de controle, apesar de eficiente, é onerosa, exige mão-de-obra especializada e possui um alto grau de periculosidade, principalmente para o aplicador. Esse é o caso da termonebulização que utiliza gás tóxico para o controle das formigas. Em outros casos, como as iscas, não é exigido uma especialização do aplicador, também são consideradas eficientes e são economicamente mais viáveis. Entretanto, todos esses métodos de controle utilizam princípios ativos de inseticidas químicos como a sulfluramida, os organofosforados e o fipronil. A principal preocupação quanto a estes produtos se deve ao potencial de acumulação ou bioacumulação, seja no próprio solo, nos recursos hídricos ou em organismos não alvo (ANJOS et al., 1993; COUTO et al., 1978; DELLA-LUCIA, 2003; GUIMARÃES, 2020).

De modo geral, as formigas carregam as iscas encontradas aleatoriamente para o interior do ninho. Estes inseticidas possuem o modo de ação lento e através do *grooming*, interação social dentro do ninho, conseguem contaminar as jardineiras, assim, o jardim de fungo fica comprometido e morre em seguida devido à falta de cuidados (MOTA FILHO et al., 2021).

O *grooming* (“allogrooming” = hábito de lambelem outras formigas; “self-grooming” hábito de lambelem a si mesmas) é um comportamento de cuidado higiênico que as formigas possuem. Durante este comportamento, é frequente que as formigas se contaminem e

contaminem outras. O mais comum é a contaminação por “allogrooming” que corresponde a cerca de 46% de toda a contaminação dentro da colônia entre as operárias. Esses hábitos contribuem para a dispersão de contaminantes dentro do ninho o que pode provocar uma contaminação generalizada e, deste modo, aumentar a eficiência no controle de formigas forrageadoras e jardineiras CATEALANI, 2020; MOTA FILHO; 2021).

Dentre todos os ingredientes ativos, para o controle químico de formigas cortadeiras, utilizados no Brasil (deltametrina, fenitrotiona, fipronil e sulfluramida) todos foram restringidos pelo comitê do órgão *Forest Stewardship Council (FSC)* – Conselho de Manejo Florestal. Este conselho normaliza e certifica a produção florestal e suas cadeias produtivas permitindo ao consumidor final verificar a rastreabilidade do produto. Desta forma, a produção florestal brasileira precisou se enquadrar nas diretrizes determinadas pelo FSC para que a comercialização dos produtos pudessem ser certificada, garantindo a exportação dos bens florestais (FOREST STEWARDSHIP COUNCIL, 2021; ZANUNCIO et al., 2016).

Com a crescente preocupação ambiental, o controle biológico de pragas tem sido cada vez mais requerido entre os produtores rurais que buscam por alternativas mais sustentáveis. Assim sendo, a utilização de agentes entomopatogênicos poderá ser uma alternativa viável e eficaz para o manejo de insetos que causam danos econômicos nas culturas agrícolas e florestais. Microrganismos como fungos, vírus, nematoides e bactérias têm sido empregado cada vez mais no manejo integrado de pragas (BOARETO; FORTI, 1997; DELLA-LUCIA; SOUZA, 2011; GUIMARÃES, 2020). Dentre esses microrganismos a bactéria *B. thuringiensis* se destaca devido à diversidade e especificidades em que coloniza determinados hospedeiros (DE MAAGD et al., 2000; MACHADO, 2020).

2.2 *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria gram-positiva aeróbica facultativa encontrada em diversos ecossistemas como solo, água, restos de palhadas, insetos mortos, entre outros (ISHIWATA, 1901 citado por SANSINENEA, 2012; VALICENTE; BARRETO, 2003; VALICENTE et al., 2010), e inclusive em ambientes extremos como em baixas temperaturas (YADAV et al., 2016a; YADAV et al., 2015a; YADAV et al., 2016b), em altas temperaturas (SAHAY et al., 2017), em ambientes salinos (SAXENA, 2016; YADAV; SAXENA, 2018), em solos ácidos (VERMA et al., 2017) e em ambientes com déficit hídrico (YADAV et al., 2015b). Essa bactéria pertencente à família Bacillaceae tem por característica ser heterotrófica e produzir proteínas cristais, características consideradas a grande vantagem evolutiva desses

microrganismos (MANDIC-MULEC; STEFANIC; ELSAS, 2013). Foi descrita pela primeira vez por Shigetane Ishiwata, em 1901, no Japão. Ele identificou que esta bactéria seria a causa de mortes e doenças no bicho-da-seda, nomeando-a de Sottokin que tem por significado bacilos da morte súbita. Entretanto, foi quatorze anos depois, em 1915, que sua morfologia foi descrita. O bacteriologista Ernst Berliner isolou uma cepa do lepidóptera *Anagasta kuehniella*, conhecida como traça-da-farinha, encontrada na cidade de Thuringia na Alemanha, desta forma, em homenagem à província, deu-se o nome de *B. thuringiensis* (SANSINENEA, 2012).

Bacillus thuringiensis possui um ciclo de vida simples, dependendo de substratos como açúcares, aminoácidos e oxigênio, além de outras condições ambientais para seu crescimento vegetativo. Sobre essas condições a reprodução vegetativa das cepas ocorre através de bipartição, porém, com a limitação desses nutrientes ocorre a esporulação e, desta forma, a síntese de corpos cristalinos parasporais, isto é, endoproteínas. Essas proteínas endógenas possuem atividade inseticida, agindo contra diversas ordens de insetos como as lepidópteras, coleópteras, dípteras, Hymenopteras além de animais de outras classes como os aracnídeos e filos como os nematoides e, até mesmo, contra células humanas cancerígenas (DONOVAN W. P. et al., 2006; OHBA, M.; MIZUKI, E.; UEMORI, A. 2009; PALMA, L. et al., 2014; WARREN, G.W. et al., 1998).

Até a introdução dos genes Cry em plantas, que codificam as endoproteínas cristais (Cry), por volta de 1996, através da técnica de DNA recombinante, o mercado global de biopesticidas correspondia apenas a 1% das vendas de produtos destinados ao controle de pragas agrícolas. Com o advento da biotecnologia, possibilitando a transformação genética de plantas e a expressão de proteínas heterólogas, permitiu-se um avanço significativo no campo. De acordo com o Serviço Internacional para Aquisição de Aplicações de Agrobiotecnologia (do inglês *International Service for the Acquisition of Agri-biotech Application – ISAAA*) (2017), em 2017 foram mais de 101 milhões de hectares plantados com espécies expressando proteínas Cry, representando cerca de 53% das espécies geneticamente modificadas.

2.2.1 Genes Cry

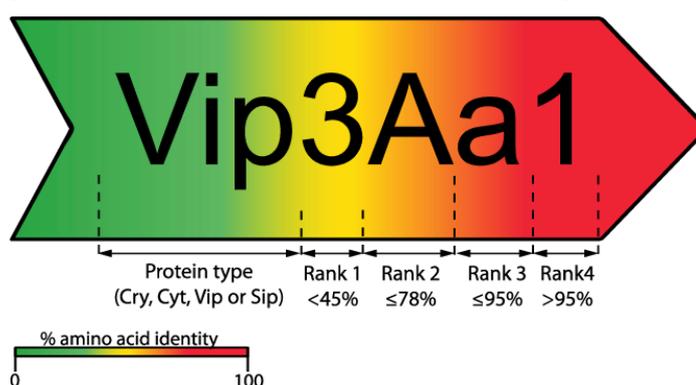
Inúmeros genes Cry têm sido isolados, sequenciados e classificados a partir de cepas de *B. thuringiensis* de diferentes localidades do mundo. O primeiro gene Cry de Bt, subespécie *kurstaki*, foi clonado em *Escherichia coli* no início da década de 80 pela primeira vez (SCHNEPF; WHITELEY, 1981). Desde então, técnicas de biologia molecular como a Reação

em Cadeia da Polimerase (PCR) têm permitido o rápido avanço das identificações de novos genes, levando a um aumento significativo do conhecimento dessas moléculas, sendo que em 1989 eram conhecidos pouco mais de 40 genes Cry (HOFTE; WHITELEY, 1989), saltando para mais de 250 em 2004 (VILAS-BÔAS; LEMOS, 2004) e atualmente possuem mais 700 genes descritos no Comitê de Nomenclatura de Toxinas de *Bacillus thuringiensis* – *Bacillus thuringiensis* Toxin Nomenclature.

2.2.2 Protoxinas

As toxinas Crystal ou δ -endotoxinas são formadas durante a fase de esporulativa da bactéria e incluem as toxinas Cry que recebe este nome devido à forma parasporal cristalina, sendo específica principalmente para os insetos das ordens díptera, lepidóptera e coleóptera e a proteína Cyt, que possui atividade citolítica e causam toxicidade principalmente para ordem de insetos dípteras. Essas famílias de proteínas com atividade inseticida possuem subdivisões de acordo com a similaridade de aminoácidos presentes e recebem uma nomenclatura pelo Comitê de Nomenclaturas das Toxinas de *B. thuringiensis* de acordo com o tipo de proteína e a similaridade entre os aminoácidos, variando de < 45% a > 95% (FIGURA 14) (PALMA, L. et al., 2014).

Figura 14 - Mecanismo de nomenclatura das protoxinas Bt



Fonte: Palma et al., 2014

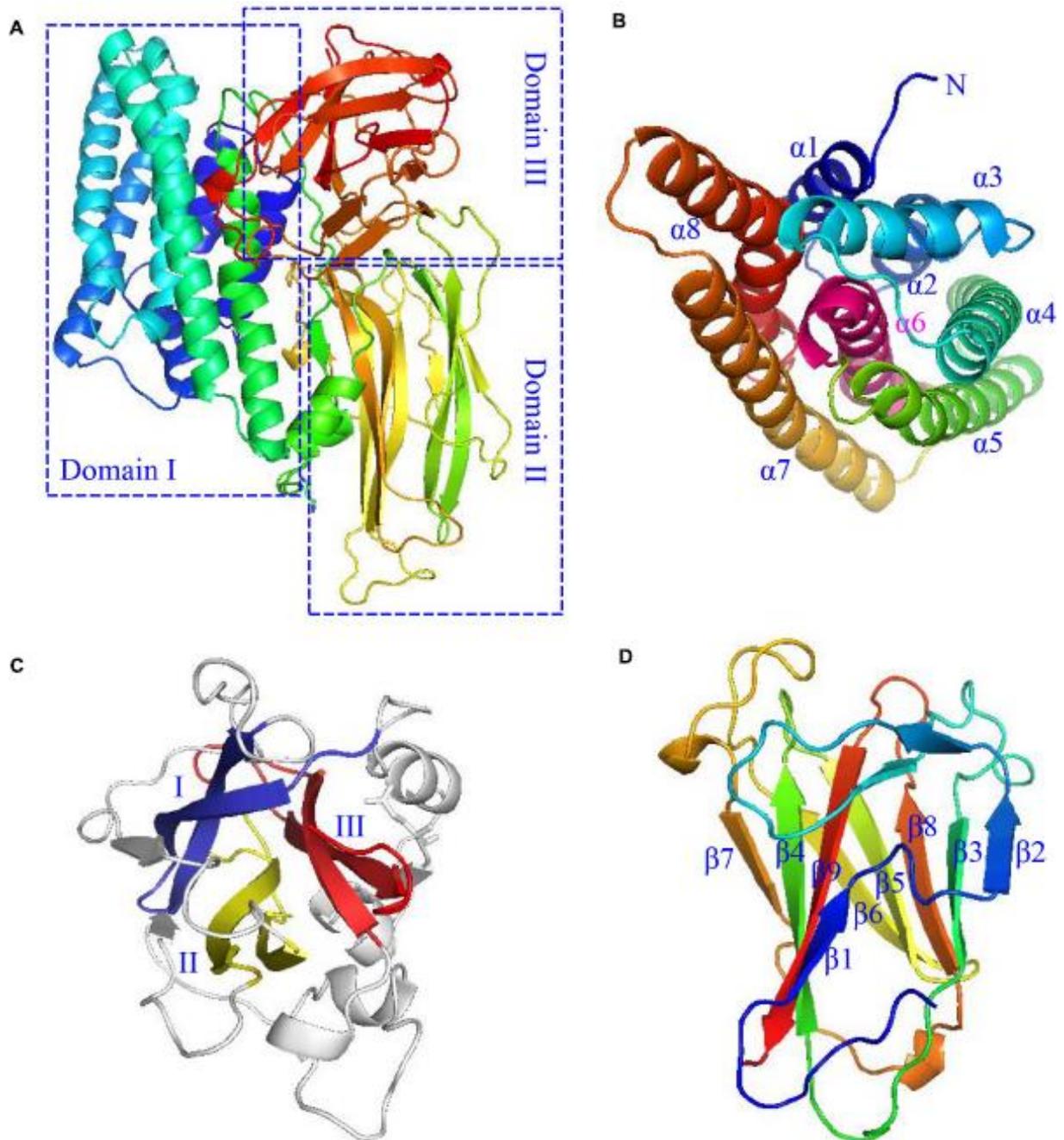
De acordo com a revisão de Palma et al., (2014) algumas cepas de Bt produzem outros tipos de proteínas tóxicas que são secretadas durante o crescimento vegetativo: as proteínas inseticidas vegetativas (*Vip* – sigla em inglês) e as proteínas inseticidas secretadas (*Sip* – sigla em inglês). Outras proteínas com potencial inseticida são sintetizadas por diferentes estirpes de *Bacillus* como as sphaericolyns, alveocolyns, β -exotoxinas, entre outras.

Essas protoxinas codificadas pelos genes *cry* apresentam-se em dois tipos diferentes de acordo com seu peso molecular. O primeiro grupo compreende aquelas com tamanho de 130 a 140 quilo Dalton (kDa), tendo como exemplo a proteína Cry1Aa; e o segundo grupo são representados por aquelas proteínas que possuem tamanho médio de 65 kDa, como é o caso da Cry11Aa. O primeiro grupo é processado no intestino médio dos insetos por enzimas que reconhecem tanto a região N-terminal como a região C-terminal. Já, no segundo grupo só há o reconhecimento da região N-terminal. Quando proteolizado pelo intestino médio do inseto ambos os grupos são fragmentados em tamanhos médios de 60 kDa, e estes fragmentos são tóxicos para a praga, pois, ao se ligarem aos receptores presentes nas membranas das células são capazes de provocar pequenas perfurações no intestino médio (PALMA et al., 2014)

De modo geral, as proteínas da família Cry possuem três domínios de membrana (FIGURA 15A). O domínio I é formado por uma α -hélice a qual provavelmente está relacionado com a penetração da proteína na membrana e com a formação dos poros, assim como na interação com os canais de íons (FIGURA 15B). O domínio II é uma β -prisma de três folhas β antiparalelas e compactadas o qual estaria relacionado com a ligação ao receptor de membrana atuando na determinação da especificidade da proteína (FIGURA 15C). E o domínio III “ β -sandwich” (FIGURA 15D), relacionado ao reconhecimento do receptor de membrana, à inserção na membrana para estabilidade da proteína e na especificidade em relação ao inseto alvo (JURAT-FUENTES; HECKEL; FERRÉ, 2021; LIU et al., 2021; XU et al., 2014).

Os mecanismos de ação das proteínas Cry (FIGURA 16) ainda não estão completamente elucidados, como relata Liu et al. (2021). Dois principais modelos têm sido propostos para explicar tais mecanismos. O primeiro deles, chamado de Modelo de Ligação Sequencial, compreende uma sequência complexa de processos na qual as protoxinas Cry tornam-se mais maduras. Ao fim dessa maturação as toxinas formam oligômeros que são inseridos nas células, após se ligarem aos diversos receptores de membrana do intestino médio dos insetos (LIU et al., 2021; MELO et al., 2016; PALMA et al., 2014). Durante o Modelo de Ligação Sequencial, após a ingestão pelos insetos, as proteínas Cry são inicialmente dissolvidas no lúmen intestinal, hidrolisadas por diferentes proteases como tripsina, quimotripsina e proteinase K, geralmente diferentes faixas de pH, seja ácido ou alcalino, dependendo especificamente da toxina Cry. Em sequência, após a remoção da região N-terminal e/ou C-terminal, as proteínas se tornam ativas (MENDONZA-ALMAZA et al., 2020).

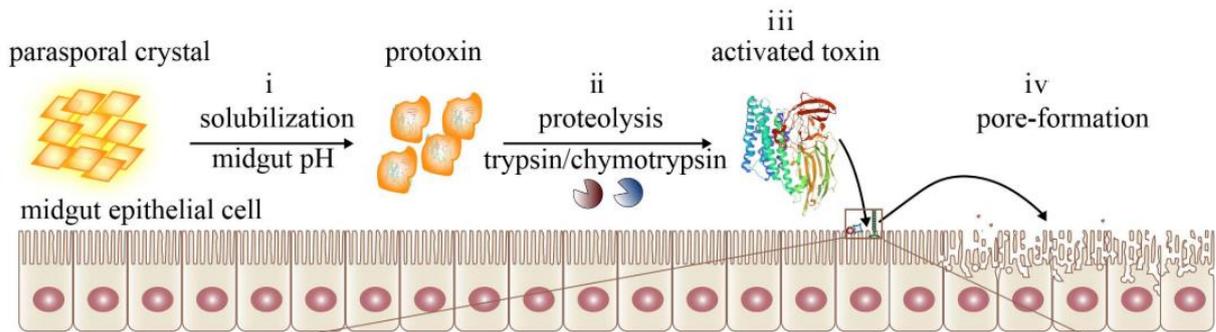
Figura 15 - Estrutura típica das proteínas Cry



Legenda: (A) Os três domínios delimitados pelas linhas tracejadas em azul . (B) Domínio I apresenta 8 estrutura em α -hélice. (C) Domínio II apresenta três folhas- β antiparalelas. (D) Domínio III apresenta duas folas- β antiparalelas compreendidas em $\beta 1$ - $\beta 9$ - $\beta 4$ - $\beta 7$ e $\beta 2$ - $\beta 3$ - $\beta 8$ - $\beta 5$ - $\beta 6$, respectivamente.

Fonte: LIU et al., 2021

Figura 16 - Ilustração do mecanismo de ação geral das proteínas Cry



Legenda: Processo de ativação das toxinas Cry e formação dos poros nas células epiteliais do intestino médio: (i) primeiramente os cristais são solubilizados no lúmen intestinal para formar as protoxinas (ii) as quais são hidrolisadas por proteases formando a toxina Cry (iii) que se liga aos receptores de membrana (iv) para ocorrer a formação dos poros.

Fonte: (Liu et al., 2021 Adaptado)

De modo geral, por se caracterizar em uma ligação com baixa afinidade, as toxinas monoméricas Cry se ligam reversivelmente aos receptores de membrana fosfatase alcalina (ALP) e aminopeptidase N (APN). Após as toxinas Cry serem localizadas e enriquecidas dentro da membrana, elas se ligam de maneira irreversível ao ectodomínio do receptor das caderinas. Em seguida, ocorre a indução da mudança conformacional da estrutura da proteína Cry, o que facilita a clivagem da α -hélice 1 da região N-terminal do domínio I, sendo essa clivagem, fundamental para o desempenho da atividade inseticida da toxina Cry (JIMÉNEZ-JUÁREZ et al., 2008). A forma maturada da toxina Cry é então liberada do receptor da caderina para formar oligômeros pré-poros os quais se ligam novamente aos receptores ALP e APN, entretanto, desta vez com uma afinidade maior levando sua inserção nas células da membrana e à formação de um canal de íon transmembrana, o que, conseqüentemente, acarreta na desregulação da entrada de íons na célula, permitindo que diferentes íons transitem livremente, ocasionando danos fisiológicos e osmóticos e levando à lise celular (BRAVO et al., 2004; BRAVO et al., 2007; PALMAS et al., 2014; LIU et al., 2021). De acordo com Pigott e Ellar (2007) a afinidade de ligação da proteína Cry com seus respectivos receptores de membrana depende necessariamente dos domínios II e III, bem como a espécie e quantidade de receptores e sítios e ligação das células epiteliais da membrana do intestino médio do inseto e ao valor do pH do mesmo.

Entretanto, como observado por Melo et al. (2016), a ocorrência da formação de pré-poros não é um pré-requisito para a formação dos poros nas células da membrana epitelial, o que indica a existência de outro mecanismo de ação das proteínas Cry (LIU et al., 2021). Nesse sentido, foi proposto o Modelo de Vias de Sinalização. Em convergência com o mecanismo de Modelo de Ligação Sequencial, neste mecanismo também é fundamental a solubilização da

proteína Cry que também pode ocorrer em diferentes faixas de pH, para a ativação da protoxinas. Entretanto, uma vez que a toxina Cry reconhece e se liga especificamente ao receptor da caderina irá provocar uma cascata de sinalização celular Mg^{2+} -dependente. Ocorrerá, então, a ativação da proteína G e da enzima adenilato ciclase que catalisa a hidrólise de ATP em cAMP, aumentando seu nível intracelular. Nesse sentido, ocorrerá a ativação da proteína quinase A (PKAs) que desencadeará em uma serie de vias de cascata de sinalização à jusante, levando à desregulação dos canais de íons e do citoesqueleto acelerando o processo de apoptose causando a morte do inseto (LIU et al., 2021).

Já foi verificado a ocorrência de seleção de insetos-pragas resistentes a determinadas cepas e genes de Bt devido à frequente exposição por determinadas proteínas inseticidas (TABASCHNICK et al., 2013). Esses mecanismos de resistência são em decorrência de mutações pontuais que ocorrem nos genes que codificam os receptores de membrana, redução no nível de expressão dos receptores ou das proteases, mecanismos epigenéticos, entre outros. Entretanto, esta não é uma preocupação com as formigas cortadeiras *A. sexdens*, pois, a variação genética entre elas, devido à característica de poliandria, dificulta a pressão de seleção. Mesmo que eventuais mutações possam ocorrer, esses genes não serão herdados, já que a casta das operárias não é reprodutiva.

Técnicas como a PCR e o sequenciamento de alta-performance têm permitido o *screening* de isolados de *B. thuringiensis* de diversas localidades globais com o intuito de caracterizar novas cepas e desenvolver estratégias como a piramidação de genes (LI et al., 2020; SALIM; BAKHSH; GÖKÇE, 2021) e produtos biológicos que possam ser úteis no controle biológico de pragas agrícolas e florestais (MENDONZA-ALMANZA et al., 2020; POHARE et al., 2020; SAJID et al., 2018).

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O manejo de formigas cortadeiras é de suma importância para o setor agroflorestal. O controle biológico com a bactéria *B. thuringiensis* é uma alternativa em potencial para a substituição do uso de agrotóxicos, já que a tendência é os inseticidas químicos disponíveis no mercado serem banidos. Entretanto, não há disponibilidade de métodos eficazes para o controle alternativo desses insetos-pragas. A agregação de informações sobre a suscetibilidade de larvas e adultos de *A. sexdens* quanto a cepas de *B. thuringiensis* pode ser relevante para o desenvolvimento de tecnologias que possam ser eficientes no manejo de formigas cortadeiras.

Os resultados esperados deste trabalho podem fornecer conhecimento básico para melhor compreensão da atuação da bactéria *Bt* em larvas e adultos de formigas da espécie *A. sexdens*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local experimental e material biológico

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório Central de Biologia Molecular (LCBM) da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Quanto aos materiais biológicos, as cepas de *B. thuringiensis* foram fornecidas pelo Laboratório de Controle Biológico da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Milho e Sorgo, as quais são provenientes do Instituto Pasteur da França. Foram analisadas 8 cepas de *B. thuringiensis* denominadas por T06 (*Bt entomocidus*), T07 (*Bt aizawai*), T10 (*Bt darmstadienis*), T16 (*Bt indiana*), T23 (*Bt japonensis*), T24 (*Bt neoleonensis*), T27 (*Bt mexicanensis*) e T29 (*Bt amargiensis*). As larvas e as formigas adultas forrageadoras da espécie *Atta sexdens* foram fornecidas pelo Laboratório de Manejo Integrado de Pragas Florestais da Universidade Federal de Lavras, onde as colônias são mantidas sob luminosidade controlada, umidade relativa do ar em 70% e temperatura média de 23 ± 2 °C.

4.2 Suspensão bacteriana e diluição seriada

As cepas foram crescidas por 24 horas a 30 °C (estufa UVP HL-2000 HybriLinker™) em placas de petri (90x15 mm) estéril e descartável contendo 25 mL de meio Lúria-Bertani (LB) sólido, acrescidos dos seguintes sais minerais: $0,3 \text{ gL}^{-1} \text{ MgSO}_4$; $0,02 \text{ gL}^{-1} \text{ FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $0,02 \text{ gL}^{-1} \text{ ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 2% de glucose, o pH foi ajustado para 7,2, segundo o protocolo propostos por Valicente e Mourão (2008). Após esse período de 24 horas, as colônias isoladas foram estriadas em novas placas de petri (90x15 mm) contendo novo meio LB, entretanto, por um período de 72 horas a 30 °C. Para melhorar a eficiência de esporulação da cepa Bt24 a mesma permaneceu por um período de 96 horas em estufa sob temperatura de 30 °C. Posteriormente a este período, com o auxílio de uma lâmina de microscopia, a massa bacteriana foi raspada e suspendida em 5 mL de água ultrapura autoclavada.

As amostras foram vigorosamente homogeneizadas em agitador de tubos tipo vortex. Após esse procedimento, utilizou-se 100 µL da suspensão bacteriana para realizar três diluições seriadas (1:10, 1:100 e 1:1000) a fim de facilitar o procedimento de contagem dos esporos. A

cada etapa da diluição seriada os microtubos contendo água ultrapura autoclavada e as alíquotas da suspensão bacteriana foram homogeneizadas em vortex. Todo o procedimento de diluição seriada foi realizado em caixas térmicas contendo gelo para manter as amostras sob baixa temperatura.

4.3 Contagem dos esporos

Com as devidas diluições realizadas, utilizou-se a câmara de Neubauer para a contagem dos esporos em microscópio de contraste de fase (Zeiss Scope A.1 - 50 x). Foi pipetado na câmara 10 µL da diluição seriada e após a contagem visual dos esporos foi realizado a estimativa da concentração de esporos por mililitro da suspensão bacteriana. Foi observada uma relação 1:1 entre os esporos e cristais de *B. thuringiensis*.

4.4 Bioensaio de sobrevivência das larvas

Os bioensaios de sobrevivência das larvas foram realizados, para cada cepa, em diferentes dias, sendo utilizado para cada experimento um controle negativo com H₂O destilada e autoclavada.

Para esses bioensaios, a concentração de esporos fornecida às larvas foi da ordem de 1×10^8 esporos mL⁻¹. A solução utilizada nos tratamentos foi produzida com 5 µL das respectivas suspensões bacterianas concentrada, 10 µL do corante rodamina e 35 µL de água ultrapura autoclavada. O controle negativo, fornecido para as larvas, foi constituído 10 µL de rodamina e 40 µL de água ultrapura autoclavada.

Para cada tratamento e para o controle, foram dispostas 50 larvas (tamanho médio de 0,3mm) em posição ventral em placas de petri (60x15 mm) contendo 10 mL de fosfato salino (*phosphate-buffered-saline* – PBS 1X), geleificado com ágar (3%) para garantir a sobrevivência das larvas fora da colônia A dieta foi fornecida para cada larva utilizando uma micro-seringa tipo Hamilton de 10 µL, dosada por uma bomba de seringa volumétrica (KDSscientific) (APÊNDICE - FIGURA 1a) na região ventral próximo a mandíbula permitindo, desta forma, a autonomia desses insetos durante a alimentação. Após as larvas ficarem expostas ao tratamento e ao controle por um período de 24 horas, com o auxílio de uma pinça e lenços de papel *kimwipe*, o excedente da gota foi secado.

Foi realizada uma avaliação preliminar a fim de excluir dos experimentos aquelas larvas que eventualmente não se alimentaram, discriminadas das demais através da coloração obtida

pelo corante rodamina. Anotado a população final, após essa avaliação preliminar, as placas de petri onde as larvas estavam dispostas foram colocadas, em minicolônia dentro de potes de plásticos (500 ml) contendo 2,5 cm² de jardim de fungos (acondicionados em copos descartáveis de 50 mL, o qual foi recortado próximo à base), formigas adultas jardineiras e generalistas e um cm³ de dieta semissólida (50 g L⁻¹ de glicose, 10 g L⁻¹ de proteose peptona, 4 g L⁻¹ de extrato de levedura e 15 g L⁻¹ de ágar) dispostas em pedaços de papel alumínio (APÊNDICE - FIGURA 3b) (NAGAMOTO et al., 2014). A dieta foi autoclavada a 120 °C por 20 minutos, posteriormente foram vertidas em placas de petri (90x60 mm). Posteriormente às formigas transportarem as larvas da placa para o jardim de fungos, retirou-se as placas do pote.

As larvas que morreram ao longo do experimento foram retiradas pelas próprias formigas adultas da minicolônia e descartadas no lixo (APÊNDICE – FIGURA 2). As larvas encontradas no lixo foram consideradas mortas e entraram para a avaliação da mortalidade. A avaliação da mortalidade e a troca da dieta semissólida foram realizadas diariamente por 14 dias. Para cada cepa, três a seis repetições com 50 larvas foram realizadas usando suspensões bacterianas provenientes de colônias diferentes

Para descartar possíveis interferências da esporulação, do tempo de armazenamento ou das condições da minicolônia na mortalidade das larvas, a análise de sobrevivência das larvas de *A. sexdens* foi realizada utilizando o modelo de Risco Proporcional de Cox. Foi utilizado o a regressão de Cox – Modelo Estratificado – para avaliar a variabilidade entre as repetições, utilizando cada uma delas como uma covariante. Não houve diferença significativa entre as repetições e seus respectivos tratamentos, dessa forma essas covariáveis puderam ser desconsideradas, já que não influenciaram na mortalidade. A razão de verossimilhança (LR – do inglês *Likelihood Ratio*) e o p valor (p) para cada cepa foi: T06 LR = 9.445, *P* = 0,093; T07 LR = 0.0238, *P* = 0,877; T10 LR = 1.877, *P* = 0,598; T16 LR = 6.677, *P* = 0,083; T23 LR = 4,717, *P* = 0,194; T24 LR = 7,719, *P* = 0,052; T27 LR = 3,757, *P* = 0,289 e T29 LR = 0,336, *P* = 0,953. Para todas as cepas, o grau de liberdade foi igual a 1.

4.5 Análise do aspecto físico dos insetos juvenis submetidos ao bioensaio de mortalidade

Ao final dos 14 dias de avaliação da mortalidade das larvas submetidas às diferentes cepas de Bt, foi realizada a análise do aspecto físico dos insetos imaturos. A análise de larvas, pré-pupas e pupas que foram recuperados da minicolônia ao final do ensaio. A análise do aspecto físico teve por finalidade observar a ocorrência de larvas mortas dentro da minicolônia

foi conduzida de fungos, bem como as possíveis deformações em pupas decorrentes da exposição ao Bt. Os parâmetros avaliados estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros utilizados na análise do aspecto físico dos insetos juvenis

	LARVAS	PRÉ-PUPAS	PUPAS
PARÂMETROS	BRANCAS	BRANCAS	BRANCAS
	ROSAS	ROSAS	ROSAS
	SECAS	MORTAS	DEFEITUOSAS
	MORTAS	-	-

Fonte: do autor (2022).

4.6 Bioensaio de concentração letal média (CL₅₀) em larvas

A concentração letal média (CL₅₀) foi estimada para as três cepas que apresentaram melhor performance na mortalidade de larvas (T06, T16 e T24). Foram fornecidos às larvas cinco concentrações diferentes de esporos de Bt (1×10^{11} ; 1×10^8 ; 1×10^6 ; 1×10^4 ; e 1×10^2) (esporos mL⁻¹). Para a obtenção das diferentes concentrações foi realizado uma suspensão bacteriana na ordem de 1×10^{11} esporos mL⁻¹. Para obter as demais concentrações realizou-se diluições seriadas do concentrado.

O ensaio foi conduzido em delineamento sequencial pelo método Probit com cinco tratamentos (as diferentes concentrações de esporos mL⁻¹) e um controle (ausência de esporos de Bt) para as três cepas. Para cada tratamento e para o controle foram realizadas cinco repetições com 10 larvas que se alimentaram por repetição. Entretanto, para a cepa T06 o número de larvas utilizadas foi de 10 a 12. O fornecimento da dieta e o método de condução foram similares ao descrito no item anterior, entretanto a minicolônia foi instalada em potes de 250 mL com tampa. A avaliação da mortalidade foi realizada em intervalos de três dias durante 14 dias.

A curva de concentração-mortalidade foi estimada de acordo com o modelo de regressão probit, utilizando a ferramenta PROC PROBIT do *software* SAS User (SAS Institute 2008). Os dados da mortalidade foram corrigidos com a mortalidade do tratamento controle. O gráfico foi construído utilizando o *software* SigmaPlot 12.5.

4.7 Bioensaio de sobrevivência de formigas adultas

Para a condução dos bioensaios de mortalidade com formigas adultas, foram preparadas suspensões bacterianas com as mesmas cepas (T06, T07, T10, T16, T23, T24, T27 e T29) e concentrações utilizadas nos bioensaios de mortalidade com larvas.

Os dados do bioensaio de sobrevivência foram submetidos à análise de sobrevivência pelos estimadores Kaplan-Meier através do método log-rank utilizando o *software* SigmaPlot 12.5 (*Systat Software*, San Jose, CA, EUA).

4.7.1 Bioensaio de sobrevivência com dieta líquida

O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com nove tratamentos, sendo as oito cepas de Bt (T06, T07, T10, T16, T23, T24, T27 e T29) e o controle negativo (água ultrapura autoclavada). Cada tratamento foi composto por cinco repetições e cada repetição foi composta por 20 formigas forrageadoras em jejum por um período de 6 horas. Os esporos das oito cepas de Bt e o controle negativo foram fornecidos para as formigas adultas via 180 µl de dieta líquida, na concentração final de $1 \cdot 10^8$ esporos mL⁻¹. A dieta foi preparada contendo 50 g L⁻¹ de glicose, 10 g L⁻¹ de proteose peptona, 4 g L⁻¹ de extrato de levedura e 150 g L⁻¹ de polpa cítrica e foi filtrada em papel filtro (Qualy J.Prolab®) para a retirada do excedente de polpa cítrica. A dieta foi autoclavada a 120 °C por 20 minutos e mantida em frasco reagente com rosca e tampa GL 45 de 500 mL - Laborglas® e armazenada na geladeira até o uso. O ensaio foi conduzido em potes plásticos de 750 mL com tampa. Durante os três primeiros dias do ensaio 180 µL de dieta líquida misturada com os esporos de Bt na concentração final de 1×10^8 esporos mL⁻¹ foram fornecidos em tampas de microtubos de 1,5 mL. Já para o grupo controle, formigas foram alimentadas com 180 µL de dieta líquida sem esporos. Após o quarto dia, a dieta líquida foi substituída por 2,5 cm² do jardim de fungo junto com ~20 formigas jardineiras e dieta semissólida. O ensaio foi conduzido por um total de 20 dias, sendo os potes mantidos em estufa BOD em temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $70\% \pm 10$. A avaliação da mortalidade das formigas foi realizada nos dias 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 15, 17 e 20. A dieta semissólida para a manutenção da minicolônia foi trocada no dia das avaliações da mortalidade, sendo realizada, também, a higienização dos potes para evitar eventuais contaminações.

4.7.2 Bioensaio de sobrevivência com dieta semissólida

O delineamento experimental utilizado no bioensaio de sobrevivência com a dieta semissólida foi igual ao descrito no item anterior. Durante os três primeiros dias do ensaio foi fornecido 1 cm³ de dieta semissólida embebida em 50µL da suspensão bacteriana concentradas a 1x10⁸ esporos mL⁻¹. Já para o grupo controle, os pedaços de dieta foram embebidos com 50µL de H₂O ultrapura e autoclavada. Após o quarto dia, a dieta líquida foi substituída com 2,5 cm² do jardim de fungo junto com ~20 formigas jardineiras e dieta semissólida sem a presença da suspensão bacteriana. A avaliação da mortalidade das formigas foi realizada nos dias 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 14, 16, 18 e 21. A dieta semissólida para a manutenção da minicolônia foi trocada no dia das avaliações da mortalidade, sendo realizada, também, a higienização dos potes para evitar eventuais contaminações.

4.8 Decantação dos esporos de Bt na dieta líquida.

Para avaliar a decantação dos esporos de *B. thuringiensis* na dieta líquida, suspensões bacterianas dos esporos da cepa T23 corados com azul de coomassie foram homogeneizados com dieta líquida. Para a coloração dos esporos uma alíquota de 50% (v/v) do corante azul de coomassie foi adicionado à 1 mL de suspensão bacteriana, homogeneizado em vortex por 30 segundos e mantido por três minutos. Após, foi realizado a centrifugação a 13.000 g por 2 minutos. Foi descartado o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspensão em água ultrapura autoclavada. Foi realizado a lavagem do *pellet* três vezes para retirar o excedente de corante, repetindo o procedimento de centrifugação e ressuspensão. Por fim, a confirmação da coloração dos esporos foi realizada em microscópio de contraste de fase (Zeiss Scope A.1 - 50 x). O volume de 50 µL de suspensão bacteriana foi misturado com 255 µL de dieta líquida na concentração final de 1x10⁸ esporos mL⁻¹ e acondicionados em tampas de microtubos de 1,5 ml, colocadas dentro de potes de 500 ml com tampa, simulando o bioensaio com as formigas. Alíquotas de cada tampa foram retiradas com 2, 4, 6 e 24 horas, respectivamente. Foram realizadas três replicatas técnicas para cada tempo de avaliação. Após, foi realizado a contagem de esporos dessas alíquotas em câmara de Neubauer em microscópio de contraste de fase (Zeiss Scope A.1 - 50 x).

Os dados foram submetidos à análise de regressão não linear pela constante de decaimento exponencial com dois parâmetros, onde $f(x) = a \cdot e^{(-b \cdot x)}$. A análise de regressão foi realizada usando o procedimento de ajuste de curva pelo *software* SigmaPlot 12.5.

4.9 Acúmulo de esporos no sistema digestório de forrageadoras

Para avaliar a trajetória dos esporos Bt dentro do organismo das forrageadoras adultas, foi avaliado se os esporos/cristais chegam ao intestino médio onde são solubilizados, ativados e onde ocorre a interação com os receptores de membrana para a formação dos poros ou se ficam retidos na câmara infrabucal. Com essa finalidade foi realizada a quantificação esporos/cristais na câmara infrabucal, no papo e no intestino médio desses insetos.

4.9.1 Bioensaio com dieta líquida

Para o bioensaio de acúmulo de esporos no aparelho digestório (câmara infrabucal, papo e intestino médio) das formigas adultas com a dieta líquida, esporos da cepa T23 foram corados com azul de coomassie para poder identificar o caminho percorrido no sistema digestivo das formigas.

Formigas forrageadoras foram colocadas em potes de 500 ml com tampa em jejum por um período de 24 horas. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com dois tempos de exposição à dieta líquida contendo esporos de Bt (1×10^8 esporos mL^{-1}) corados, sendo 2 horas e 24 horas. O volume de 205 μL da dieta líquida contendo os esporos de Bt corados foi condicionado em tampas de microtubos de 1,5 ml (APÊNDICE – FIGURA 3a). Foram realizadas três repetições contendo 10 formigas forrageadoras por repetição. Após os períodos de exposição, as formigas foram coletadas em microtubos de 1,5 mL e armazenadas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ para as futuras análises de dissecação.

4.9.2 Bioensaio com dieta semissólida

Para o bioensaio de acúmulo de esporos no aparelho digestório (câmara infrabucal, papo e intestino médio) das formigas adultas com a dieta semissólida, uma fração de dieta semissólida de 1 cm^3 foi embebida com suspensão bacteriana da cepa T23 concentradas a 1×10^8 esporos mL^{-1} e previamente corados com azul de coomassie conforme descrito na seção 4.8. A cepa T23 foi escolhida levando em consideração o estoque e ao menor tempo de esporulação. As formigas forrageadoras foram colocadas em potes de 500 ml com tampa e em jejum por um período de 20 horas. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com um tempo de exposição à dieta contendo esporos de Bt de 24 horas. A dieta contendo os esporos de Bt corados foi acondicionada em pequeno pedaço de papel alumínio (APÊNDICE

– FIGURA 3b). Foram realizadas três repetições contendo 10 formigas forrageadoras por repetição. Após os períodos de exposição, as formigas foram coletadas em microtubos de 1,5 mL e armazenadas a -20 °C para as futuras análises.

4.10 Dissecação do aparato digestório das formigas adultas e das larvas

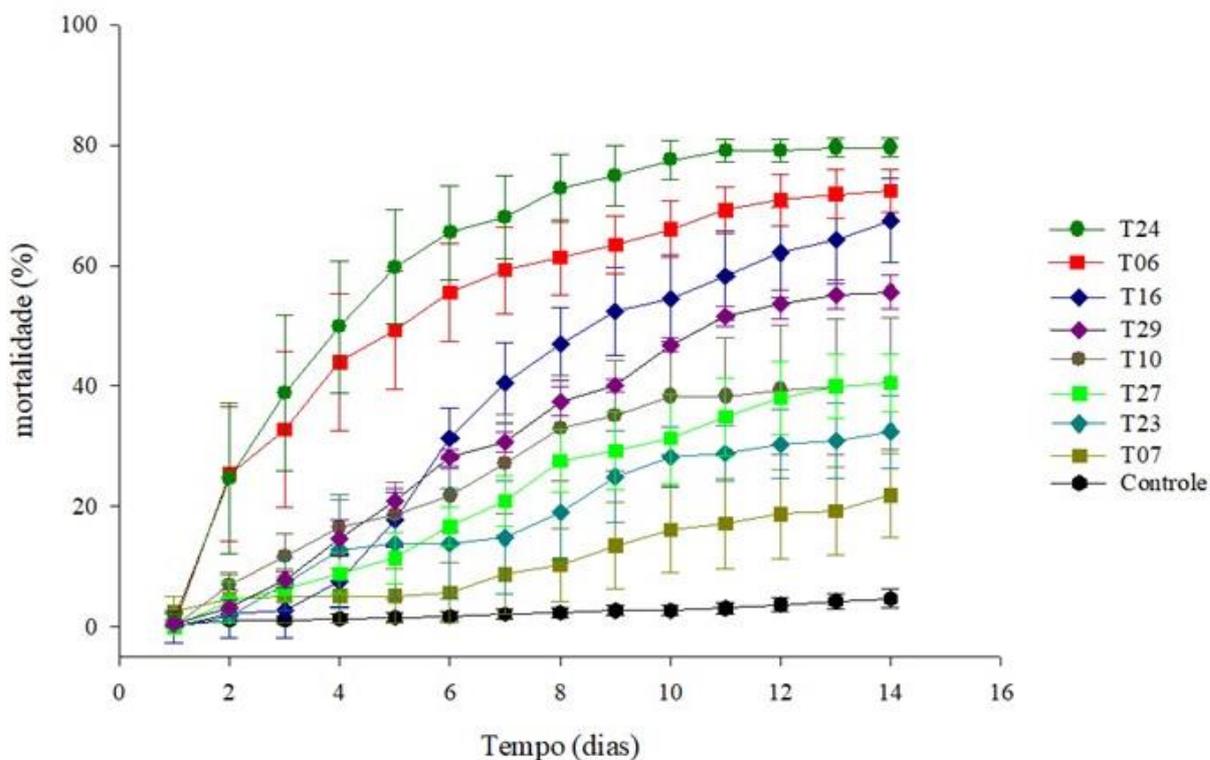
Para a extração da câmara infrabucal, papo e intestino médio, foram utilizadas pinças e agulhas de insulina. Foi realizado a extração do sistema digestivo das formigas submetidas aos bioensaios com a dieta semissólida e líquida para a análise do acúmulo de esporos de Bt nos órgãos do sistema digestivo. A extração foi realizada com o auxílio de uma lupa estereoscópica binocular (Zeiss). Foi utilizada solução fisiológica NaCl 215mM para manter a hidratação dos órgãos das formigas. Após a extração, foi realizado a maceração dos tecidos. A contagem dos esporos presente na câmara infrabucal, no papo e no intestino médio foi realizado na câmara de Neubauer em microscópio de contraste de fase (Zeiss Scope A.1 - 50 x).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito das cepas de Bt na sobrevivência das larvas

A mortalidade das larvas tratadas com todas as cepas de Bt na concentração de 1×10^8 esporos mL^{-1} foi significativamente maior que o controle (Kaplan-Meier; Log-Rank $\chi^2 = 7,801$, $\text{gl} = 8$, $P < 0,001$). A cepa T24 apresentou a maior eficiência com 79,6% de mortalidade (post-hoc Holm-Sidak's = 654,217, $P = < 0,001$). As cepas T06 e T16, as quais não diferenciaram entre si, causaram 73,7% (post-hoc Holm-Sidak's = 608,062, $P = < 0,001$) e 67,6% (post-hoc Holm-Sidak's = 456,653, $P = < 0,001$) de mortalidade, respectivamente. Em seguida, a cepa T29 causou 55,6% de mortalidade (post-hoc Holm-Sidak's = 318,174, $P = < 0,001$). As demais cepas, T07 (post-hoc Holm-Sidak's = 13,596, $P = < 0,001$), T10 (post-hoc Holm-Sidak's = 96,847, $P = < 0,001$), BT23 (post-hoc Holm-Sidak's = 75,747, $P = < 0,001$), e T27 (post-hoc Holm-Sidak's = 168,428, $P = < 0,001$), não foram tão efetivas na mortalidade das larvas, com porcentagens de mortalidade de 14,1%, 38,5%, 29,1% e 40,5% respectivamente. O controle levou a uma mortalidade de 4,69% (GRÁFICO 1).

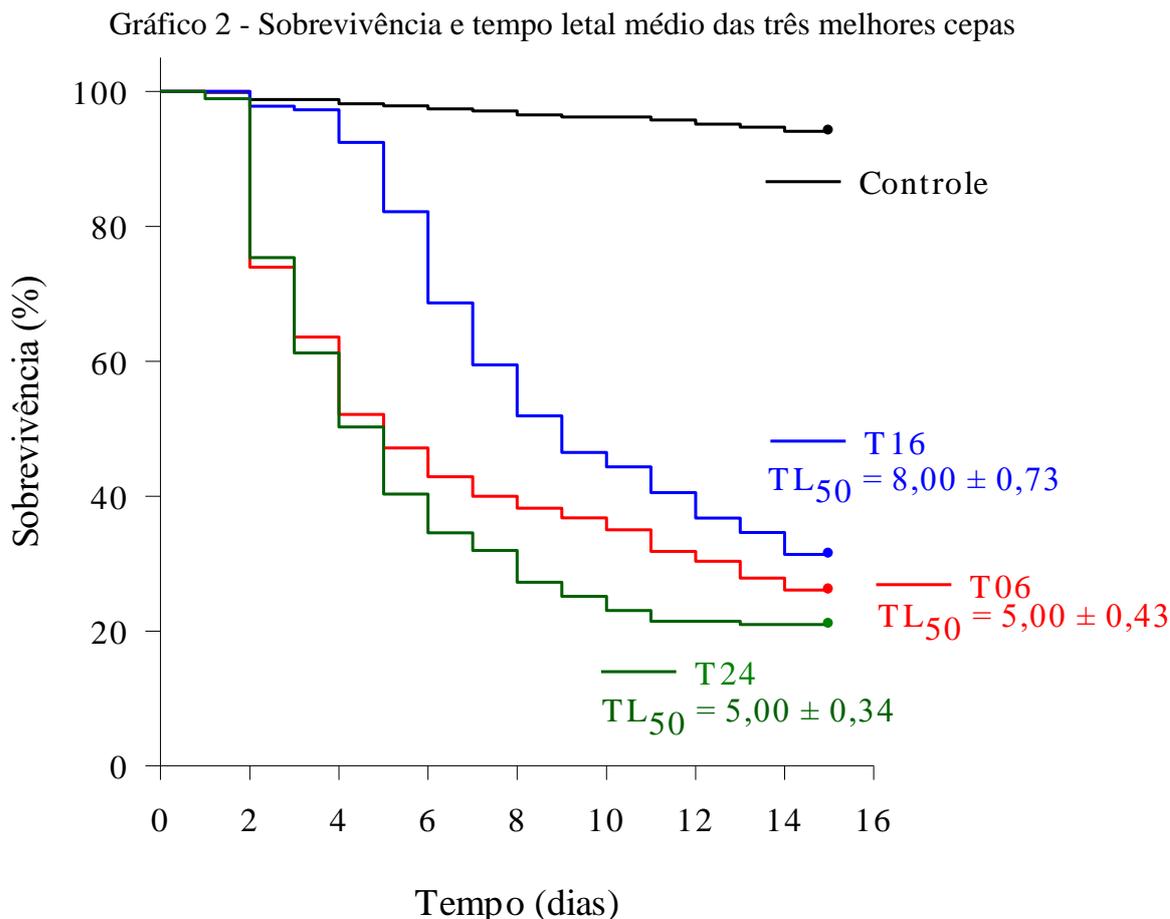
Gráfico 1 - Mortalidade das larvas de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) alimentadas com diferentes dietas contendo suspensão das respectivas cepas de Bt e o controle negativo contendo H₂O



Legenda: Curva de mortalidade de larvas de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) alimentadas com as oito cepas públicas de *B. thuringiensis* na concentração de 1×10^8 esporos mL^{-1} e o controle negativo com H₂O. Os resultados representam a média de três a seis repetições independentes (média \pm erro padrão). Cada repetição consistia em 44-50 larvas. T06 (*Bt entomocidus*), T07 (*Bt aizawai*), T10 (*Bt darmstadienis*), T16 (*Bt indiana*), T23 (*Bt japonensis*), T24 (*Bt neoleonensis*), T27 (*Bt mexicanensis*) e T29 (*Bt amargiensis*).

Fonte: Do autor (2022).

Não houve diferença no Tempo Letal Médio (TL₅₀) entre os tratamentos T24 (TL₅₀ = $5,000 \pm 0,339$ dias) e T06 (TL₅₀ = $5,000 \pm 0,432$ dias) (post-hoc Holm-Sidak's = 2,315, $P=0,128$) (GRÁFICO 2). O tratamento T16 apresentou TL₅₀ = $8,000 \pm 0,727$ dias. Embora a cepa T29 tenha apresentado TL₅₀ de onze dias, foi considerado apenas as três melhores cepas. Para os demais tratamentos, não foram expressos o tempo letal médio, já que não chegaram a matar 50% da população.



Legenda: Curva de sobrevivência em relação ao tempo letal média (TL_{50}) das três melhores cepas obtidas no bioensaio de sobrevivência das larvas. O símbolo no final de cada curva indica os dados censurados. T06 (*Bt entomocidus*), T16 (*Bt indiana*) e T24 (*Bt neoleonensis*).

Fonte: Do autor (2022).

Apesar de haver trabalhos na literatura que tratam a respeito da ação das proteínas Bt em insetos adultos da ordem Hymenoptera, poucos trabalhos têm avaliado o seu efeito em larvas de insetos pertencentes à esta ordem. Rolim et al. (2020), analisaram o efeito da cepa *B. thuringiensis* HD-1 em larvas de *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) parasitoide da larva *Spodoptera frugiperda*. (Lepidóptera: Noctuidae). Os autores observaram efeitos negativos no comportamento e no parasitismo da vespa *P. elaeisis* contra larvas de *S. frugiperda* expostas ao Bt. Observaram, também, que houve um decréscimo de 53% na sobrevivência das larvas de *P. elaeisis* emergidas de *S. frugiperda*, suscetível e tratadas com Bt, ao longo de duas gerações. Para os autores, este fator pode diminuir drasticamente a população desses parasitoide em campo.

Diprion pini, vespa da família Diprionidae (Hymenoptera), é uma importante praga na cultura de pinus na Europa. Foi observado uma mortalidade de 35% em larvas de *D. pini*

tratadas com 5 µg de proteínas Cry solubilizadas da cepa Bt PS86Q3 (GARCIA-ROBLES et al., 2001). Os autores identificaram a presença de dois genes da família Cry5 presentes nessa cepa, sendo os genes Cry5Ac e Cry5Ba. Posteriormente, os autores isolaram uma proteína de 75 kDa da protoxina Cry5A e realizaram a ativação proteolítica com tripsina, e, ao oferecer essas proteínas ativadas para as larvas de *D. pini*, observaram uma mortalidade de 71% das larvas desse inseto. Estes resultados evidenciam a importância dessas proteases na ativação das protoxinas, aumentando a eficiência no controle dessa praga.

A suscetibilidade de cinco espécies de larvas de diferentes famílias da ordem Hymenoptera foi avaliada quanto à toxicidade da cepa PS86Q3 (PORCAR et al., 2008). Os autores avaliaram as espécies *Diprion pini* e *Gilpinia hercyniae* (Diprionidae), a espécie *Arges rosae*, pertencente à família Argidae; *Pristiphora abientina*, a qual faz parte da família Tenthredinidae; e *Apis mellifera*, a qual faz parte da família Apidae. Foi verificado a sensibilidade à toxina produzida pela cepa PS86Q3 apenas para as espécies *D. pini* e *P. abientina*. Os resultados observados pelos autores, referente à vespa *D. pini*, praga da cultura de Pinus na Europa, confirmam os resultados obtidos por Garcia-Robles et al. (2001). Eles observaram que a cepa PS86Q3 causou 40% de mortalidade em *D. pini*. Os autores não observaram diferença significativa na mortalidade de *A. rose* e *G. hercyniae*, ambos com menos de 10% de mortalidade.

As cepas de Bt apresentaram variabilidade quanto à eficiência no controle de larvas da espécie *A. sexdens*. T06, T16, T24 e T29 causaram entre 50% a 80% de mortalidade com o TL₅₀ variando entre 5 a 11 dias. Comparando aos dados observados em trabalhos com outras espécies da ordem Hymenoptera, os dados obtidos no presente trabalho são de grande relevância, visto que a alta porcentagem de mortalidade observada é promissora para o manejo desses insetos a nível de campo. Quanto ao TL₅₀, levando em consideração o modo de ação das proteínas Bt, o tempo estimado de 5 dias é ideal para o transporte de eventuais iscas para o ninho. Este lapso permite a contaminação de um maior número de indivíduos dentro da colônia e, desta forma, eleva a eficiência do manejo dessas pragas florestais.

5.2 Aspectos físicos dos insetos juvenis recuperados da minicolônia ao fim do bioensaio de sobrevivência

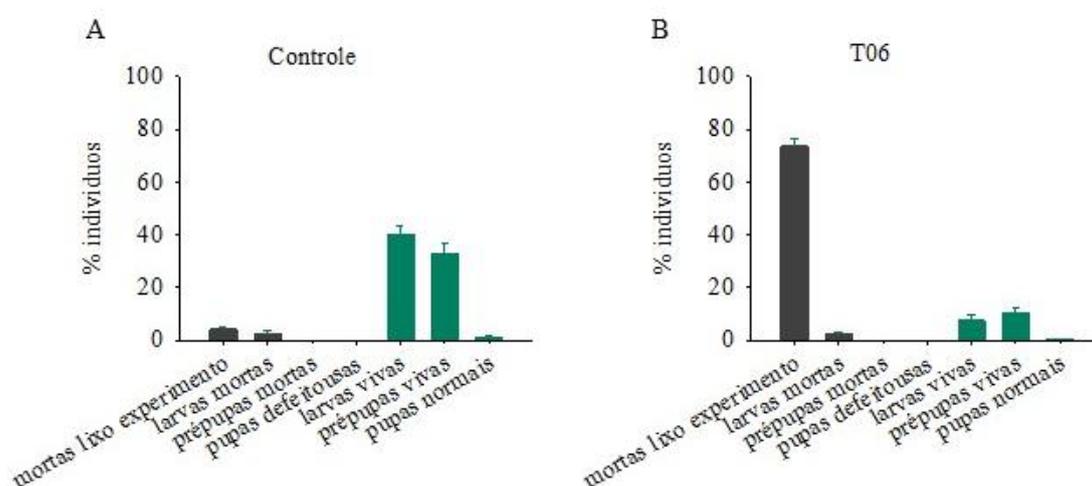
Ao final do bioensaio de sobrevivência das larvas, foi realizado uma análise do aspecto físico dos insetos juvenis recuperados das minicolônias. Com exceção ao controle e aos tratamentos com as cepas T07, T10, T23 e T27 a maioria das larvas dos demais tratamentos

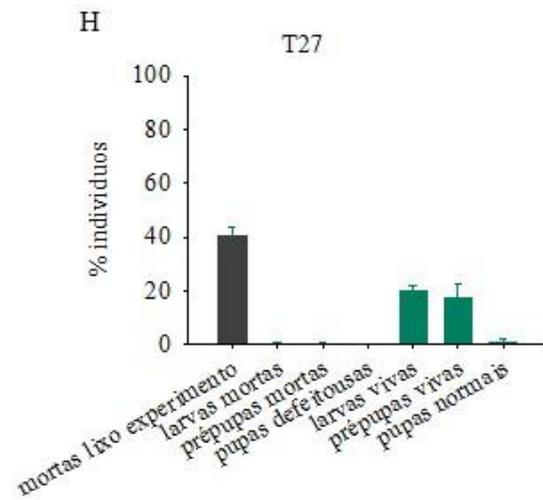
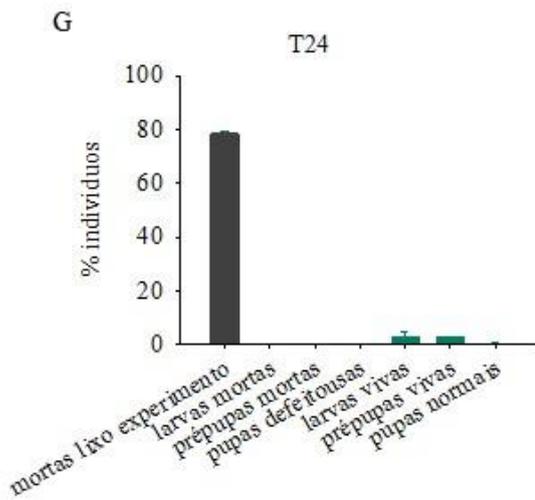
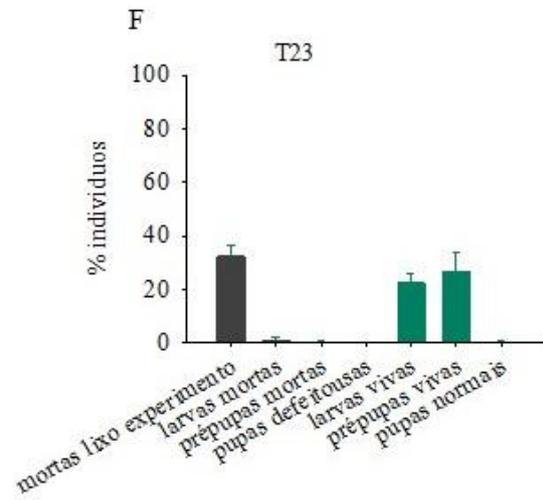
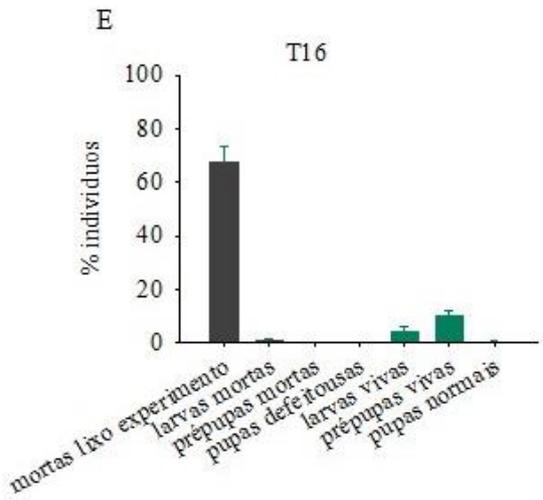
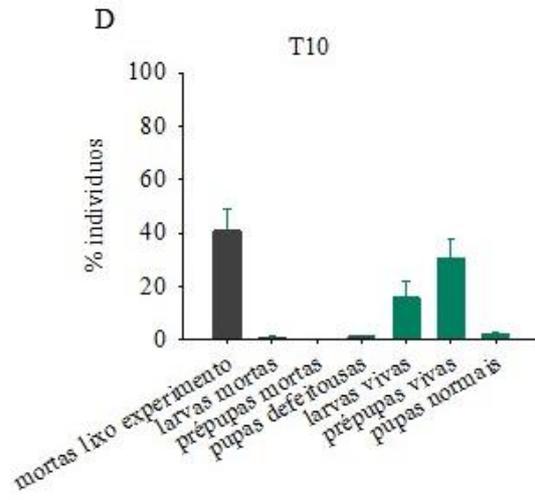
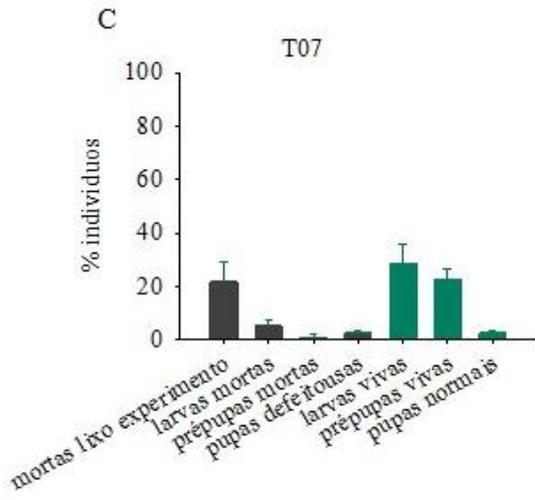
morreram durante o bioensaio de sobrevivência. No controle negativo (GRÁFICO 3a) a maioria dos insetos recuperados da minicolônia permaneceram vivos e todos apresentavam morfologia saudável. Do total de insetos juvenis recuperados da minicolônia no tratamento controle negativo 40,07% permaneceram na fase de desenvolvimento larval, 33,2% evoluíram para pré-pupa, apenas 1% chegou ao estágio de desenvolvimento de pupa e 25% não foram recuperados. Para o tratamento BT06 (GRÁFICO 3b), no qual 73,7% das larvas morreram durante o experimento de sobrevivência, aproximadamente 2,5% das larvas recuperadas na minicolônia foram classificadas como mortas com aspecto de desidratação. 7,5% dos insetos juvenis permaneceram como larvas e 10,3% como pré-pupas. Foram identificados 5,2% de larvas mortas dentro da minicolônia no tratamento T07 (GRÁFICO 3c), o qual apenas 14,1% das larvas morreram durante o bioensaio de sobrevivência. 1,1% dos insetos recuperados correspondiam a pré-pupas mortas e 2,7% a pupas defeituosas. 51,1% dos insetos juvenis permaneceram vivos no final do bioensaio de sobrevivência, sendo 28,5% e 22,6% de larvas e pré-pupas, respectivamente. No tratamento T10 (GRÁFICO 3d), que teve 38,5% das larvas mortas durante o bioensaio de sobrevivência, apenas 0,7% das larvas encontradas na minicolônia foram classificadas como mortas por aspecto de desidratação. 1,65% corresponderam a pupas defeituosas. Dos 52% dos insetos juvenis que permaneceram vivos no fim do experimento, 16,5%, 33% e 2,5% correspondiam a larvas, pré-pupas e pupas, respectivamente. Para o tratamento T16 (GRÁFICO 3e), o qual teve 67,6% de mortalidade de larvas no bioensaio de sobrevivência, 1,07% dos insetos juvenis recuperados da minicolônia corresponderam a larvas classificadas como mortas por aspecto de desidratação. Não foi observado pré-pupas mortas e nem pupas defeituosas. Dos 15% de insetos juvenis que permaneceram vivos ao fim do bioensaio, 4,25%, 10,3% e 0,5% corresponderam a larvas, pré-pupas e pupas, respectivamente. Ao fim do tratamento T23 (GRÁFICO 3f), o qual apresentou mortalidade de 29,1% de larvas ao fim o bioensaio de sobrevivência, 1,13% e 0,54% corresponderam a larvas e pré-pupas mortas. Não foram observadas pupas defeituosas. 22,5%, 26,4% e 0,5% corresponderam a larvas, pré-pupas e pupas vivas. Ao final do bioensaio de sobrevivência do tratamento T24 (GRÁFICO 3g), que apresentou expressivos 79,6% de mortalidade de larvas, não foi observado insetos juvenis mortos na minicolônia. 13%, 2,61% e 0,53% corresponderam a larvas, pré-pupas e pupas vivas. Para o tratamento T27 (GRÁFICO 3h), com 40,5% de larvas mortas ao fim do bioensaio de sobrevivência, 0,5% e 0,5% dos insetos juvenis recuperados, corresponderam a larvas e pré-pupas, respectivamente. Dos 38,66% de insetos juvenis vivos ao final do bioensaio de sobrevivência, 20,2%, 17,4% e 1,06%

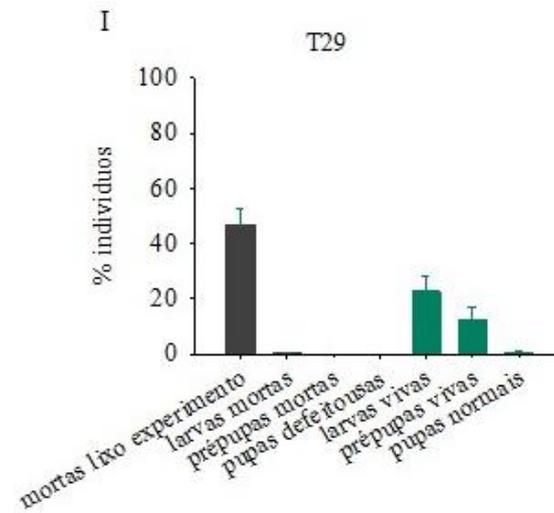
corresponderam a larvas, pré-pupas e pupas, respectivamente. Para o tratamento T29 (GRÁFICO 3i), com 55,6% de mortalidade no bioensaio de sobrevivência, ao final do bioensaio 0,33% dos insetos juvenis recuperados foram classificados como larvas mortas por desidratação. Não foi observado pré-pupas mortas e nem pupas defeituosas. Dos 36,23% de insetos juvenis que permaneceram vivos ao final do bioensaio de sobrevivência, 22,9%, 12,6% e 0,73% corresponderam a larvas, pré-pupas e pupas, respectivamente.

A análise do aspecto físico nos permitiu avaliar se ocasionalmente larvas mortas pelos tratamentos com a bactéria *B. thuringiensis* não foram descartadas pelas formigas adultas na lixeira da minicolônia. O descarte de materiais presentes no fungo que possam vir a comprometê-lo é uma prática comportamental das formigas (FARJI-BRENER; TADEY, 2012; HART; RATNIEKS, 2002). Os insetos juvenis que foram recuperados da minicolônia e classificados visualmente como mortos apresentavam um aspecto de desidratação. Pupas defeituosas, embora não tenham sido descartadas pelas formigas na lixeira da minicolônia, dificilmente sobreviveriam após o desenvolvimento completo da metamorfose, o que nos permitiu classificá-las como insetos mortos, como também foi observado em besouro-do-colorado (GARCIA-ROBLES, 2020). Nota-se que, eventualmente, larvas expostas às toxinas Bt que evoluam a pupas podem ser comprometidas por má formação de órgãos ou membros, como observado nos bioensaios. Se o tempo de observação fosse ampliado, de modo que permitisse que as larvas de diferentes instares chegassem ao estágio de pupas, provavelmente o número de insetos que poderiam apresentar alguma deformação de seus membros seria maior.

Gráfico 3 - Análise do aspecto físico dos insetos juvenis recuperados das minicolônias após o bioensaio de mortalidade



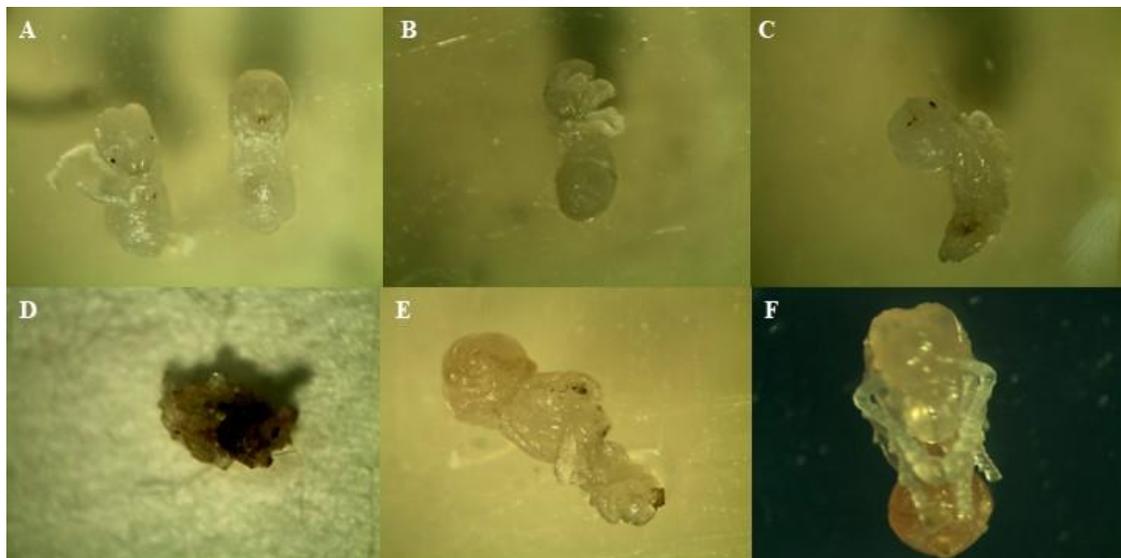




Legenda: Barras em cinza correspondem aos insetos juvenis mortos. “Mortas lixo experimento” corresponde àquelas que morreram durante o bioensaio de sobrevivência. “Larvas mortas” corresponde àquelas recuperadas da minicolônia e que foram consideradas mortas por aspecto de desidratação. Barras em verde correspondem aos insetos juvenis que permaneceram vivos após o bioensaio de sobrevivência das larvas. (A) controle, (B) T06 (*Bt entomocidus*), (C) T07 (*Bt aizawai*), (D) T10 (*Bt darmstadienis*), (E) T16 (*Bt indiana*), (F) T23 (*Bt japonensis*), (G) T24 (*Bt neoleonensis*), (H) T27 (*Bt mexicanensis*) e (I) T29 (*Bt amargiensis*). Os resultados representam a média de três a seis repetições independentes (média \pm erro padrão). Cada repetição constituiu em 44-50 larvas.

Fonte: Do autor (2022)

Figura 17 - Pupas defeituosas recuperadas das minicolônias



Legenda: Pupas defeituosas recuperadas das minicolônias. Imagens obtidas a partir de microscópio estereoscópio trinocular com câmera acoplada. Imagens de pupas defeituosas A, B, C, D e E (1,5x). Imagem de pupa normal F.

Fonte: do autor (2022);

O proteoma da hemolinfa de larvas do besouro-do-colorado (*Leptinotarsa decemlineata*) submetidos à toxina Cry3Aa mostrou um decréscimo de proteínas envolvidas no desenvolvimento e no crescimento desses insetos em contrapartida ao aumento de proteínas

relacionadas ao sistema imunológico das larvas do besouro(GARCIA-ROBLES et al., 2020). Houve também uma redução na alimentação e na mobilidade dessas larvas após a intoxicação com os cristais Bt. Dentre os peptídeos que tiveram seu nível de expressão reduzido, os autores observaram o decréscimo de proteínas envolvidas na ecdise e na metamorfose como a proteína ribossomal S6, os receptores de renina e a glucosamina frutose-6-fosfato aminotransferase (KATO et al., 2002; SONG; GILBERT, 1997; ZHANG et al., 2014).

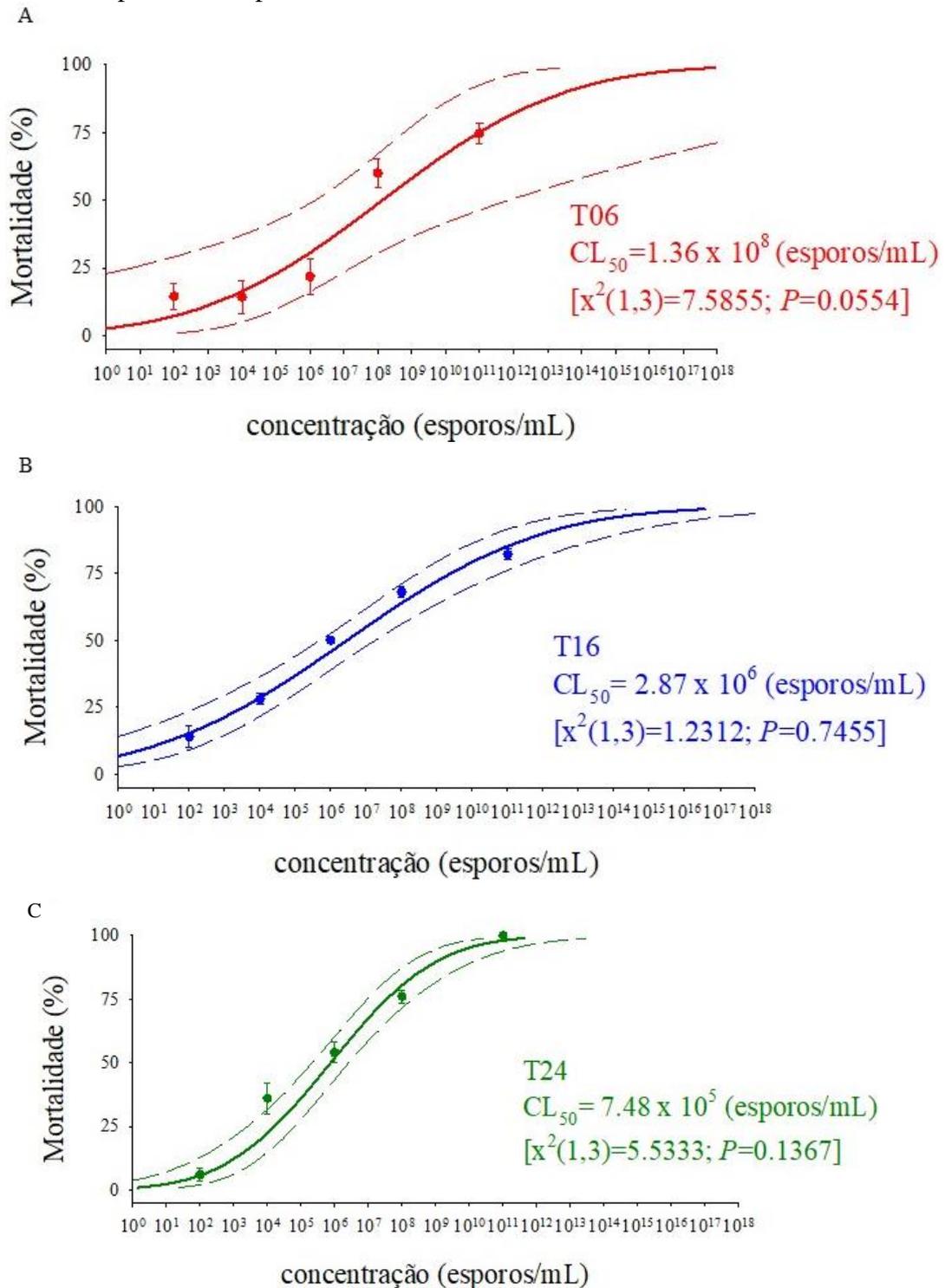
5.3 Efeito de diferentes concentrações de esporos na sobrevivência das larvas

A Concentração Letal Média (CL_{50}) estima a concentração de determinado produto, composto ou molécula necessária para matar 50% da população em um determinado período de tempo. A estimativa da CL_{50} das cepas nos permite prever qual delas seria mais eficiente, em termos econômico, para controlar a população das larvas de *A. sexdens*. Foi estimado a CL_{50} para as três cepas mais (T06, T16 e T24) de acordo com o bioensaio de sobrevivência das larvas. Para a cepa T06 (GRÁFICO 4a) a CL_{50} estimada foi em $1,36 \times 10^8$ [$1,36 \times 10^6$ - $6,84 \times 10^{11}$] esporos mL^{-1} (declive ($\pm EP$) = $0,237 \pm 0,049$; $n = 300$, $gl = 3$, $\chi^2=7,5855$; $P=0,0554$). A cepa T16 (GRÁFICO 4b) apresentou uma CL_{50} de $2,87 \times 10^6$ [$4,96 \times 10^5$ - $1,77 \times 10^7$] esporos mL^{-1} (declive ($\pm EP$) = $0,230 \pm 0,040$; $n = 300$, $gl = 3$, $\chi^2=1,2312$; $P=0,7455$). Para a cepa T24 (GRÁFICO 4c) a CL_{50} foi estimada em $7,48 \times 10^5$ [$2,11 \times 10^5$ - $2,57 \times 10^6$] esporos mL^{-1} (declive ($\pm EP$) = $0,406 \pm 0,049$; $n = 300$, $gl = 3$, $\chi^2=5,5333$; $P=0,1367$). Levando em consideração a eficiência na porcentagem de mortalidade das larvas, o tempo letal médio e a concentração letal média, a cepa BT24 apresentou o melhor potencial para o controle de larvas da formiga cortadeira *A. sexdens*.

Em *Elasmopalus lignosellus* (Lepidóptera: Pyralidae) foi observado uma mortalidade de 85% causada pela cepa Bt HD-1. Os isolados BR83, BR145, BR09, BR78, S1534, S1302, HD1, BR52, BR38, BR53, S545, S1269, S1450 apresentaram uma CL_{50} de $3,8 \times 10^6$ a $8,55 \times 10^6$ esporos mL^{-1} em larvas de *E. lignosellus* (ZORZETTI et al., 2017). Porcar et al. (2008) observaram que a cepa PS86Q3 é capaz de controlar a metade da população com uma CL_{50} de $4.9 \text{ mg } mL^{-1}$ e $1.6 \text{ mg } mL^{-1}$ para *D. pini* e *P. abientina*, respectivamente.

A mortalidade das larvas de *A. sexdens* varia de acordo com a concentração de esporos a qual foi exposta em função do tempo de exposição. Durante o bioensaio da CL_{50} 100% das larvas expostas à maior concentração de esporos (10^{11} esporos mL^{-1}) da cepa T24 morreram após 48 horas de exposição. No entanto, larvas expostas à menor concentração de esporos (10^2 esporos mL^{-1}) não diferenciaram da mortalidade do tratamento controle negativo.

Gráfico 4 - Mortalidade das larvas de *A. sexdens* expostas à diferentes concentrações de esporos das cepas T06, T16 e T24.



Legenda: Curva de concentração letal média (CL_{50}) das três cepas mais eficientes em induzir a mortalidade das larvas de *A. sexdens*. (A) CL_{50} cepa T06. (B) CL_{50} cepa T16. (C) CL_{50} cepa T24. Linhas pontilhadas denotam intervalos de confiança de 95 %. A concentração letal foi estimada no bioensaio de sobrevivência utilizando a análise probit. Os símbolos mostram a média de mortalidade e as barras verticais representam o erro padrão (SE). Todas as concentrações foram repetidas cinco vezes, cada uma consistindo em 10-12 larvas.

Fonte: Do autor (2022)

A concentração letal é fundamental para aumentar a eficiência na mortalidade de larvas *Spodoptera frugiperda*. (Lepidóptera: Noctuidae) (ROLIM et al., 2020). Foi verificado que 100% das larvas do grupo controle sobreviveram ao final do bioensaio com diferentes concentrações letais da cepa HD-1 de Bt. Houve um decréscimo de 30% na sobrevivência de larvas *S. frugiperda* tratadas com CL₂₅. Ao longo do experimento a sobrevivência das larvas tratadas com CL₅₀, CL₇₅ e CL₉₀ decaíram para 6,25%, 0% e 0%, respectivamente. Esses dados observados pelos autores evidenciam a importância da relação custo-benefício durante a maximização da eficiência no controle das larvas de *S. frugiperda*.

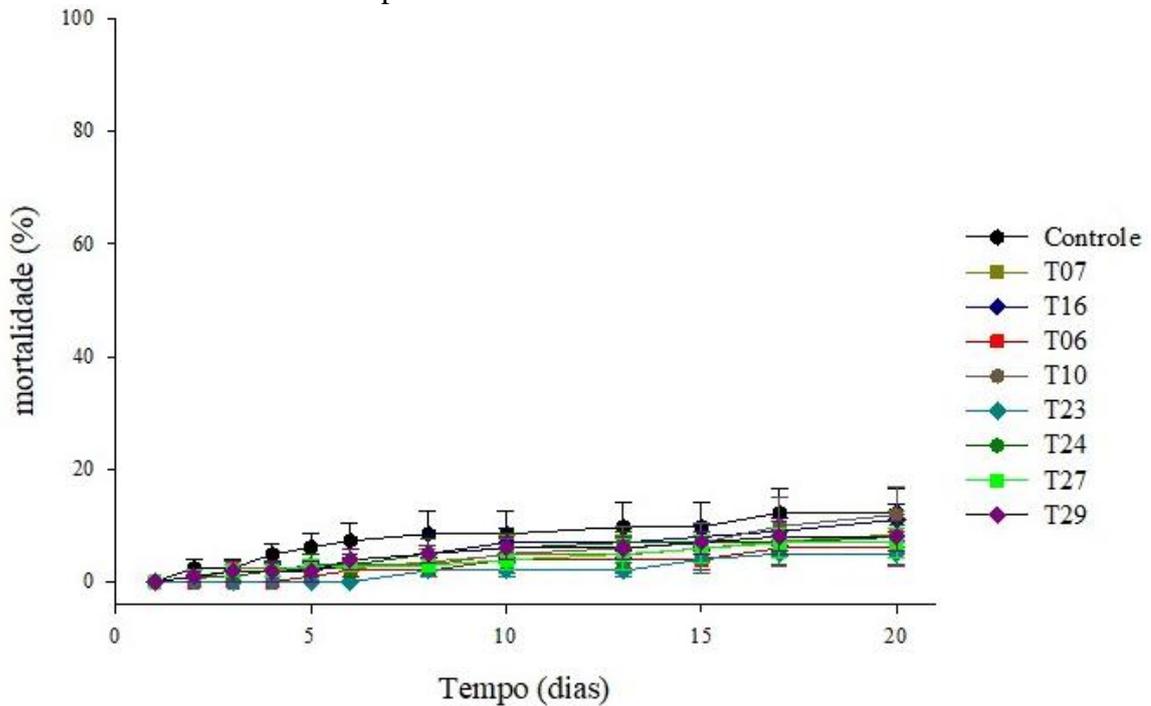
5.4 Efeito da dieta líquida com esporos de Bt em forrageadoras

Não houve diferença significativa na mortalidade de forrageadoras adultas tratadas com cepas de Bt misturadas com dieta líquida em relação ao controle (Log-Rank $\chi^2=7,217$, gl=8, $P=0,845$). (GRÁFICO 5).

Quando se comparou a ingestão das diferentes dietas líquidas contendo os esporos de Bt com o controle negativo contendo H₂O destilada, não houve diferença significativa entre o controle e as demais cepas (cepa [F_(80, 134) = 2,622, $P=0,108$]; dia [F_(20, 134) = 0,169, $P=0,865$]; interação [F_(16, 134) = 728, $P=0,760$]) (GRÁFICO 6). Ficou evidente que as formigas forrageadoras se alimentam igualmente das dietas dos grupos tratados com as cepas Bt e do grupo controle negativo.

A ausência de diferença significativa entre o consumo de dieta líquida, contendo os esporos de Bt, em comparação ao controle negativo (dieta líquida + H₂O) (GRÁFICO 6), pode estar relacionado com o uso da polpa cítrica na formulação da dieta. A polpa cítrica desidratada é um atrativo amplamente utilizado na fabricação de iscas fornecidas a formigas cortadeiras. Além da qualidade nutricional da dieta que é fornecida para as formigas, a polpa cítrica contém diversos componentes, como carboidratos, nitrogênio, vitaminas e micronutrientes, que favorecem o desenvolvimento do jardim de fungos cultivados pelas formigas. Entretanto, essa atratividade está mais relacionada ao uso da polpa cítrica como substrato para o fungo e não para a alimentação direta das formigas. Porém, devido ao fato delas permanecerem em jejum no período pré-ensaio, durante os três primeiros dias do bioensaio as formigas tendem a usar essa dieta fornecida como fonte nutritiva e energética, assim o odor exalado pela polpa cítrica pode ter sido fundamental para mascarar o odor das cepas bacterianas (BRITTO et al., 2016; CARLOS et al., 2010; GUSTANI et al., 2021; TRAVAGLINI; STEFANELLI; ENDRINGER, 2020; VARZA et al., 2006).

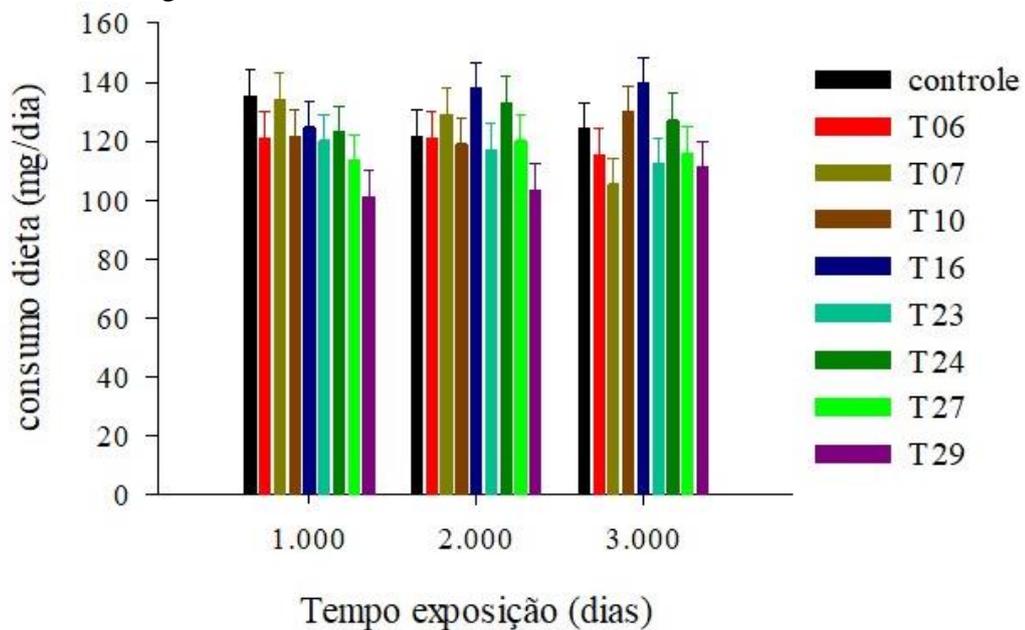
Gráfico 5 - Mortalidade das forrageadoras submetidas à ingestão de dieta líquida contendo os esporos de Bt.



Legenda: Curva de mortalidade de forrageadoras de *A. sexdens* alimentadas com as oito cepas públicas de *B. thuringiensis* em dieta líquida na concentração de 1×10^8 esporos mL^{-1} e o controle negativo com H_2O . Os resultados representam a média de cinco repetições independentes (média \pm erro padrão). Cada repetição consistiu de 20 formigas forrageadoras adultas.

Fonte: Do autor (2022)

Gráfico 6 - Consumo diário de dieta líquida contendo os esporos de Bt e o controle negativo contendo H_2O .



Legenda: Os resultados representam a média das cinco amostras independentes (\pm Erro padrão, SE). Cada repetição consistiu de 20 formigas forrageadoras adultas.

Fonte: Do autor (2022)

Entretanto, foi observado que ao longo do tempo, os esporos de Bt presentes na dieta líquida tendem a se decantar no fundo do recipiente (GRÁFICO 7) (APÊNDICE – FIGURA 4), o que pode influenciar na ingestão das toxinas Bt pelas forrageiras, dessa forma, as forrageadoras foram submetidas também à alimentação por dietas semissólidas contendo os esporos de Bt. A decantação de esporos se ajusta bem ao modelo de decaimento exponencial com dois parâmetros ($F_{(1,12)} = 47,1389$, $P < 0.0001$) onde, a porcentagem inicial de esporos (parâmetro 1) decresce com o tempo numa taxa exponencial (parâmetro 2).

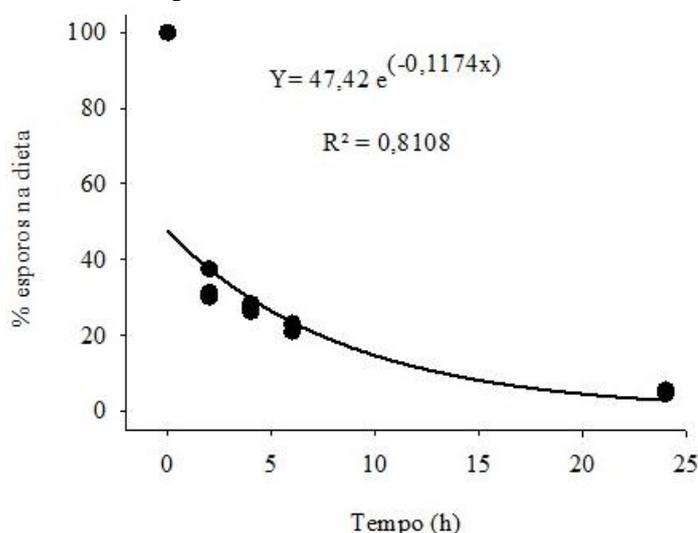
Tabela 2 - Descrição do modelo de decaimento exponencial

Parâmetros estimados	Valor (intervalo de confiança 95 %)	t-valor	P
a	47.42 (31.37-63.47)	6.5029	<0.0001
b	0.117 (0.046-0.188)	3.6535	0.0038

Legenda: Coeficiente do modelo de decaimento exponencial, $y = a \cdot e^{-bx}$. Os parâmetros caracterizam diferentes atributos das curvas, onde a é o valor inicial da variável dependente, b é a assimetria (ou taxa de decaimento) da resposta em função do tempo.

Fonte: Do autor (2022)

Gráfico 7 - Decantação dos esporos de Bt na dieta líquida em função do tempo



Legenda: Os símbolos representam os dados observados enquanto a linha representa os melhores ajustes

Fonte: Do autor (2022).

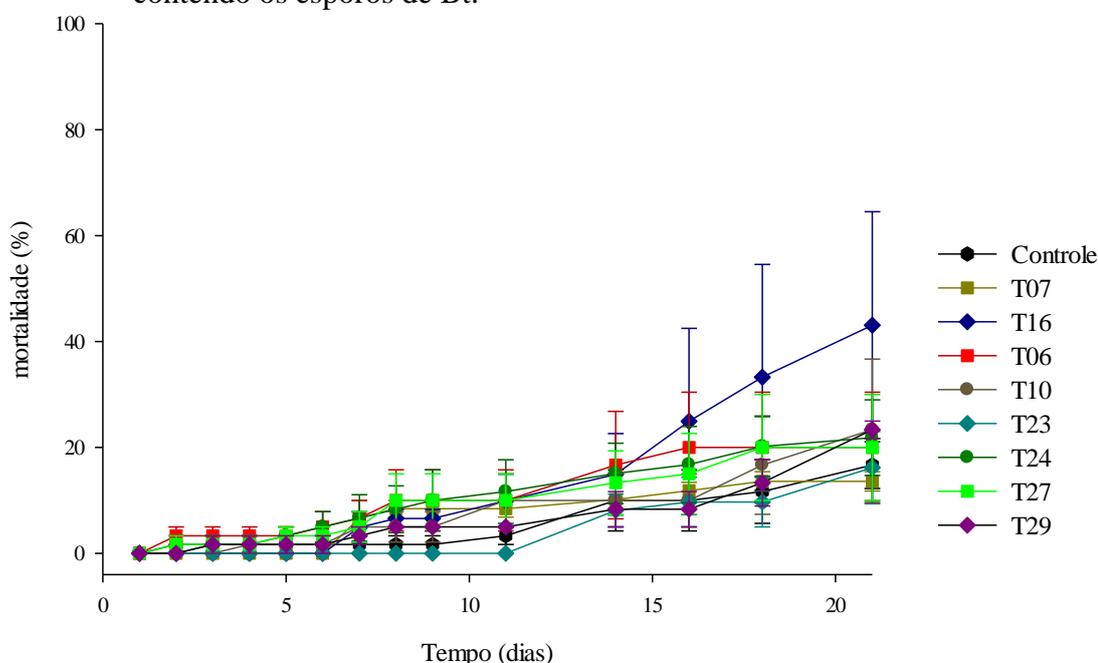
As propriedades físicas dos esporos de Bt podem influenciar no comportamento dessas partículas e a sua interação com as superfícies. O tamanho, a densidade, a morfologia e hidrofobicidade são os principais parâmetros que influenciam no comportamento desses esporos. Essas propriedades podem influenciar na mobilidade dos esporos tanto no ar quanto

na água. Tais propriedades físicas podem ser decorrentes das condições de esporulação das cepas e, assim sendo, podem ser controladas. Estes fatores podem estar influenciando na decantação dos esporos de Bt na dieta líquida (GREENBERG et al., 2010; TUFTS et al., 2014).

5.5 Efeito da dieta semissólida com esporos de Bt em forrageadoras

Não houve diferença significativa na mortalidade de forrageadoras adultas tratadas com dieta semissólida com cepas de Bt na superfície em relação ao controle (Log-Rank $\chi^2=20$, gl=8, $P=0,01$). (GRÁFICO 7). Os dados obtidos com o bioensaio de forrageiras, alimentadas com dieta líquida ou semissólida, contendo os esporos de Bt, indicam que a suscetibilidade das forrageadoras é expressivamente menor quando comparada às larvas. Durante o bioensaio de sobrevivência das forrageadoras com dieta semissólida, foi observado a contaminação do fungo de uma das repetições da cepa T16, por este motivo houve uma discrepância na morte de algumas formigas, influenciando na porcentagem de mortalidade e no erro padrão médio, conforme mostra o gráfico 8. Entretanto, é importante ressaltar que não houve diferença significativa entre a cepa T16 e o controle (Log-Rank $\chi^2=9,915$, gl=8, $P=0,0543$).

Gráfico 8 - Mortalidade das forrageadoras submetidas à ingestão de dieta semissólida contendo os esporos de Bt.



Legenda: Curva de mortalidade de forrageadoras de *A. sexdens* alimentadas com as oito cepas públicas de *B. thuringiensis* em dieta semissólida na concentração de 1×10^8 esporos mL^{-1} e o controle negativo com H_2O . Os resultados representam a média de três repetições independentes (média \pm erro padrão). Cada repetição consistia em 20 formigas forrageadoras adultas.

Fonte: Do autor (2022).

Em formigas adultas do gênero *Acromyrmex* tratadas tanto com dietas líquidas como com dietas sólidas foi observada diferença significativa na mortalidade desses insetos. Dentre os isolados de *B. thuringiensis* testados Bt-H48 e Bt-H58 apresentaram a melhor eficiência de mortalidade com 100% e 80% de mortalidade dos alvos da população observada (PINTO *et al.*, 2003). Já foi verificado, em formigas-faraó (*Monomorium pharaonis* – tribo Solenopsidini), que a cepa de Bt PS86Q3 causou 83% de toxicidade nos indivíduos adultos (PAYNE *et al.*, 1997).

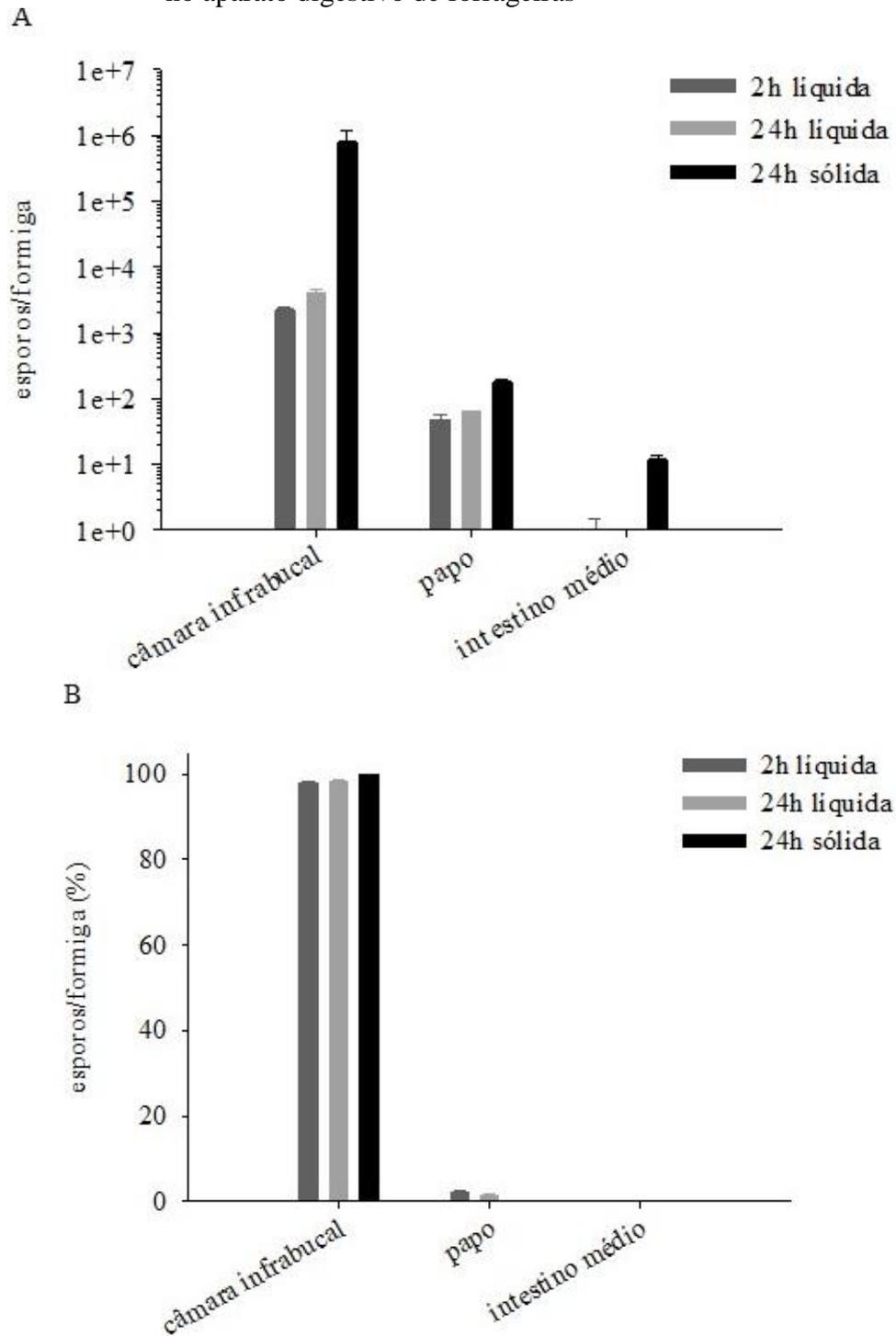
5.6 Acúmulo dos esporos de Bt nos órgãos das forrageiras

O gráfico 9a nos mostra a acumulação dos esporos nos órgãos das formigas em escala logarítmica, enquanto o gráfico 9b mostra os dados em termos de porcentagem. Após duas horas de ingestão de dieta líquida, 97,89 % dos esporos (2277 ± 177) ficam retidos na câmara infrabucal, 2,08 % dos esporos foram observados no papo ($48,14 \pm 7,84$) e apenas 0,028 % no intestino médio ($0,74 \pm 0,74$) (GRÁFICO 9). Para o tempo de 24h de ingestão de dieta líquida, a maior quantidade de esporos ficou retidas na câmara infrabucal (98,46 %, 4109 ± 360), uma quantidade similar de esporos foi observada no papo (1,53 %, $62,96 \pm 2,96$), porém não foram observados esporos no intestino médio. A ingestão de dieta semissólida, por 24 horas mostrou que a quantidade de esporos retida na câmara infrabucal foi 196,49 vezes maior (807440 ± 38388 esporos/formiga) que quando as formigas ingeriram dieta líquida, mas foi similar em termos relativos com 99,49 %. Esta maior quantidade de esporos retidos na câmara infrabucal é refletido também na menor quantidade de esporos observados no papo (0,048 %, $179,26 \pm 18,16$) e no intestino médio (0,003 %, $11,85 \pm 1,96$). Ficou evidente que a maioria dos esporos ingeridos são provenientes das dietas semissólidas contendo as suspensões bacterianas. Ficou evidente que a grande maioria dos esporos ficam retidos na câmara infrabucal, mesmo após 24 horas da ingestão, reforçando a hipótese de que essa estrutura anatômica das formigas adultas dificulta a chegada das protoxinas no intestino médio, onde ocorreria a solubilização, a ativação das toxinas e a ligação aos receptores de membrana. É importante ressaltar que após os esporos passarem pela câmara infrabucal eles seguiriam a via até o intestino, ou seja, os esporos presentes no papo chegariam no intestino após esse período de observação. Entretanto, quando se observa em termos de porcentagem (GRAFICO 9b) é inexpressivo o acúmulo de esporos no intestino médio.

As formigas ingerem maior porção dos esporos de Bt com a dieta semissólida, fazendo com que uma quantidade superior desses esporos fique retido na câmara infrabucal. Desta

forma, as formigas ficam menos expostas aos esporos de Bt, já que uma pequena quantidade atinge o sistema digestivo incluindo o intestino médio onde as proteínas alvo de Bt se encontram.

Gráfico 9 - Acúmulo de esporos provenientes de dieta líquida e semissólida no aparato digestivo de forrageiras



Legenda: Acúmulo de esporos no sistema digestivo de formigas forrageadoras adultas. (A) Dados representados em escala logarítmica e (B) em escala de porcentagem. Os resultados

representam a média de três repetições independentes (média \pm erro padrão). Cada repetição consistia em 12 formigas forrageadoras adultas.

Fonte: Do autor (2022)

A cavidade infrabucal é fundamental para as formigas filtrarem partículas sólidas durante a ingestão dos alimentos. Para evitar contaminações no jardim de fungo que cultivam e também infecções é comum que as formigas armazenem microrganismos na cavidade infrabucal. Posteriormente, essas partículas são descartadas em forma de *pellets* em uma pilha de dejetos. Foi verificado que os *pellets* eliminados por formigas cortadeiras contêm esporos do fungo parasita de seu fungo simbionte e esporos de outros microrganismos. Já foi observado que a grande maioria dos esporos de *Escovopsis*, fungo parasita que ataca as colônias de formigas cortadeiras, ficam retido na câmara infrabucal das formigas e são descartados no lixo da colônia. Os esporos desse fungo possuem tamanho similar aos esporos de *B. thuringiensis*. As formigas utilizam o comportamento de “*grooming*” e “*weeding*” como método de proteção das colônias: elas utilizam as antenas para detectar esporos de *Escovopsis*, em seguida depositam-nos na câmara infrabucal e posteriormente esses esporos são descartados. (CURRIE et al 2006; CURRIE; STUART; 2001; EISNER; HAPP, 1962; GÓMEZ, 2017; LITTLE et al., 2003; QUINLAN; CHERRETT 1978).

A presença da câmara infrabucal em formigas forrageadoras adultas é um fator que dificulta o controle desses insetos. Nesse sentido, estratégias como a solubilização e ativação das proteínas de Bt podem ser uma alternativa para o fornecimento das toxinas em dieta formuladas. Mandla et al., (2018) observaram que a solubilização e a ativação de toxinas Cry7 e Cry9 da cepa HD-1 com tripsina foram suficientes para provocar até 80% de mortalidade em *Aphis gossypi* (Hemiptera: Aphididae), enquanto que em condições normais essas toxinas causaram 30% de mortalidade. Uma vez comprovado a eficiência das estratégias de solubilização e ativação das protoxinas, alternativas como a termonebulização e a pulverização de biopesticidas formulados à base *B. thuringiensis* podem começar serem testados a nível de campo, desta forma, será possível agregar ao manejo integrado dessas pragas florestais protocolos mais sustentáveis, garantindo a eficiência do controle biológico da formiga *A. sexdens*.

6 CONCLUSÃO

As larvas de *Atta sexdens* mostraram diferentes níveis de sensibilidade a todas as cepas de *Bacillus thuringiensis* testadas, sendo que as cepas T06, T16 e T24 foram as mais eficientes em causar a mortalidade das larvas. A cepa T24 foi mais eficiente no controle de larvas de *A.*

sexdens em termos de porcentagem de Mortalidade e na Concentração Letal Média, entretanto, não se diferenciou da T06 quanto ao Tempo Letal Médio. Por outro lado, apesar das formigas forrageadoras ingerirem maior quantidade de esporos de Bt em dietas semissólidas quando comparada às dietas líquidas, elas não apresentaram sensibilidade às cepas de *B. thuringiensis* testadas no experimento, pois a grande maioria dos esporos-cristais ingeridos pelas forrageadoras ficam retidos na câmara infrabucal, dificultando sua chegada ao intestino médio desses insetos adultos. À vista disso, as cepas de Bt são eficientes no controle biológico das larvas de formigas cortadeiras e o fornecimento das toxinas Bt já solubilizadas e ativadas para as forrageadoras poderá ser uma alternativa viável para efetivar o controle dessas forrageadoras adultas, entretanto há a necessidade de novos estudos para confirmar essa viabilidade.

REFERÊNCIAS

- ANJOS et al., Manejo integrado de formigas cortadeiras em reflorestamento. In: DELLA-LUCIA, T. M. C. (Ed.). **As formigas cortadeiras**. Ed. Folha de Viçosa, p. 212-241, 1993. Disponível em: < <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=INIA.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=034523>>. Acesso em: 10 abr. 2021.
- ARMITAGE, S.; BOOMSMA, J.; BAER, B. Diploid male production in a leaf-cutting ant. **Ecological entomology**, v. 35, n. 2, p. 175-182, 2010. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2311.2009.01167.x?casa_token=81YHlwUvJZ0AAAAA%3AY9pKV__MK28Yw7zfP6njQtsysJ4qwiaaOxjsiZiA86fpimCSZW6wENyZrchroqleQEdfl5h-BBZ1cPRw>. Acesso em: 29 abr. 2021.
- AUGUSTIN, J.O.; LOPES, J.F.S. Feeding behavior of *Atta Sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) queens during establishment of new colonies in laboratory. XVIII Simpósio de Mirmecologia, v. 69, suplemento 2, p. 379-383 [**Anais**], São Paulo, SP: Biológico, 2007. Disponível em: <http://biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/docs/bio/suplementos/v69_supl_2/p379-383.pdf>. Acesso em: 14 abr. 2021.
- AUTUORI, M. Investigações sobre a biologia da saúva. **Ciência e Cultura**, v.1,n.1-2, p.4-12, 1949. Disponível em: <<http://cienciaecultura.bvs.br/pdf/cic/v62nspe1/v62nspe1a02.pdf>>. Acesso em: 27 abr. 2021.
- BASS, M.; CHERRETT, J. M. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **Physiological Entomology**, v.20, p.1-6, 1995. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-3032.1995.tb00793.x>>. Acesso em: 27 abr. 2021.
- BOARETTO, M. A. C.; FORTI, L. C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. **Série técnica IPEF**, v. 46, p. 31-46. Disponível em: <<https://www.ipef.br/PUBLICACOES/stecnica/nr30/cap3.pdf>>. Acesso em: 21 mar. 2021.
- BOLTON, B. AntCat: **an online Catalog of the Ants of the world**, 2021. Disponível em: <<https://antcat.org>>. Acesso em: 06 abr. 2021.
- BOURGUET, D. et al., *Ostrinia nubilalis* parasitism and the field abundance of non-target insects in transgenic *Bacillus thuringiensis* corn (*Zea mays*). **Environmental Biosafety Res.** v. 1 2002. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/services/aop-cambridge-core/content/view/AAF5B7C9E72C52FEB3A7E8B006FA505F/S1635792202000052a.pdf/ostrinia_nubilalis_parasitism_and_the_field_abundance_of_nontarget_insects_in_transgenic_bacillus_thuringiensis_corn_zea_mays.pdf>. Acesso em: 02 abr. 2021.
- BOURKE, A. Social Evolution: daily self-sacrifice by worker ants. **Current Biology**, v. 18, n. 23, 2018. Disponível em:<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19081045/>>. Acesso em: 06 abr. 2021.
- BUENO, I. **Dinâmica de crescimento do fungo simbiote e estruturação de castas em formigas-cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae: Atta)**. 2020, p. 51. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2020. Disponível em:

<<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11146/tde-07052020-094738/en.php>>. Acesso em: 05 abr. 2021.

BROWN JR., W. 2000. Diversity of ants. *In*: AGOSTI, D. et al., (Eds.). **Ants: standard methods for measuring and monitoring biodiversity**. Washington, Smithsonian Institution Press, p.45-79. Disponível em:

<https://www.researchgate.net/publication/216849738_Ants_standard_methods_for_measuring_and_monitoring_biodiversity_Smithsonian_Institution_Press_Washingt>. Acesso em: 12 abr. 2021.

CANNON, C.A. Nutricional Ecology of the Carpenter Ant *Camponotus pennsylvanicus* (De Geer): Macronutrient Preference and Particle Consumption. 1998, p. 158. Dissertação (Doutorado em Fisiologia e Entomologia) Universidade do Estado da Virgínia. 1998.

CAPALBO, M. F. et al., *Bacillus thuringiensis*. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, n. 34, 2005. Disponível em:

<<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/15480/1/2005AP043.pdf>>. Acesso em: 28 abr. 2021.

CATALANI, G. C. **Estudos comportamentais e Mecanismo de contaminação em colônias da formiga cortadeira *Atta sexdens* (Hymenoptera, Formicidae)** Tese de Doutorado (Agronomia – Proteção de Plantas) Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2020

COUTO, L. et al. Avaliação da eficiência e custo do controle de *Atta sexdens* rubropilosa através do sistema termo-nebulizador, na região de Aracruz, ES. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 2, n. 2, p. 8-16, 1978.

CHERRETT, J. M. History of the leaf-cutting ant problem. *In*: LOEFGREN, C.S.; VANDER MEER, R. K. (Eds.). **Fire Ants and Leaf-Cutting Ants: Biology and Management**. Boulder, Westview Press. p.10-17, 1986. Disponível em:

<<https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=xFwPEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Fire+Ants+and+Leaf-Cutting+Ants:+Biology+and+Management.&ots=EkwkbsKl2g&sig=5QfQAFYZevyn4o8Jrm7dKbvNJEc#v=onepage&q=Fire%20Ants%20and%20Leaf-cutting%20Ants%3A%20Biology%20and%20Management.&f=false>>. Acesso em 14 abr. 2021.

CHITTKA, A.; WURM, Y.; CHITTKA, L. Epigenetics: The Making of Ant Castes. **Current Biology**, v. 22, n, 19, p. 835-838, 2012. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982212008706>>. Acesso em: 07 abr. 2021.

CRUZ, A.P.; ZANUNCIO, J.C.; ZANETTI, R.E. Eficiência de cebos granulados a base de sulfluramida o de clorpirifós en el control de *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera: Formicidae) en el trópico húmedo. **Revista Colombiana de Entomología**, v.26, p.67-69, 2000.

CURRIE, C.R.; STUART, A. E Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. **Proc R Soc Lond**, v. 268, p. 1033–1039, 2001.

DELABIE, J. H. C. *Atta silvai* Gonçalves, sinônimo júnior de *Atta laevigata* (Fr.Smith) (Hymenoptera; Formicidae; Attini). **Revista Brasileira de Entomologia**, v.41, p.339-341, 1998.

DELLA LUCIA, T. M. C. et al. Perda de peso de rainhas de *Atta* durante a fundação eo estabelecimento das colônias. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 55, n. 4, p. 533–536, 1995.

- DELLA-LUCIA, T. M. C. Hormigas de importancia económica en la región Neotropical. In: FERNÁNDEZ, F. (Ed), *Indrotucción a las hormigas de la región Neotropical*, Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, p. 337-349, 2003. Disponível em: <https://paulants.com.mx/wp-content/uploads/2020/12/INTRODUCCION_Hormigas_Neotropical.pdf>. Acesso em: 14 abr. 2021.
- DELLA-LUCIA, T. M. C. Espécies de formigs cortadeiras no Brasil. In: **As formigas cortadeiras**. Ed. Folha de Viçosa, p. 26-31. Disponível em: <<http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=INIA.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mf=034523>>. Acesso em: 10 abr. 2021
- DELLA LUCIA, T M C; BENTO, J. M. S. Voo nupcial ou revoada. In: DELLA LUCIA, T M C. (Ed). **As formigas-cortadeiras**. Viçosa, MG: Editora Folha de Viçosa, 1993, p. 54-59, 1993.
- DELLA LUCIA, T M C; SOUZA, D J. Importância e história de vida das formigas-cortadeiras. *Formigas-Cortadeiras da biotecnologia ao manejo*. Editora UFV. Viçosa, Brasil, p. 13–26, 2011.
- DELLA LUCIA, T. M. C. et al. Fundação e estabelecimento de formigueiros. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Org.). *Formigas-Cortadeiras da Bioecologia ao Manejo*. 1ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2011, v. 1, p. 173-188.
- DIEHL-FLEIG, E. Efficiency of *Beauveria bassiana* for *Acromyrmex* spp. control (Hymenoptera: Formicidae). **Anais-Sociedade Entomologica do Brasil**, v. 22, n. 2 p. 281-281, 1993.
- DONOVAN W. P. et al., Discovery and characterization of Sip1A: a novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran larvae. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 2006 v. 72, p. 713–719. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16489451>>. Acesso em: 02 abr. 2021.
- EISNER, T.; HAPP, G. M. The infrabuccal pocket of a formicine ant: a social filtration device. **Psyche**, v. 69, p. 107–116, 1962.
- EVISON, S. E. F.; HUGHES, W. O. H. Genetics caste polymorphism and the evolution of polyandry in *Atta* leaf-cutting ants. **Springer**, v. 98, p. 643-649, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21656003/>>. Acesso em: 28 abr. 2021
- FARJI-BRENER, A. G.; TADEY, M. Trash to treasure: Leaf-cutting ants repair nest-mound damage by recycling refuse dump materials. **Behavioral Ecology**, v. 23, n. 6, p. 1195–1202, 2012.
- FERGUSON-GOW, H.; SUMNER, S.; BOURKE, A. F. G. Colony size predicts division of labour attine ants. **Proceeding of the Royal society B**. v. 281: 20141411, 2014. Disponível em: <[https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rspb.2014.1411#:~:text=Using%20a%20statistically%20robust%20phylogenetic,worker%20dimorphism\)%20division%20of%20labour.>](https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rspb.2014.1411#:~:text=Using%20a%20statistically%20robust%20phylogenetic,worker%20dimorphism)%20division%20of%20labour.>)>. Acesso em: 06 abr. 2021.
- FORTI, L. C.; ANDRADE, A. P. P. 1999. Ingestão de líquidos por *Atta sexdens* (L.) (Hymenoptera: Formicidae) durante a atividade forrageira e na preparação do substrato em condições de laboratório. **Naturalia**, v.24, p.61-63.

FORTI, L. C.; BOARETTO, M. Ap C. Formigas cortadeiras: biologia, ecologia, danos e controle. **Botucatu: Departamento de Defesa Fitossanitária, Universidade Estadual Paulista, 61p**, 1997.

FOWLER, H. G.; FORTI, L. C.; PEREIRA DA SILVA, V. Economics of grasscutting ants. In: LOEFGREN, C. S.; VANDER MEER, R. K. (Eds.). **Fire Ants and Leaf-Cutting Ants: Biology and Management**. Boulder, Westview Press. p.18-35. 1986. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=xFwPEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Fire+Ants+and+Leaf-Cutting+Ants:+Biology+and+Management.&ots=EkwkbsKl2g&sig=5QfQAFYZevyn4o8Jrm7dKbvNJEc#v=onepage&q=Fire%20Ants%20and%20Leaf-Cutting%20Ants%3A%20Biology%20and%20Management.&f=false>>. Acesso em 14 abr. 2021.

FOWLER, H. G.; CLAVER Leaf-cutter assemblies: effects of latitude, vegetation and behaviour. In: HUXLEY, C.R.; CUTLER, D. F. (Eds.), **Ant-Plant Interactions**. Oxford, Universidade de Oxford. Press, p. 51-59, 1991. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Brian-Fisher-2/publication/262918332_Symbiosis_of_ants_with_Cecropia_as_a_function_of_light_regime/links/00b7d539df68f32226000000/Symbiosis-of-ants-with-Cecropia-as-a-function-of-light-regime.pdf>. Acesso em: 15 abr. 2021

FEITELSON, J.S.; PAYNE, J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis*: Insects and Beyond. **Nature biotechnology**, Reino Unido, v. 10. p. 271-275. 1992. Disponível em:<<https://www.nature.com/articles/nbt0392-271>>. Acesso em: 02 abr. 2021.

GILLOT, C. **Entomology**. New York: Plenum, p. 729, 1980. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=latCAAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR15&dq=Entomology&ots=65elGzNAOq&sig=O-4fHpi5RWfn-pRT2ALO3WEg1Hk#v=onepage&q=Entomology&f=false>>. Acesso em 30 mar. 2021.

GLANCEY, B. M.; VANDER MEER, R. K.; GLOVER, A.; LOFGREN, C. S., VINSON, S. B. Filtration of microparticles from liquids ingested by the red imported fire ant *Solenopsis invicta* Buren. **Insectes Sociaux**, v.28, n.4, p.395-401. 1981. Disponível em: <<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF02224196.pdf>>. Acesso em: 12 abr. 2021.

GREENBERG, D. L., Identifying experimental surrogates for *Bacillus anthracis* spores: a review. **Investig Genet**, v. 1, n.4, 2010.

GUIMARÃES, M. R. F. **Polietismo e expectative de vida em operárias de *Atta laevigata***. 2010, p. 49. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010. Disponível em: <<https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/3901>>. Acesso em: 07 abr. 2021.

HAMMER, T. J.; MORAN, N. A. Links between metamorphosis and symbiosis in holometabolous insects. **The Royal Society**. B 374: 20190068. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2019.0068>

HART, A. G.; RATNIEKS, F. L. W. Waste management in the leaf-cutting ant *Atta colombica*. **Behavioral Ecology**, v. 13, n. 2, p. 224–231, 2002.

HÖLLDOBLER, B. & WILSON, E. O., 1990. **The Ants**. Harvard University Press, USA, 732p.

HOFTE, H.; WHITELEY H. R., Insecticidal Cristal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology and Molecular Biology**. Estados Unidos v. 53, n. 2. p. 242-255, jun. 1989. Trimestral. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC372730/>>. Acesso em: 02 abr. 2021.

- INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES – IBÁ. **Relatório IBÁ 2017**, p. 80 São Paulo: IBÁ. Disponível em: <https://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2017.pdf>. Acesso em: 01 abr. 2021.
- IBGE, **Extração vegetal e Silvicultura**. Brasil 2018. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/16/0>>. Acesso em: 04 abr. 2021.
- ISAAA Global status of commercialized biotech/GM crops in 2017: biotech crop adoption surges as economic benefits accumulate in 22 years. ISAAA brief no. 53. ISAAA, Ithaca, NY Jenkins JL, Lee MK, Valaitis AP, Curtiss A, Dean DH (2000) Bivalent sequential binding model of a *Bacillus thuringiensis* toxin to gypsy moth aminopeptidase N receptor. **Journal of Biological Chemistry** 275:14423–14431, 2017. Disponível em: <<https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/53/download/isaaa-brief-53-2017.pdf>>. Acesso em: 29 abr. 2021.
- JIMÉNEZ, N. L. et al. Economic injury Level and Economic Threshold as required by Forest Stewardship Council for management of leaf-cutting ants in forest plantation. **Agricultural and Forest Entomology**, v, 23, p. 87-96, 2021.
- JURAT-FUENTES, J. L.; HECKEL, D. G.; FERRÉ, J. Mechanisms of resistance to insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, v. 66, p. 121-140. 2021. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev-ento-052620-073348#article-denial>>. Acesso em: 17 abr. 2021.
- KATO, N., Glucosamine:fructose-6- phosphate aminotransferase: gene characterization, chitin biosynthesis and peritrophic matrix formation in *Aedes aegypti*. **Insect Mol. Biol**, v. 11 p. 207-216, 2002.
- LACERDA, M. L; SIMÕES, Z. L. P. Ovos produzidos por rainhas e operárias de *Scaptotrigona depilis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponina): morfometria e aspectos relacionados. **Ilheringia, Série Zoológica**, v. 96, n. 1, p. 89-93, Porto Alegre, 2006.
- LANDERS, J. N.; OLIVEIRA, H. N. de Controle Biológico: o próximo pulo do gato. **Revista Plantio Direto & Tecnologia Agrícola**, ed. 162, 2018. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1092714/1/RevistaPlantiodireto1.pdf>>. Acesso em: 28 abr. 2021.
- LEWIS, T.; NORTON, G. An aerial bating to control leaf-cutting ants (Formicidae: Attini) en Trinidad. **Bull. Entomol. Res**, v. 63, p. 289–303, 1973.
- LI, J; CARROL, J; ELLAR, D. J. Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å Resolution. **Nature**. 1991. v. 353, p. 815-821. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1658659>>. Acesso em: 06 abr. 2021.
- LITTLEDYKE, M.; CHERRETT, J. M. Direct ingestion of plant sap from cut leaves by the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosu* (Reich) (Formicidae, Attini). **Bulletin of Entomological Research**, v.66, p.205-217. 1976. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/journals/bulletin-of-entomological-research/article/abs/direct-ingestion-of-plant-sap-from-cut-leaves-by-the-leafcutting-ants-atta-cephalotes-l-and-acromyrmex-octospinosus-reich-formicidae-attini/AF32CE2FBB06C93D5FC3DE8287B1777>>. Acesso em: 15 abr. 2021.
- MACHADO, D. H. B. *Bacillus thuringiensis* e RNA interferente como ferramenta de controle da formiga cortadeira *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae). 2020. 58 p.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2020.

MANDIC-MULEC, I., STEFANIC, P., ELSAS, J.D.V., Ecology of Bacillaceae.

Microbiology Spectrum (2015). Disponível em:

<https://www.researchgate.net/publication/274696522_Ecology_of_Bacillaceae>. Acesso em: 02 abr. 2021.

MARICONI, F. A. M. **As saúvas**. São Paulo, Editora Agronômica Ceres. 167 pp. 1970.

Disponível em: <<http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=ACERVO.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=055875>>.

Acesso em: 27 abr. 2021.

MARSARO JÚNIOR, A. L. Preferência de corte de *Eucalyptus* spp. Por *Acromyrmex laticeps nigrosetosus* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) em condições de laboratório. **Ciência Florestal**, v. 17, n. 2, Santa Maria, 2007. Disponível em:

<https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1980-50982007000200171&script=sci_arttext&tlng=pt>.

Acesso em 27 abr. 2021.

MATRANGOLO, C. A. R. et al. Crescimento de eucalipto sob efeito de desfolhamento artificial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 9, Brasília, 2010. Disponível em:

<https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-204X2010000900003&script=sci_arttext>.

Acesso em: 27 abr. 2021.

Mendoza-Almanza, G., Esparza-Ibarra, E. L., Ayala-Luján, J. L., Mercado-Reyes, M., Godina-González, S., Hernández-Barrales, M., et al. (2020). The cytotoxic spectrum of *Bacillus thuringiensis* toxins: from insects to human cancer cells. **Toxins (Basel)** 12, 301. doi: 10.3390/toxins12050301

MOTA FILHO, T.M.M. Contamination routes and mortality of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) by the insecticides fipronil and sulfluramid through social interactions. **Pest Manag. Sci.** 77, 4411–4417. 2021 doi:10.1002/ps.6475

MUELLER, U.G.; REHNER, S.A.; SCHULTZ, T.R. The Evolution of Agriculture in Ants. **Science**, v. 281, 1998. Disponível em:

<[https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9748164/#:~:text=Cultivation%20of%20fungi%20for%20food,primitive"%20fungus-growing%20ants.](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9748164/#:~:text=Cultivation%20of%20fungi%20for%20food,primitive)>. Acesso em: 05 abr. 2021.

NICKELE, M. A. Potential damage by *Acromyrmex* ant species in pine plantations in southern Brazil. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 23, p. 32-40, 2020.

OHBA, M.; MIZUKI, E.; UEMORI, A. Parasporin, a New Anticancer Protein Group from *Bacillus thuringiensis*. **Anticancer Research**, Highlands, n 29, p 427-434, 2009. Disponível em: <<http://ar.iijournals.org/content/29/1/427.full.pdf+html>>. Acesso em 02 abr. 2021.

OLIVEIRA, H. G. de et al., Atratividade de *Atta sexdens rubropilosa* por plantas de eucalipto atacadas previamente ou não por *Thyreoxena arnobia*. **Revista Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 3, Brasília, 2004. Disponível em:

<[https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2004000300012#:~:text=Oliveira%20\(2003\)%20observou%20que%20plantas,em%20relação%20às%20plantas%20intactas.](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2004000300012#:~:text=Oliveira%20(2003)%20observou%20que%20plantas,em%20relação%20às%20plantas%20intactas.)>.

Acesso em: 01 abr. 2021.

OLIVEIRA, M. A. de The simulated effect of Defoliation in the Growth of the *Eucalyptus grandis*. **Chemical Engineering Transactions**, v. 39, p. 1543-1548, 2014. Disponível em:

<https://www.researchgate.net/publication/306222958_The_Simulated_Effect_of_Defoliation_in_the_Growth_of_the_Eucalyptus_grandis>. Acesso em: 30 mar. 2021.

- ORTIZ, G. **Evolução do Sistema Reprodutivo de Formigas da Tribo Attini (Hymenoptera: Myrmicinae): Análise das Espermatecas**. 2007, p 147. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/100541/ortiz_g_dr_rcla.pdf?sequence=1>. Acesso em: 29 mar. 2021.
- OSTER, G. F.; WILSON, E. O. **Caste and ecology in the social insects**, ed 12 Princeton University Press, p. 372, 1978. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=aeI9DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR7&dq=Caste+and+ecology+in+the+social+insects&ots=Y4yFx31Yps&sig=oI5eTcSzEzr2M7Hm6kxLYYTh9I8#v=onepage&q=Caste%20and%20ecology%20in%20the%20social%20insects&f=false>>. Acesso em: 05 abr. 2021.
- OVERTON, K. et al., Toxicity of insecticides and miticides to natural enemies in Australian Grains: a review. **Insects**, v. 12, n. 2, 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2075-4450/12/2/187>>. Acesso em: 28 abr. 2021.
- PALMA, L. et al., *Bacillus thuringiensis* toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. **Toxins**, Basel, n. 6, p. 3296-3325, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25514092>>. Acesso em: 02 abr. 2021.
- PETRALIA, R. S.; VINSON, S. B. Comparative anatomy of the ventral region of ant larvae, and its relation to feeding behavior. **Psyche**, v.86, p.375-394, 1979. Disponível em: <Comparative anatomy of the ventral region of ant larvae, and its relation to feeding behavior>. Acesso em: 19 abr. 2021
- PIETRO-SAMNSÓNOV, D.L; VÁZQUEZ-PADRÓN, R.I.; AYRA-PARDO, C.; GONZÁLES-CABRERA, J.; RIVA, G. A. de la. *Bacillus thuringiensis*: from biodiversity to biotechnology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Havana, v. 19, p. 202-219, 1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9418060>>. Acesso em 04 abr. 2021.
- PISA, L. et al., An update of the worldwide integrated Assessment (WIA) on sistemic inseticides. Part 2: impacts on organisms and ecosystems. **Springer**, v. 28, p. 11749-11797, 2017. Disponível em: <<file:///C:/Users/Alisson/Documents/Academia/Pós-Graduação/Mestrado%20UFPA/LCBM/Dissertação/Projeto%20formigas/papers/Formigas/pisa%20et%20al.pdf>>. Acesso em: 28 abr. 2021
- POHARE, M. B.; WAGH, S.G.; UDAYASURIYAN, V. *Bacillus thuringiensis* as Potencial Biocontrol Agent for Sustainable Agriculture. In: YADAV, A. et al., Current Trends in Microbiological Biotechnology for Sustainable Agriculture. **Environmental and Microbial Biotechnology**, p. 439-468, 2020. Disponível em: <>. Acesso em: 08 abr. 2021.
- POLANCZYK RA; PRATISSOLI D; VIANNA UR; OLIVEIRA RGS; ANDRADE GS. 2006. Interação entre inimigos naturais: Trichogramma e *Bacillus thuringiensis* no controle biológico de pragas agrícolas. **Acta Scientiarum Agronomy** 28: 233-239. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/240828791_Interacao_entre_inimigos_naturais_Trichogramma_e_Bacillus_thuringiensis_no_controle_biologico_de_pragas_agricolas_-_DOI_104025actasciagronv28i21101>. Acesso em: Acesso em 04 abr. 2021.
- QUINLAN, R. J.; CHERRETT, J. M. Studies on the role of the infrabuccal pocket of the leaf-cutting ant *Acromyrmex oc-tospinosus* (Reich) (Hym. Formicidae). **Insects Soc**, v. 25, p. 237–245, 1978.
- RIBEIRO, G.T.; WOESSNER, R.A. Efeito de diferentes níveis de desfolha artificial, para avaliação de danos causados por saúvas (*Atta spp.*) em árvores de *Gmelina arborea* Linnée e

de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* Barr. e Golf. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 9, p. 261–272, 1980.

ROLIM, G. DA S. et al. Side effects of *Bacillus thuringiensis* on the parasitoid *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 189, n. May 2019, 2020.

RYTTER, W.; SHIK, J. Z. Liquid foraging behaviour in leafcutting ants: The lunchbox hypothesis. **Anim Behav**, v. 117, p. 179-186, 2016. Doi: 10.1016/j.anbehav.2016.04.022.

SAHAY, H. et al., Hot springs of Indian Himalayas: potential sources of microbial diversity and thermostable hydrolytic enzymes. **3 Biotech**, v. 7, p. 1–11, 2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s13205-017-0762-1>>. Acesso em: 29 abr. 2021.

SAJID, M. G. Whole genomic analysis of *Bacillus thuringiensis* revealing partial genes as a source of novel Cry toxins. **Appl Microbiol Biotechnol** 84:e00277–e00218, 2018. Disponível em: <<https://aem.asm.org/content/84/14/e00277-18.short>>. Acesso em: 30 abr. 2021.

SAKAGAMI, S. F. Stingless bees. In: HERMANN, R. H. ed. **Social insects**. New York, Academic Press. v.3, p.316-423, 1982.

SAKAGAMI, S. F. & ZUCCHI, R. Oviposition process in a stingless bee *Trigona* (*Scaptotrigona*) *postica* Letr. (Hymenoptera). **Studia Entomologica** 6(1/4):497-510, 1963.

SALIN, M.; BAKHSH, A.; GÖKÇE, A. Stacked insecticidal genes in potatoes exhibit enhanced toxicity against Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Plant Biotechnology Reports**, v. 96, n. 7, 2021. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11816-021-00668-3#citeas>>. Acesso em: 15 abr. 2021.

SANSINENEA, E. Discovery and Description of *Bacillus thuringiensis*. In: SANSINENEA, E. (Ed.). **Bacillus thuringiensis Biotechnology**. Puebla: Springer, 2012. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-3021-2_1#citeas>. Acesso em: Acesso em 04 abr. 2021.

SCHNEPF H.E, WHITELEY H.R. Cloning and expression of the *B. thuringiensis* protein gene in *E. coli*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 78:2989–2897, 1981.

SCHNIDER, M. de O. **Comportamento de cuidado da prole da Saúva-Limão *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera, Formicidae)**. 2003, p. 86. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2003. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/88529>>. Acesso em: 29 mar. 2021.

SCHREIBER, J. R. Isolation of Attini brood from the social environment (Hymenoptera: Formicidae). **Entomological News**, v.85, n.9-10, p.303-314, 1974. Disponível em: <<https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302767125>>. Acesso em: 02 abr. 2021.

SILVA, A. de S. **Nível de dano econômico para *Atta* spp. (Hymenoptera: Formicidae) em eucaliptais, em região de Mata Atlântica do Vale do Rio Doce, Minas Gerais**, 2008, p. 66, Tese (Doutorado em Entomologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008. Disponível em:

<http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/1822/1/TESE_Nível%20de%20dano%20econômico%20para%20Atta%20spp.%20%28Hymenoptera%20Formicidae%29%20em%20eucaliptais%2C%20em%20região%20de%20Mata%20Atlântica%20do%20Vale%20do%20Rio%20Doce%2C%20Minas%20Gerais..pdf>. Acesso em: 27 abr. 2021.

SILVA, A de C. et al. O pH fisiológico do sistema digestivo de formigas cortadeiras forrageadoras é capaz de afetar a estabilidade do mecanismo de RNAi? **Anais do XXXIV Congresso de Iniciação Científica da UFLA**. XXXIV Congresso de Iniciação Científica da UFLA. 2021

SOMMEIJER, M. J.; VAN ZEIJL, M. & DOHMEN, M. R. Morphological differences between worker-laid eggs from a queenright colony and queenless colony of *Melipona rufiventris paraensis* (Hymenoptera: Apidae). **Entomologische Berichichten**, v. 44, n. 1, p. 91-95, 1984.

SONG, Q., GILBERT, L.I. Molecular cloning, developmental expression, and phosphorylation of ribosomal protein S6 in the endocrine gland responsible for insect molting. **J. Bio. Chem**, v. 272, p. 4429-4435, 1997.

SOUZA, A.; ZANETTI, R.; CALEGARIO, N. Nível de dano econômico para formigas cortadeiras em função do índice de produtividade florestal de eucaliptais em uma região de Mata Atlântica. **Neotropical Entomology**, v. 40, n. 4, Londrina, 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-566X2011000400012>. Acesso em: 03 abr. 2021.

SOUZA, R. M. de Leaf-cutting ant (*Atta levigata* Smith) in na African mahogany plantation in Minas Gerais state, Brazil. **Entomo Brasilis**, v. 14 (2021).

SOUZA-SOUTO, L.; GUERRA, M.B.B.; SCHOEREDER, J.H.; SCHAEFER, C.E.G.R.; SILVA, W.L. da. Determinação do fator de conversão em colônias de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) e sua relação com a qualidade do material vegetal cortado. **Revista Árvore**, v.31, p.163-166, 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000107&pid=S0100-204X201000090000300017&lng=en>. Acesso em: 03 abr. 2021.

STRADLING, D. J. Food and feeding habits in ants. In: BRAIN, M. V. (Ed.) **Production ecology of ants and termites**. Cambridge, Cambridge University Press, p.81-106. 1978. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=4EA9AAAAIAAJ&oi=fnd&pg=PR13&dq=Production+ecology+of+ants+and+termites&ots=jgwfX1fLvP&sig=X5819lauy_iQAhajI4jVhhp6giA#v=onepage&q=Production%20ecology%20of%20ants%20and%20termites&f=false>. Acesso em: 16 abr. 2021.

TABASHNIK, B. E.; Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. **Nature Biotechnology**, v. 31, p.510–521, 2013. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nbt.2597>>. Acesso em: 29 abr. 2021.

TUFTS, J. A. M. et al. *Bacillus thuringiensis* as a surrogate for *Bacillus anthracis* in aerosol research. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 1453-1461, 2014.

VALICENTE, F. H., BARRETO, M. R., *Bacillus thuringiensis* survey in Brazil: geographical distribution and insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**. v. 32 n. 4 Londrina 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1519-566X2003000400014&script=sci_arttext>. Acesso em: Acesso em 04 abr. 2021.

VERMA P, et al., Beneficial plant-microbes interactions: biodiversity of microbes from diverse extreme environments and its impact for crop improvement. In: Singh DP, Singh HB, Prabha R (eds) **Plant-microbe interactions in agro-ecological perspectives, Microbial**

- interactions and agro-ecological impacts**, vol 2. Springer, Singapore, pp 543–580. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-981-10-6593-4_22>. Acesso em: 29 abr. 2021.
- VILAS-BOAS, G. T.; LEMOS, M. V. F. Diversity of Cry genes and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. **Canadian Journal Microbiology**, v. 50, n. 8, p. 605-613, 2004. Disponível em: <<https://cdnsiencepub.com/doi/abs/10.1139/w04-052>>. Acesso em: 30 abr. 2021.
- XU, C. et al., Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and Parasporin Toxins. **Multidisciplinary Digital Publishing Institute**, v. 6, n. 9, p. 2732-2770, 2014. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6651/6/9/2732/htm>>. Acesso em: 15 abr. 2021.
- WANG, M. et al., Screening of *Bacillus thuringiensis* strains to identify new potential biocontrol agents against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Plutella xylostella* in *Brassica campestris* L. **Biological Control**, v. 145, 2020.
- WARD, P.S. The Phylogeny and Evolution of Ants. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 45, n. 1, p. 23-43, 2014. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev-ecolsys-120213-091824>>. Acesso em: 06 abr. 2021.
- WARREN, G.W. et al., **Auxiliary proteins for enhancing the insecticidal activity of pesticidal proteins**. U.S. Patent 5,770,696, 23 June 1998. Disponível em: <<https://app.dimensions.ai/details/patent/US-5770696-A>>. Acesso em: 12 abr. 2021.
- WEBER, N. A. Gardening Ants: The Attines. **Memoirs of the American Philosophical Society**, v.92, 146 pp, 1972. Disponível em: <<https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300483828>>. Acesso em: 12 abr. 2021.
- WEBER, N. A. Fungus-growing ants. **Science**, v. 153, n. 3736, p. 587-604, 1966. Disponível em: <<https://science.sciencemag.org/content/153/3736/587>>. Acesso em: 29 abr. 2021.
- WHEELER, G. C.; WHEELER, J. Larvae of the social Hymenoptera. In: HERMANN, H. R. (Ed.) **Social Insects**. v. 1. New York, Academic Press. p.287-338. 1979. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=ZRPCAGA4aZAC&oi=fnd&pg=PP1&dq=Larvae+of+the+social+Hymenoptera&ots=daPc3nlzQo&sig=xVDzQjUhlXdf8mKQmXkv-ZBLmkE#v=onepage&q=Larvae%20of%20the%20social%20Hymenoptera&f=false>>. Acesso em: 12 abr. 2021.
- WILSON, E. O. Caste and division of labor in leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, Cambridge, v. 7, n. 12 p. 157-165, 1980. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF00299521>>. Acesso em: 07 abr. 2021.
- YADAV, A. N.; SAXENA, A. K. Biodiversity and biotechnological applications of halophilic microbes for sustainable agriculture. **Journal Applied Biology & Biotechnology**, v. 6, p. 48–55. 2018. Disponível em: <http://www.jabonline.in/admin/php/uploads/255_pdf.pdf>. Acesso em: 29 abr. 2021.
- YADAV, A. N. et al., Prospecting cold deserts of north western Himalayas for microbial diversity and plant growth promoting attributes. **Journal Bioscience Bioengineering**, v. 119, p. 683–693, 2015a. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172314004459?casa_token=XaYy8xNbuEAAAAA:op1uQxC->

qTy7ERLJiLq1SSLGeUrhjjoxe3zKDU28NZJjQXMylHlpMgPXPdfxONAzve4HNFviA3OT
>. Acesso em: 29 abr. 2021.

YADAV, A. N. et al., Diversity and phylogenetic profiling of niche-specific bacilli from extreme environments of India. **Annual of Microbiology**, v. 65, p. 611–629, 2015b. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s13213-014-0897-9>>. Acesso em: 29 abr. 2021.

YADAV, A. N. et al., Cold active hydrolytic enzymes production by psychrotrophic bacilli isolated from three sub-glacial lakes of NW Indian Himalayas. **Journal of Basic Microbiology**, v. 56, p. 294–307, 2016a. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jobm.201500230?casa_token=yfYGRWYZk9cAAAAA%3AmI2D7q9Q6Gc3cObgcH8oct1gmGQxvdrJJe8aIp4WdmuDLTE-W76MqTpz5j9Hw-3HX3Eb8zRJysruo_M>. Acesso em: 29 abr. 2021.

YADAV, A. N. et al., Bioprospecting of plant growth promoting psychrotrophic bacilli from cold desert of north western Indian Himalayas. **Indian Journal Experimental Biology**, v. 54, p. 142–150, 2016b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26934782/>>. Acesso em: 29 abr. 2021.

ZANETTI, R. et al., An Overview of Integrated Management of Leaf-Cutting Ants (Hymenoptera: Formicidae) in Brazilian Forest Plantations. **Forests**, v. 5, n. 3, p. 439-454, 2014.

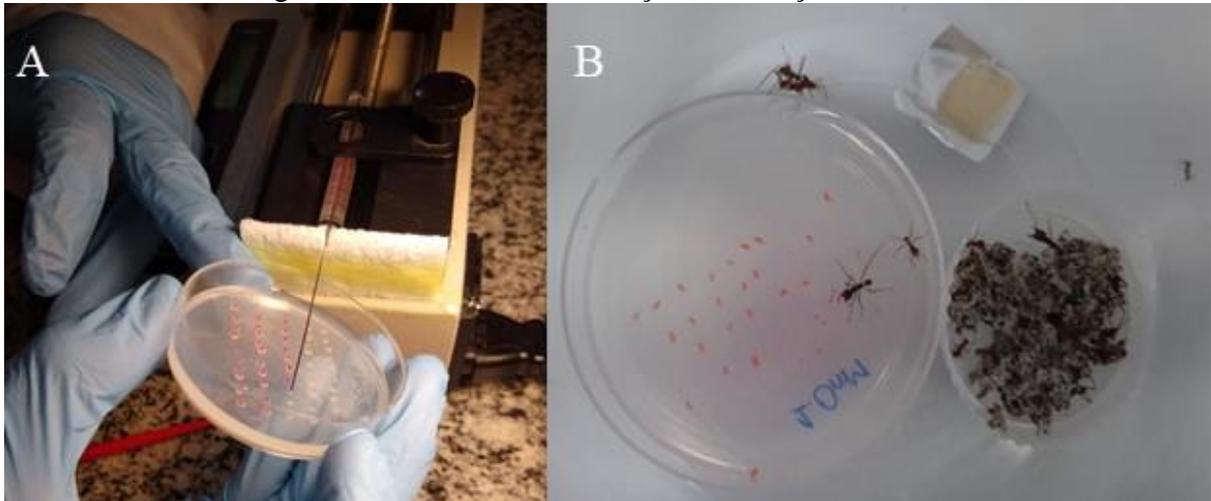
ZANUNCIO, J.C et al. Aferição de dosagens de iscas granuladas para controle de *Atta laevigata* (F. Smith) pelo número de olheiros ativos. **Revista Árvore**, v. 20, p. 241–246, 1996.

ZHANG, J. et al., Functional analysis of insect molting fluid proteins on the protection and regulation of ecdysis. **Biol. Chem**, v. 289, p. 35891-35906, 2014

ZOZERTTI, J. et al., Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains active against *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller, 1848) (Lepidoptera, Pyralidae). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 39, n. 4, p. 417-425, 2017.

APÊNDICE – Imagens complementares

Figura 1 - Método de alimentação e condução das minicolônias



Legenda: (A) Aplicação de dieta nas larvas utilizando a micro-seringa tipo Hamilton acoplada na bomba de seringa KD scientific. (B) Condução da minicolônia contendo o jardim de fungos e a dieta semissólida. As formigas adultas carregam as larvas da placa para o jardim, em seguida a placa é retirada da minicolônia.

Fonte: Do autor (2022)

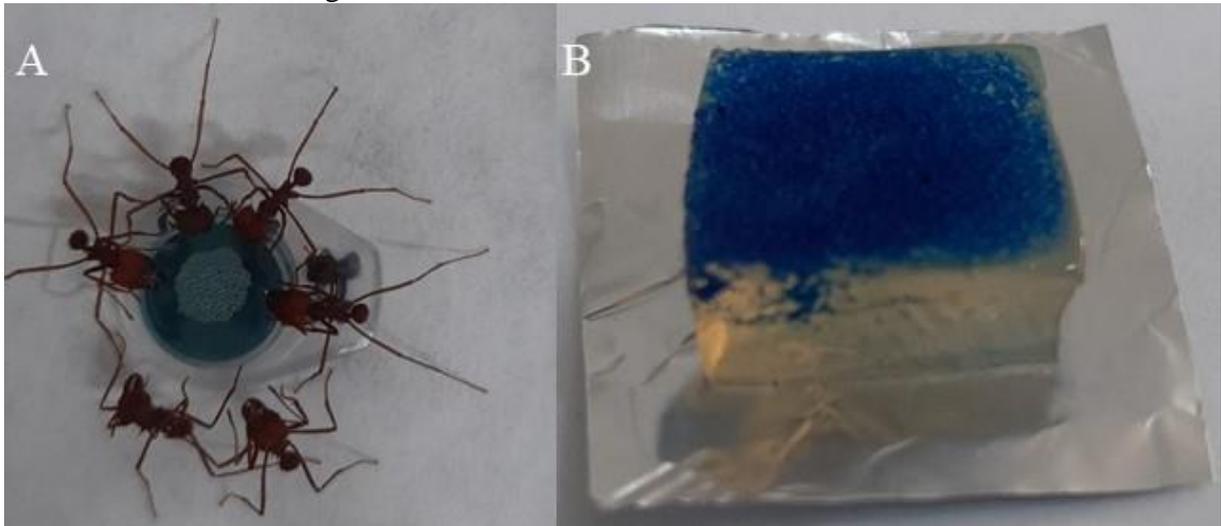
Figura 17 - Exemplo de larvas mortas encontradas no lixo da minicolônia



Legenda: As larvas mortas são carregadas pelas formigas para o lixo da minicolônia. É possível observar um aglomerado de larvas mortas presentes no lixo

Fonte: Do autor (2022).

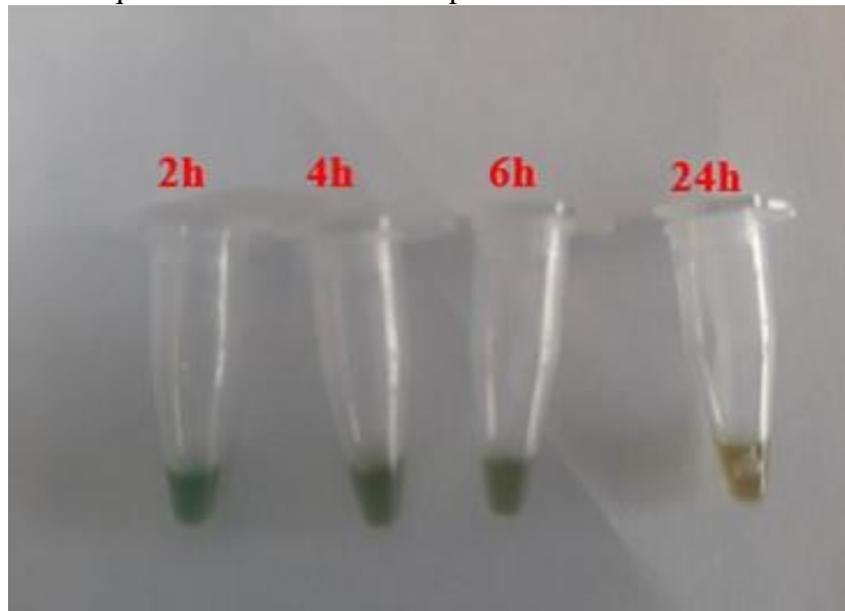
Figura 3 - Dietas coradas com azul de coomassie



Legenda: (A) Formigas forrageiras adultas se alimentando de dieta líquida corada com azul de coomassie. No centro do líquido aparecem bolhas formadas durante a pipetagem. (B). Dieta semissólida corada com azul de coomassie.

Fonte: Do autor (2022).

Figura 4 - Alíquota da dieta contendo esporos corados com azul de coomassie



Legenda: Alíquotas de diferentes tempos de decantação dos esporos corados com azul de coomassie. É possível notar que ao longo do tempo a coloração em tom de azul vai se perdendo, isso é um indicativo visual da menor quantidade de esporos em suspensão

Fonte: Do autor (2022).