UTILIZAÇÃO DE FUNGOS DO COMPLEXO OPHIOCORDYCEPS UNILATERALIS COMO AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO DE FORMIGAS DA TRIBO CAMPONOTINI

JoÃo Lucas Vitorio Ribeiro Carvalho [1], Letícia Franco de Almeida Costa [2], Vanessa Lúcia Rodrigues Nogueira [3], Roberth Fagundes de Souza [4]

RESUMO

Os fungos entomopatógenos do gênero *Ophiocordyceps* infectam formigas trofobiontes, como a *Camponotus*, que são consideradas prejudiciais quando cuidam de hemípteros sugadores de seiva que se tornam pragas ao removerem nutrientes, prejudicar a fotossíntese e inocular patógenos na planta. Nessa perspectiva, conduziu-se o presente estudo com o objetivo de avaliar a possibilidade da utilização de esporos fúngicos do complexo *Ophiocordyceps unilateralis* como agente de controle biológico de formigas do gênero *Camponotus* sp. Para isso, espécimes de formigas parasitadas foram coletadas em campo e utilizadas para obtenção do fungo. Foram realizados três experimentos para avaliar a eficácia da virulência do *Ophiocordyceps* no controle biológico de formigas. No experimento de infecção com esporos fúngicos obtidos em laboratório, observou-se que existiu mais mortalidade nas formigas expostas ao fungo. No experimento de infecção utilizando um fungo coletado em campo comprovou-se a eficácia da infecção do fungo nas formigas *Camponotus renggeri*. No experimento de campo, a presença do fungo reduziu a atividade de forrageio das formigas nas plantas. Foi demonstrado que os esporos do *Ophiocordyceps* sp. são eficientes em provocar alterações no comportamento das formigas, alterando o comportamento e provocando a morte das mesmas, e que dependendo da qualidade do fungo, os resultados na infecção são diferentes, comprovando o objetivo desse estudo.

Palavras-chave:

parasitismo. controle biológico. entomopatógeno. trofobiose. formigas.

[1] Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências Exatas e da Natureza, Discente, e-mail: lucasvitorio@aluno.unilab.edu.br
[2] Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências Exatas e da Natureza, Discente, e-mail: leticiafrancoac@hotmail.com
[3] Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências Exatas e da Natureza, Docente, e-mail: vanessa.nogueira@unilab.edu.br
[4] Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Ciências Exatas e da Natureza, Docente, e-mail: roberthfagundes@unilab.edu.br

INTRODUÇÃO

Os insetos são os principais organismos pragas de lavouras, atacando todos os tipos de cultivos, e ocasionando prejuízos no desenvolvimento das plantas e produtividade de frutos e grãos. Micro-organismos entomopatogênicos (fungos, bactérias e vírus) são comumente usados no controle de insetos por diminuir a população destes no campo. Atualmente, essa ferramenta ecológica reduz problemas oriundos do emprego excessivo de inseticidas. Os fungos são agentes de controle de insetos muito estudados e aplicados por causar 80% das enfermidades observadas nos mesmos e se destacam por infectar todos os estágios de desenvolvimento dos hospedeiros. No Brasil, os principais fungos entomopatogênicos usados em programas de controle biológico são *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*. Ao sugar a seiva da planta, podem causar um enrugamento das folhas tornando-as encurvadas e impróprias para a comercialização, paralização do desenvolvimento das plantas, redução na produção de flores e frutos e, consequentemente, redução da produção de sementes. Esses problemas são potencializados quando os hemípteros são cuidados por formigas da tribo Camponotini (Hymenoptera: Formicidae) aumentando muito sua população, o que os transformam em pragas muito danosas para as lavouras. Em mutualismo do tipo trofobiose, essas formigas consomem a excreta do hemíptero (honeydew) enquanto protege-os de seus inimigos naturais, aumentado a sobrevivência e reprodução, levando a super agregações de herbívoros nas plantas. Essa interação altera toda a comunidade associada às plantas incluindo outros herbívoros, polinizadores e predadores, o que representam um grande desafio para o uso de técnicas de controle biológico, pois requer o controle da interação ecológica e não apenas dos insetos. As espécies de formigas mais comuns e efetivas em interações com hemípteros, *Camponotus* spp. , são naturalmente parasitadas por espécies de fungos *Ophiocordyceps*. Infecções por *Ophiocordyceps* são altamente virulentas e matam seus hospedeiros para o desenvolvimento de estruturas aéreas por onde os esporos são dispersados. O potencial uso desse fungo no controle das formigas trofobiontes se torna uma estratégia no combate aos danos ocasionados às plantas pelos hemípteros, sendo uma alternativa não agressiva para planta e organismos não-alvo, afetando apenas o inseto desejado. O entendimento dos processos envolvidos na contaminação de formigas pelo *Ophiocordyceps* sp. pode ser o precursor na utilização desse fungo como agente biológico de controle. O uso do controle biológico dentro de programas de manejo integrado de pragas assume uma crescente importância frente a produção integrada em uma agricultura sustentável, métodos harmoniosos de diferentes técnicas de controle de pragas, em concordância com princípios ecológicos, econômicos e sociais, mantêm os organismos-praga longe de se tornarem um problema econômico sem prejudicar o meio ambiente.

METODOLOGIA

ÁREA DE ESTUDO

A área 1, conhecida como Campo do Batalha, é uma região de Mata Atlântica Relictual que está inserida na Unidade de Conservação de Proteção Integral Refúgio da Vida Silvestre Periquito Cara Suja, localizada na cidade de Guaramiranga. A área 2 está inserida nas dependências do Chalé Nosso Sítio, uma propriedade privada localizada na cidade de Pacoti que abriga 150 ha de Mata Atlântica antropizada e que possui alta ocorrência de formigas contaminadas por espécies de *Ophiocordyceps*. Ambas as áreas estão situadas a cerca de 800 m de altitude em relação ao nível do mar. A área 3 foi delimitada em um fragmento de vegetação de transição de caatinga arbustiva densa, mata seca (Floresta Subcaducifólia Tropical Pluvial) e mata úmida (Floresta Subperenifólia) da Serra de Redenção, localizado atrás do Campus das Auroras na UNILAB, situada a cerca de 88 m de altitude em relação ao nível do mar.

COLETA DOS ESPÉCIMES

Os fungos foram coletados a partir de espécimes de formigas infectadas em diferentes estágios de desenvolvimento. Através de busca ativa dos espécimes, todas as ocorrências foram coletadas em transectos que variaram entre um e dois quilômetros de extensão. As formigas foram coletadas com pinça metálica esterilizada e acondicionada em tubos estéreis de 5 mL, e depois levadas ao laboratório de Microbiologia na UNILAB, mantidas isoladas em recipientes plásticos com temperatura média de 18ºC e 60% de umidade relativa, para cultivo e posterior identificação. Foram registrados dados relacionados ao local, coletor, data,

formiga hospedeira, coloração e outras características macroscópicas do corpo de frutificação dos fungos. Para evitar uma possível contaminação do fungo por algum parasita, o estroma contendo o corpo de frutificação maduro foi retirado de algumas formigas e armazenado em um tubo de vidro estéril individual até o momento do cultivo. As formigas e os corpos de frutificação foram fotografados.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A partir da obtenção de esporos fúngicos através do cultivo, foi induzida a infecção de formigas em laboratório. Para isso, foram coletadas vinte formigas não infectadas do gênero *Camponotus* que forrageavam longe das plantas onde estavam presentes espécimes parasitados pelo fungo *Ophiocordyceps* sp. As formigas foram dispostas em cinco potes plásticos transparentes de 1000 mL com tampa, cada pote contendo cinco formigas. Em todos os potes foi adicionado uma porção de algodão embebido em água com açúcar para alimentação das formigas. Os potes foram mantidos em um local com fotofase e escotofase de 12h, umidade controlada, e a uma temperatura de aproximadamente 25°C. As formigas foram acompanhadas diariamente, a fim de se observar alguma mudança comportamental induzida pelos esporos fúngicos. O algodão foi trocado a cada dois dias para que mantivessem alimentadas durante todo o experimento. O experimento teve uma duração de 17 dias, até a morte da última formiga. Para a infecção das formigas saudáveis utilizando um fungo coletado em campo, formigas parasitadas portando um corpo de frutificação maduro do *Ophiocordyceps* sp. coletadas para esse experimento foram armazenadas individualmente em tubos estéreis, para que não houvesse contaminação após a coleta. Todas as formigas saudáveis coletadas se encontravam distantes de plantas onde haviam formigas infectadas pelo *Ophiocordyceps* sp. e no geral, apresentavam o comportamento de cuidado e proteção de hemípteros sugadores de seiva, em sua totalidade, afídeos. Todas as formigas, tanto as saudáveis quanto as parasitadas, foram identificadas como *Camponotus renggeri*. Para testar a possibilidade de infecção da *C. renggeri* pelo fungo *Ophiocordyceps* sp. em laboratório, foram utilizados quatro potes plásticos de 1000 mL com tampa. No pote T-1, foram inseridas 13 formigas saudáveis e uma formiga infectada portando um corpo de frutificação fúngico maduro foi fixada na parte inferior da tampa, pela parte adaxial da folha, de modo que o corpo de frutificação do fungo apontasse para as formigas, facilitando assim a dispersão dos esporos sobre as formigas saudáveis. No pote T-2, foram inseridas 10 formigas saudáveis, e duas formigas infectadas pelo fungo foram dispostas no pote da mesma forma que na Figura 5. Nos potes C-1 e C-2, foram inseridos 13 e 10 formigas em cada, respectivamente, e não foram expostas ao fungo em nenhuma etapa do experimento, sendo utilizadas apenas como controle. Todas as tampas dos potes foram furadas para entrada de ar, adicionando-se porções de algodão embebido em água com açúcar para alimentação das formigas, que eram substituídos a cada dois dias. O período entre o início do experimento e a morte da última formiga foi de 26 dias, após esse período, os potes continuaram em observação por mais duas semanas, a fim de acompanhar o crescimento dos fungos nas formigas mortas. Para o experimento de campo utilizando formigas parasitadas, um transecto de aproximadamente 120 metros foi delimitado em uma área de mata de borda localizada na área 3. Nele foram marcadas 30 árvores de Angico (*Anadenanthera colubrina*) separadas por 4 metros entre elas. Entre essas 30 plantas, foram designados de modo alternado, três grupos controle (C1, C2 e C3) e três grupos tratamento (T1, T2 e T3) cada um com cinco plantas identificadas. Todas as plantas foram marcadas em 3 pontos distintos de observação, a 80 cm (T1 e C1), a 120 cm (T2 e C2) e a 160 cm do solo (T3 e C3). Em cada planta tratamento, foi fixado uma formiga infectada em um dos pontos de observação, mas mantivemos o grupo controle inalterado. Essa diferença da altura na aplicação do tratamento nas plantas foi para que fosse observado se existe diferença na influência do fungo em diferentes extratos da planta. Nas duas primeiras semanas após a marcação das plantas houveram duas observações do comportamento das formigas e quantificação dos espécimes presentes nelas, com um intervalo de sete dias entre cada observação. Na terceira semana após o início das observações, houve a primeira aplicação do fungo. Nesse mesmo dia, 15 formigas portando um corpo de frutificação maduro e com aspecto de recém infectadas foram coletadas em tubos estéreis, na área 1. Essas formigas portando o fungo foram fixadas nos galhos anteriormente marcados com uma fita adesiva de alta aderência. Os locais de fixação das formigas parasitadas foi pensado para que ficasse na rota de forrageio onde se observava um maior trânsito de formigas. Após a formiga parasitada ser fixada na planta, as observações ocorreram em média, a cada dois dias, até que o fungo se decompôs, por volta de quatro

semanas após a fixação na planta. Para dar prosseguimento ao experimento, mais 15 fungos foram coletados na área 1, e fixados nas mesmas plantas, utilizando os mesmos métodos descritos anteriormente, e foram observados por mais quatro semanas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

OBTENÇÃO DE ESPOROS FÚNGICOS EM LABORATÓRIO

Após cinco dias da montagem das amostras, observou-se o crescimento de um micro-organismo filamentoso sobre o meio de cultura em algumas Placas de Petri. Uma semana após o cultivo, 70% delas já apresentavam um micélio se desenvolvendo, que variava em forma, coloração e tamanho. As amostras foram identificadas com o mesmo número de identificação da formiga parasitada coletada em campo. Na segunda semana após o cultivo, observou-se mudanças significativas em todas as amostras em relação a pigmentação, tamanho da colônia e morfologia do micélio. Nas amostras 3 e 4 um hiperparasita fúngico de coloração branca e aspecto aveludado tomou conta dos corpos de frutificação fixados sobre os meios de cultura. Por conta disso, ambas as amostras foram descartadas do experimento. A partir da quarta semana após o cultivo, observou-se uma diminuição no desenvolvimento dos micro-organismos filamentosos que cresceram sobre o meio de cultura em cada amostra. Nesse momento, realizou-se o isolamento de cada micro-organismo presente nas Placas de Petri. Existe uma dificuldade em identificar o *Ophiocordyceps* sem a utilização de técnicas moleculares, a taxonomia de *Ophiocordyceps unilateralis* ainda não está clara, pois a espécie-tipo parecia ser imatura e as principais características morfológicas como o ascomata, asco e ascósporos (somente observados no estágio maduro) não foram incluídas na descrição original. Por conta disso, escolhemos as amostras que possuíam um menor grau de contaminação por outros micro-organismos e isolamos a fim de testá-la nos experimentos. Os isolados das amostras 1, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 foram identificados como ISO B-1, ISO B-5, ISO B-6, ISO B-7, ISO B-8, ISO B-9 e ISO B-10, respectivamente. Após duas semanas, observou-se um crescimento significativo das colônias em todos os isolados. Três semanas após o isolamento, fragmentos da amostras foram submetidos a um microcultivo sobre a superfície de lâminas cobertas com uma lamínula. O crescimento foi acompanhado a cada três dias. Esporos dos fungos que cresceram nas amostras ISO B-1, ISO B-7 e ISO B-10 foram coletados e armazenados em tubos estéreis, e guardados em um local escuro, com temperatura em torno de 28°C e umidade de 40%, para serem aplicados no experimento de infecção das formigas em laboratório.

EXPERIMENTO DE INFECÇÃO DAS FORMIGAS POR MEIO DE ESPOROS OBTIDOS EM LABORATÓRIO

Nos potes identificados como T-ISO B-1, T-ISO B-7 e T-ISO B-10 foram aplicados esporos dos fungos obtidos nas amostras ISO B-1, ISO B-7 e ISO B-10, respectivamente. No pote identificado como controle, as formigas não foram expostas a nenhum esporo fúngico. A partir da análise do experimento, constatou-se que houve uma diferença na mortalidade de formigas dependendo do grupo experimental e da cultura utilizada. O tratamento T-ISO B-1 foi mais eficiente na morte das formigas, comparado aos demais tratamentos e ao grupo controle. Observou-se também que a sobrevivência das formigas diminuiu ao longo do tempo, com quedas diferentes dependendo da cultura original da infecção. Os grupos de formigas infectados pela cultura T-ISO B-1 morreram mais rápido que o controle e as demais culturas. Como o intuito desse experimento era testar se os esporos fúngicos obtidos em laboratório apresentavam algum efeito no comportamento das formigas em geral, foram utilizadas espécimes dos gêneros mais comuns encontrados no dia-dia. Não foi observado nenhuma característica que aparentasse um crescimento fúngico nas formigas em nenhum dos grupos durante o período de observação do experimento. Pode-se dizer que no geral, as formigas que foram expostas aos esporos fúngicos obtidos em laboratório morreram mais rapidamente e a possibilidade da cultura em que os esporos ISO B-1 foram extraídos serem de um fungo entomopatogênico é maior com relação as outras culturas. Porém, não pode-se afirmar que nenhum desses esporos fúngicos são eficazes no controle biológico de formigas, pois não foi confirmado que as amostras nas quais os esporos utilizados nesse experimento foram extraídos eram de *Ophiocordyceps* sp. Para posteriores experimentos, sabe-se que o

tempo de mortalidade das formigas varia entre as amostras obtidas através do cultivo. Contudo, se as formigas saudáveis utilizadas tivessem sido identificadas e fossem todas pertencentes ao gênero *Camponotus*, a probabilidade de infecção seria maior, pois existem trabalhos que afirmam que esse fungo é específico para certas espécies de formigas.

EXPERIMENTO DE INFECÇÃO DAS FORMIGAS UTILIZANDO UM FUNGO COLETADO EM CAMPO

Foram coletadas três formigas identificadas como pertencendo a espécie *Camponotus renggeri* parasitadas pelo fungo *Ophiocordyceps* sp., apresentando um corpo de frutificação maduro em um estágio aparentemente recente de infecção, e 46 formigas pertencentes a mesma espécie das parasitadas vivas e saudáveis, através de busca ativa. As formigas saudáveis que foram confinadas junto as formigas parasitadas morreram mais rapidamente comparado as que não foram expostas a nenhum fungo. Além disso, as formigas que foram expostas ao fungo (T-1 e T-2) apresentaram um comportamento mais vagaroso ao se locomoverem no pote, comparado as formigas do grupo controle (C-1 e C-2). Foi observado uma diferença na mortalidade das formigas em relação aos grupos tratamento e controle. Observou-se também que em algumas formigas mortas nos potes que foram expostas ao fungo, seus corpos aparentavam estarem ocos, e em outras, um micélio claro cresceu brotando da região da mandíbula e das articulações do corpo. Essas características não foram observados nas formigas do grupo controle. Como esse experimento foi realizado utilizando somente formigas saudáveis e parasitadas da espécie *C. renggeri*, podemos afirmar que a presença desse fungo promove um controle biológico dessas formigas, provocando uma infecção em todos os indivíduos que foram expostos a ele. As formigas da espécie *C. renggeri* que foram escolhidas para esse experimento foram encontradas interagindo com afídeos, sendo essa interação formiga-afídeo um dos objetos de estudo desse trabalho. Quando essa interação está presente em sistemas de cultivo agrícolas, pode gerar diversos problemas às plantas e ao controle biológico natural, pois as formigas mantêm o crescimento da população dos afídeos durante todo o ciclo de vida das plantas causando danos na produtividade da mesma.

EXPERIMENTO DE CAMPO UTILIZANDO FORMIGAS PARASITADAS

Foram observadas 778 formigas forrageando nas plantas durante as dez semanas de experimento. Houve grande variação na quantidade de formigas forrageando ao longo do tempo, em todos os grupos. Nas primeiras duas semanas de observação, notou-se uma variação na quantidade de formigas nos grupos tratamento e controle que se mantém durante todo o experimento. Essas variações se justificam pelo comportamento de forrageio das formigas ser inconstante, devido a fatores climáticos, disponibilidade de alimento, horário ou presença de predadores. Entretanto, a partir da inclusão do fungo no grupo tratamento na terceira semana, observou-se um decréscimo acentuado no número de formigas nessas plantas, comparado as duas semanas anteriores. Essa queda foi bastante elevada quando comparado ao grupo controle. Na quinta semana, observou-se que o número de formigas forrageando nas plantas do grupo tratamento ainda se manteve baixo, mesmo existindo uma variação no grupo controle em relação à semana anterior. Na sexta semana os fungos se encontravam deteriorados, alguns deles já haviam se degradado por inteiro, esse fato se deu principalmente por fatores climáticos como temperatura elevada e baixa umidade. Percebe-se que nessa mesma semana, ocorreu um aumento considerável na quantidade de formigas no grupo tratamento, e uma alta no grupo controle. Por conta da deterioração dos fungos, foi realizada uma nova inclusão de formigas infectadas, e foi observado que na semana seguinte ocorreu mais uma vez um decréscimo acentuado na quantidade de formigas no grupo tratamento. Apesar da quantidade de formigas em ambos os grupos terem diminuído abruptamente na sétima semana, a recuperação no grupo controle foi mais rápida, comparado ao grupo tratamento, que se manteve com um baixo quantitativo de formigas em suas plantas nas duas semanas que sucederam o pulso. A partir da nona semana de experimento é que se observa uma alta na quantidade de formigas no grupo tratamento, semana essa em que já se podia observar um grau acentuado de degradação em muitas das amostras de fungos que foram fixados nas plantas. Na décima e última semana do experimento, percebe-se que a maioria das formigas tiveram preferência pelas plantas que haviam sido incluídas o fungo, acredita-se que esse comportamento ocorreu devido a maior disponibilidade de alimento nessas plantas, visto que na presença do fungo, elas estavam sendo menos visitadas pelas formigas, portanto, houve um aumento na quantidade de alimento disponível nelas, já as

plantas do grupo controle, por não haver nenhuma interferência que comprometesse o forrageio natural das formigas, o alimento estava sendo consumido normalmente por elas. No geral, a presença do fungo reduziu a atividade das formigas nas plantas durante todo o experimento e em todos as partes das plantas. Fatores como temperatura e umidade podem diminuir a atividade do fungo e levá-lo a morte.

CONCLUSÕES

Através dos experimentos, foi demonstrado que os esporos de fungos entomopatogênicos são eficientes em provocar alterações no comportamento das formigas, alterando a frequência de atividade e provocando a morte das formigas, comprovando o objetivo desse estudo. Além disso, dependendo do qualidade do fungo, podem ser mais virulentos na infecção. Observou-se que o fungo *Ophiocordyceps* sp. encontrado parasitando a formiga *Camponotus renggeri* em campo, é eficiente no controle de formigas da mesma espécie, apesar de haver uma variação dependendo da origem do fungo. Esse resultado foi comprovado pelo experimento de laboratório utilizando um fungo natural e se torna importante para criar metodologias de produção desse fungo em larga escala para o controle das formigas. Além de comprovar o fato de que é possível a aplicação dos esporos do *Ophiocordyceps* sp. como ferramenta de controle biológico de formigas. Pensando no seu possível uso na lavoura, o *Ophiocordyceps* sp. mostrou eficácia em repelir as formigas nas plantas, visto durante o experimento de campo, o que indica o uso no controle biológico de formigas-praga da lavoura, especialmente, *Camponotus* sp. que protege herbívoros sugadores de seiva. Através desse resultado foi possível comprovar a hipótese de que os esporos aplicados em plantas interferem na atividade das formigas, reduzindo a sua quantidade nas plantas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB) e ao Instituto de Ciências Exatas e da Natureza (ICEN); à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento desse trabalho; à Unidade de Conservação de Proteção Integral Refúgio da Vida Silvestre Periquito Cara Suja pela permissão para realização desse trabalho na Trilha da Batalha; à Secretaria do Meio Ambiente do Estado do Ceará (SEMACE) pela permissão para realização desse trabalho na Área de Proteção Ambiental da Serra de Baturité e ao Chalé Nosso Sítio na cidade de Pacoti pela permissão para realização desse trabalho em sua propriedade.

REFERÊNCIAS

João Lucas Vitorio Ribeiro Carvalho. Utilização de fungos do complexo *Ophiocordyceps unilateralis* como agente de controle biológico de formigas da tribo camponotini. Monografia - Curso de Ciências Biológicas, Instituto De Ciências Exatas E Da Natureza, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira - Redenção, 49f: il, 2019.