



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**  
**DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA - UFAM**

**Antagonismo de bactérias endofíticas de plantas da Amazônia contra o  
jardim de fungos associados às formigas cortadeiras *Atta sexdens*  
Hymenoptera (Formicidae: Attini).**

**Doutoranda:** Adriana Dantas Gonzaga

**Manaus, Amazonas**

**Fevereiro, 2012.**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS



PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA - UFAM

**Antagonismo de bactérias endofíticas de plantas da Amazônia contra o jardim de fungos associados às formigas cortadeiras *Atta sexdens* Hymenoptera (Formicidae: Attini).**

**Orientador:** Dr. José Odair Pereira

**Co-orientador:** Dr. Neliton Marques da Silva

**Doutoranda:** Adriana Dantas Gonzaga

Tese apresentada à Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Programa Multi-institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

**Manaus – Amazonas**

**Fevereiro, 2012.**

## Ficha Catalográfica

(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

G642a Gonzaga, Adriana Dantas

Antagonismo de bactérias endofíticas de plantas da Amazônia contra o jardim de fungos associados às formigas cortadeiras *Atta sexdens* Hymenoptera (Formidae: Attini)./Adriana Dantas Gonzaga .- Manaus: UFAM, 2012.

176f.; il. color.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, 2012.

Orientador: Prof.º, Drº. José Odair Pereira

Co-orientador: Profº Drº Neliton Marques da Silva

1. Formigas cortadeiras 2. Saúvas- controle biológico 3. Formigas cortadeiras- plantas- Amazônia. I. Pereira, José Odair(Orient.) II. Silva, Neliton Marques da (Co-orient.) III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU (1997) 595.796(811.3)(043.2)

## **Dedico**

A Deus, que pela sua misericórdia deu-me paciência, sabedoria, determinação para a conclusão deste trabalho. Muito obrigada por alcançar mais um degrau em minha vida acadêmica e profissional.

À minha família, em especial aos meus pais (Jorge e Dalvanir), pelo amor e carinho que têm por mim, cobrindo-me todos os dias com suas orações ao nosso bom Deus.

A todos os meus professores que dedicaram um momento de suas vidas transmitindo seus conhecimentos, fazendo despertar em mim a curiosidade para a ciência e a pesquisa, obrigada por fazerem parte da minha vida.



“Cada um que passa em nossa vida passa sozinho...  
Porque cada pessoa é única para nós, e nenhuma  
substitui a outra.

Cada um que passa em nossa vida passa sozinho,  
mas não vai só...

Levam um pouco de nós mesmos  
e nos deixam um pouco de si mesmos.

Há os que levam muito,  
mas não há os que não levam nada.  
Há os que deixam muito,  
mas não há os que não deixam nada.

Esta é a mais bela realidade da vida...  
A prova tremenda de que cada um é importante  
e que ninguém se aproxima do outro por acaso”...

Antoine De Saint-Exupèry



## Agradecimentos

Agradeço a Deus, que me ajudou nos momentos difíceis e que iluminou a minha mente para continuar e conseguir chegar até o final desta etapa;

Agradeço de todo o coração aos professores Doutores José Odair Pereira e Neliton Marques da Silva, meus orientadores, pela amizade, confiança, valiosos ensinamentos e inestimável colaboração na realização deste trabalho, que contribuiu para o meu crescimento intelectual e pessoal;

Às Doutoradas Antonia Queiroz e Cristina Maki, pela amizade, dedicação ao meu trabalho e ao meu aprendizado, pelas horas incansáveis comigo no laboratório, me ajudando em todos os momentos, sem vocês não teria conseguido chegar até esta etapa, peço a Deus que as abençoe sempre, muitíssimo obrigada;

Aos professores que me ajudaram nos momentos da pesquisa: Dr. Afonso, Dr. Pedro e Dra Rozana. Sem seus laboratórios, nada teria realizado;

À Dra. Ana Mena e à Dra Juliana, do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia IFAM/CMC, que no começo da minha pesquisa me ofereceram os seus laboratórios para desenvolver os experimentos com plantas inseticidas, depositando uma enorme confiança em mim;

À Dra Leonor, se não fosse a senhora, a parte enzimática estaria comprometida. Muito obrigada pela confiança, pelas horas trabalhando em seu laboratório de fermentação. Valeu pela experiência, pelos novos conhecimentos e descobertas;

Aos Doutores Wallice e Moisés pela ajuda estatística dos experimentos e pela paciência dedicada à minha santa ignorância. Obrigada, valeu;

Ao Vilhena do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia, INPA, sem você, não saberia como coletar as formigas cortadeiras, muito obrigada por suas instruções, identificações e amizade;

Ao antigo laboratório do CPAQ/INPA em nome da Sra. Inês Pereira e do Dr. Manoel Pereira Filho, *in memoriam*, pela ajuda no processamento dos materiais vegetais para a formação dos extratos no início do trabalho;

Às instituições: Universidade Federal do Amazonas, Universidade do Estado do Amazonas, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e ao Instituto Federal de

Educação Ciência e Tecnologia, nos quais utilizei as estruturas físicas dos laboratórios. Aos pesquisadores maravilhosos que contribuíram enormemente com o trabalho e com suas experiências na minha formação pessoal e profissional;

Ao CNPq e à FAPEAM pela ajuda financeira do projeto e das bolsas concedidas, possibilitando o desenvolvimento do Doutorado em Biotecnologia;

Agradeço também à banca julgadora da minha aula de qualificação, Dra. Beatriz Ronchi Teles, Dr. Victor Py-Daniel, Dra. Cristina Sayuri Maki, Dra. Antonia Queiroz e Dr. Pedro Queiroz, que me incentivaram no decorrer desta etapa;

Aos meus amigos e colegas da turma de 2008-2012 do curso de Doutorado em Biotecnologia da UFAM: Aline Rondon, Ginarajadaça Oliveira, Katherine, Marcio Alécio, Simone Moreira, agradeço pelas risadas e choros tanto nas disciplinas como nos experimentos;

Aos amigos dos Laboratórios LABGEMMA – Adriana (Cupuaçu), Laryssa, Flávia, Fátima, Felipe, Leylane, Priscila, Mayane, Mara, Cássia, Carol, Paulo (Basídio), Conceição, Jessica, Renyer, Edson e Eliana Elias.

Aos amigos do Laboratório de Genética - Aline, Joyce, Felipe, Gabriela, Luciana, Naiara e Shelvia.

Aos amigos do Laboratório do CAM Biotecnologia – Edson, Helber, Dina e Roberto.

Aos amigos do Laboratório de Entomologia – Clóvis, Marcia, Raquel e Geraldo.

Aos amigos do Laboratório Pesquisa e Produção IFAM – Bruna, Lais, Luciana, Lawrence, Lucilene e Winnie.

Também agradeço aos meus amigos da época do mestrado e do IFAM/CMZL Darcilene, Maria Cléia, Antonio Machado, Simone, Samia, Fabiana, Joycilene, Carlos, Flavio, Sandro, Edmilson, que são pessoas alegres, divertidas, sempre deixando um alto astral, pelo incentivo, cinemas e boas risadas;

A todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização desta tese.

Muito Obrigada

## RESUMO

Calcula-se que entre as espécies de insetos conhecidas (cerca de 900 mil), próximo de 2% são ditas eussociais, pois vivem em sociedades verdadeiramente avançadas. As formigas cortadeiras estão inseridas no grupo dos insetos eussociais e atingiram o que pode se chamar de apogeu do instinto por meio da agricultura de fungos. Até o momento, parece ser o único grupo de animais, além do homem, que desenvolveu uma agricultura avançada, que se baseia na simbiose mutualística com os fungos e surgiu há mais de 50 milhões de anos, ou seja, muito antes de o homem existir e se tornar agricultor. O fato de esses insetos cortarem folhas que servem de substrato para o cultivo do fungo do qual se alimentam as torna de grande importância econômica, sobretudo quando competem conosco. Dentro desse contexto, objetivou-se realizar um estudo sobre a microbiota associada ao jardim de fungos das formigas cortadeiras *Atta sexdens*, avaliando-se a possibilidade de controlá-los por meio da atividade antagonista de microrganismos endofíticos provenientes de plantas da Amazônia. Para viabilizar esses ensaios foram coletadas, em campo, treze colônias de formigas com aproximadamente cinco meses contendo todas as castas (rainha, soldados, machos e operárias) e encaminhado ao Laboratório de Microrganismos LABGEMMA da Universidade Federal do Amazonas – UFAM. A partir desses formigueiros, os microrganismos associados foram isolados, cultivados, identificados (por métodos clássicos e moleculares), e preservados em meios e condições apropriadas. Os ensaios de antagonismo foram realizados pelo método de cultivos paralelos, “in vitro”, utilizando-se microrganismos endofíticos como agentes inibidores dos microrganismos associados aos formigueiros. Foram realizados ainda ensaios “in vivo”, utilizando-se formigueiros montados em laboratório, para avaliar o potencial dos endófitos no controle biológico dos formigueiros. Os principais microrganismos isolados e identificados como associados aos formigueiros foram: *Leucoagaricus gongylophorus*; *Bionectria ochroleuca*; *Aspergillus flavus*; *Trichoderma longibrachiatum*; *Fusarium solani*, leveduras e bactérias gram negativas e positivas. Os ensaios de antagonismo contra *L. gongylophorus*, *T. longibrachiatum*, *A. flavus* e contra uma das leveduras do formigueiro, foram promissores como métodos alternativos para o controle biológico dos formigueiros.

## ABSTRACT

Among the species of known insects (approximately 900 thousands), at about 2% is considered eusocial, because they live in truly advanced societies. The leaf-cutting ants belong to eusocial insects group and reached the major level of the instinct through the cultivation of fungi. Nowadays, they seem to be the unique animal group that have developed an advanced agriculture, based on their symbiosis with fungi, that appeared at about 50 million years ago, long before human being had appeared and become cultivator. Cutting leaves that serves as substrate to fungi cultivation for feed, ensure a high economic value to leaf-cutting ants, especially when they compete with men. So, the aim of this work was to perform a study about the microorganisms communities associated to the fungi garden of the leaf-cutting ants, *Atta sexdens*, evaluating the possibility to control them by the antagonistic activity of endophyte microorganisms from Amazon plants. To enable these assays, 13 leaf-cutting ants colonies (at about 5 months of age) containing all classes (queen, soldiers, males and workers) were collected and transferred to the Laboratório de Microrganismos LABGEMMA of the Universidade Federal do Amazonas – UFAM. From these anthill, associated microorganisms were isolated, cultivated, identified (by molecular and classical methods) and preserved at appropriated conditions. The antagonisms assays were performed by the method of paired culture, using endophytic microorganisms as inhibitors of those anthill associated. “*In vivo*” assays were performed with lab assembled anthills, to evaluate the potential for biological control against them. The main isolated and identified anthills associated microorganisms were: *Leucoagaricus gongylophorus*; *Bionectria ochroleuca*; *Aspergillus flavus*; *Trichoderma longibrachiatum*; *Fusarium solani*, yeasts and gram positive and gram negative bacteria. Antagonisms assays against *L. gongylophorus*, *T. longibrachiatum*, *A. flavus* and one of the anthill yeasts were promising as an alternative method to the anthills biological control.

## SUMÁRIO

Dedicatória .....	iii
Agradecimentos .....	v
RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
ÍNDICE DE TABELAS .....	xvi
1- REVISÃO GERAL .....	01
1. INTRODUÇÃO .....	01
1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	02
1.1.1 As formigas cortadeiras .....	02
1.1.2 História de vida das cortadeiras .....	05
1.1.3 Origem da agricultura das formigas .....	08
1.1.4 O gênero <i>Atta</i> .....	10
1.1.5 O gênero <i>Acromyrmex</i> .....	11
1.1.6 O Fungo Simbionte .....	12
1.1.7 A simbiose formiga-fungo . .....	14
1.1.8 <i>Streptomyces</i> .....	16
1.1.9 Métodos de controle das formigas-cortadeiras .....	17
1.1.10 Microrganismos Endofíticos .....	19

1.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	20
2-ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE MICRORGANISMOS ASSOCIADOS AO JARDIM DE FUNGOS SIMBIÓTICOS DAS FORMIGAS CORTADEIRAS <i>Atta sexdens</i> .....	32
RESUMO .....	32
2. INTRODUÇÃO .....	34
2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	37
2.1.1 Morfologia e estrutura dos fungos .....	37
2.1.2 Crescimento microbiano .....	39
2.1.3 Associação fungos e insetos .....	40
2.1.4 Simbiontes externos – Os insetos que cultivam fungos .....	42
2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	42
2.2.1 Coleta e manutenção dos insetos em laboratório . .....	42
2.2.2 Isolamento dos microrganismos .....	43
2.2.3 Identificação dos microrganismos .....	45
2.2.4 Obtenção de colônias monospóricas .....	45
2.2.5 Conservação dos microrganismos .....	45
2.2.6 Extração de ácidos nucléicos para identificação molecular dos fungos .....	46
2.2.7 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) .....	46
2.2.8 Reação de seqüenciamento e análise das seqüências obtidas .....	47
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	47
2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51

3- ATIVIDADE ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE PLANTAS DA AMAZÔNIA CONTRA O FUNGO SIMBIONTE <i>L. gongylophorus</i> , E DOS FUNGOS ASSOCIADOS ( <i>Trichoderma</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp., e leveduras) PRESENTES NOS NINHOS DE <i>Atta sexdens</i> .....	60
RESUMO .....	60
3. INTRODUÇÃO.....	62
3.1 REVISÃO BIBLIOGRAFICA .....	67
3.1.1 Interações Microbianas e Antagonismo .....	67
3.1.2 Produção de substâncias antimicrobianas .....	68
3.1.3 Competição por nichos ecológicos .....	70
3.1.4 Competição por nutrientes .....	71
3.1.5 Hiperparasitismo .....	72
3.1.6 Predação e Parasitismo .....	73
3.2 MATERIAL E MÉTODO .....	74
3.2.1 Atividade Antagonista <i>in vitro</i> .....	74
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	75
3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	95
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	96
4- UM NOVO MÉTODO DE CONTROLE BIOLÓGICO PARA AS FORMIGAS CORTADEIRAS <i>Atta sexdens</i> A PARTIR DE LINHAGENS DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE PLANTAS DA AMAZÔNIA .....	107
RESUMO .....	107
4. INTRODUÇÃO .....	109

4.1 REVISÃO BIBLIOGRAFICA .....	110
4.1.1 Formigas – subfamília Myrmicinae – Tribo Attini .....	110
4.1.2 Controle alternativo de pragas .....	111
4.1.3 O controle Biológico .....	112
4.1.4 Bactérias endofíticas .....	114
4.1.5 A planta quebra-pedra: <i>Phyllanthus</i> sp. ....	116
4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	118
4.2.1 Atividade Antagonista <i>in vivo</i> para o controle das formigas cortadeiras ( <i>Atta sexdens</i> ) .....	118
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	122
4.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	135
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	143
ANEXOS 01 .....	144
<b>Anexo 01</b> – Teste estatístico Anova – Tukey nível 5% significancia – Dias/ Tratamento/ Corte das folhas . ....	145
<b>Anexo 02</b> - Teste estatístico Anova – Tukey nível 5% significancia – Dias/ Tratamento/ Formigas .....	151
<b>Anexo 03</b> - Teste estatístico Anova – Tukey nível 5% significancia – Dias/ Tratamento/ Aparência do fungo.....	157

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Formiga cortadeira <i>Atta laevigata</i> (saúva) fazendo a nidificação. Fonte: <a href="http://www.provenatnews.blogspot.com">www.provenatnews.blogspot.com</a> .....	11
<b>Figura 2</b> – Fêmea de <i>A. octospinosus</i> . Fonte: <a href="http://www.agrolink.com.br">www.agrolink.com.br</a> .....	12
<b>Figura 3</b> – Esquema de um conjunto de gongilídeos, à direita esquema de uma hifa com gongilídeos (Fonte: Cléménçon, 2004) . .....	14
<b>Figura 4</b> – A – Coleta dos ninhos; B- Recipiente onde foram acomodados os ninhos das formigas cortadeiras <i>A. sexdens</i> . Fonte: Gonzaga, 2009 .....	43
<b>Figura 5</b> – Isolamento dos microrganismos presentes no jardim de fungos associados das formigas cortadeiras .....	44
<b>Figura 6</b> – Microrganismos isolados do jardim de fungo simbiote. Placas A e C – <i>Aspergillus flavus</i> ; B – <i>Trichoderma longibrachiatum</i> ; D e F – Bactérias Gram-negativas; E – Leveduras; G e H - <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> . Fonte: Gonzaga, 2009 .....	49
<b>Figura 7</b> – Atividade antagonista de bactérias endofíticas de plantas da Amazônia contra o fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> fungo simbiote associado às formigas cortadeiras <i>Atta sexdens</i> .....	76
<b>Figura 8</b> – Atividade antagonista de bactérias endofíticas de plantas medicinais da Amazônia, contra a levedura isolada do jardim de fungo simbiote das formigas cortadeiras <i>Atta sexdens</i> . A e B – Testes de antagonismo contra a levedura .....	86
<b>Figura 9</b> – Atividade antagonista de bactérias endofíticas de plantas da Amazônia contra <i>Trichoderma</i> sp. A – placa mostrando a atividade antagonista; B – placa mostrando que o fungo não cresceu .....	88
<b>Figura 10</b> – Teste de Antagonismo com as bactérias endofíticas de plantas da Amazônia, mostrando a inibição do fungo <i>Aspergillus flavus</i> , isolado do jardim de fungo simbiote das formigas cortadeiras <i>Atta sexdens</i> .....	91

<b>Figura 11</b> – Teste <i>in vivo</i> de mortalidade das formigas cortadeiras. A – “pool” das bactérias endofíticas de plantas da Amazônia; B – materiais utilizados na aplicação do “pool” das bactérias; C – aplicação do “pool” das bactérias em folhas de laranja; D – colocação das folhas com o “pool” das bactérias utilizadas como alimento para as formigas cortadeiras; E – Formigas <i>A. sexdens</i> cortando as folhas contaminadas; F – medidas diárias realizadas para verificação da redução do tamanho do fungo. Fonte: Gonzaga, 2011 .....	119
<b>Figura 12</b> – Ninhos de <i>A. sexdens</i> montados em laboratório para o teste de mortalidade <i>in vivo</i> . Fonte Gonzaga, 2011 .....	120
<b>Figura 13</b> – Jardim de Fungos simbiotes das formigas cortadeiras <i>Atta sexdens</i> . Fonte: Gonzaga, 2009 .....	121
<b>Figura 14</b> – Estrutura de um ninho montado em laboratório. A – “panela” do lixo; B – “panela” do fungo; C – “panela” da alimentação. Fonte: Gonzaga, 2009 .....	121
<b>Figura 15</b> – Taxa de mortalidade do jardim de fungos no primeiro ensaio <i>in vivo</i> .....	123
<b>Figura 16</b> – Corte das folhas pelas formigas no primeiro ensaio <i>in vivo</i> .....	125
<b>Figura 17</b> – Comparação do tamanho das folhas cortadas no primeiro ensaio <i>in vivo</i> ..	126
<b>Figura 18</b> – Comportamento das formigas cortadeiras no primeiro ensaio <i>in vivo</i> .....	127
<b>Figura 19</b> – Taxa de mortalidade dos tratamentos do segundo ensaio <i>in vivo</i> .....	129
<b>Figura 20</b> - Características dos formigueiros no teste de antagonismo <i>in vivo</i> . Valores baixos indicam comportamentos desejáveis. Valores mais altos indicam a desestabilização do formigueiro e dos jardins de fungos associados .....	130
<b>Figura 21</b> - Corte das folhas das formigas cortadeiras no ensaio <i>in vivo</i> . Quanto menores os valores, mais próxima à normalidade a nidificação das formigas .....	131
<b>Figura 22</b> - Comportamento das formigas cortadeiras no ensaio <i>in vivo</i> . Quanto menores os valores, mais próxima à normalidade a nidificação das formigas .....	133

**Figura 23** - Aparência do fungo das formigas cortadeiras no ensaio *in vivo*. Quanto menores os valores, mais próxima à normalidade a nidificação das formigas.....134

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Métodos utilizados para o combate às Formigas Cortadeiras .....	17
<b>Tabela 2</b> – Dados do seqüenciamento dos fungos isolados do jardim de fungos simbiotes das formigas cortadeiras <i>Atta sexdens</i> .....	50
<b>Tabela 3</b> – Principais tipos de associações entre microrganismos insetos .....	66
<b>Tabela 4</b> – Atividade Antagonista de bactérias endofíticas de plantas medicinais da Amazônia contra <i>L. gongylophorus</i> fungo associado às formigas cortadeiras .....	78
<b>Tabela 5</b> - Atividade Antagonista de bactérias endofíticas de plantas medicinais da Amazônia contra uma levedura isolada do jardim de fungos associados às formigas .....	87
<b>Tabela 6</b> – Resultados positivos dos testes de antagonismo das bactérias endofíticas contra o fungo isolado <i>Trichoderma</i> sp. ....	89
<b>Tabela 7</b> – Resultados positivos de antagonismo para o fungo <i>Aspergillus flavus</i> isolado do formigueiro de <i>Atta sexdens</i> .....	92
<b>Tabela 8</b> – Resultados de todos os testes de antagonismo com as bactérias endofíticas de plantas medicinais da Amazônia, contra os isolados <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> , Levedura, <i>Trichoderma longibrachiatum</i> , <i>Aspergillus flavus</i> provenientes do jardim de fungos associados das formigas cortadeiras <i>Atta sexdens</i> .....	94
<b>Tabela 9</b> - Médias da taxa de mortalidade do jardim de fungo das formigas saúvas <i>Atta sexdens</i> .....	122
<b>Tabela 10</b> – Valores médios da atividade de corte por <i>Atta sexdens</i> em folhas de laranja ( <i>C. sinensis</i> ) pulverizadas com o “Pool” das bactérias endofíticas de quebra-pedra ( <i>Phyllanthus</i> sp.) .....	124
<b>Tabela 11</b> - Médias das áreas das folhas de laranja cortadas ( <i>C. sinensis</i> ) pelas formigas cortadeiras <i>Atta sexdens</i> .....	125

<b>Tabela 12</b> - Médias da análise do comportamento das formigas cortadeiras <i>Atta sexdens</i> . .....	126
<b>Tabela 13</b> - Quadro de médias da taxa de mortalidade do jardim de fungo das formigas saúvas .....	129
<b>Tabela 14</b> – Média do comportamento de corte das folhas de alimentação do fungo simbiote das formigas cortadeiras <i>Atta sexdens</i> .....	131
<b>Tabela 15</b> – Médias do comportamento das formigas cortadeiras <i>Atta sexdens</i> .....	132
<b>Tabela 16</b> – Médias do comportamento do fungo das formigas cortadeiras <i>Atta sexdens</i> . .....	133

# 1- REVISÃO GERAL

## 1. INTRODUÇÃO

A partir da década de 1940, o controle das pragas na agricultura baseava-se no uso prioritário de inseticidas sintéticos, objetivando eliminar os insetos-praga na agricultura. Essa visão absoluta como forma de encarar o problema teve origem na entomologia aplicada, em decorrência do desenvolvimento dos inseticidas organo-sintéticos, como os clorados, fosforados, carbamatos e clorofosforados. Os produtos eram tão baratos e de tão largo espectro, que qualquer consideração de ordem econômica ou ambiental tornava-se irrelevante (PALLADINO, 1996).

Durante os primeiros anos da década de 1940, o controle obtido com os novos inseticidas foi marcante: os campos cultivados eram territórios praticamente isentos de insetos. Com o passar do tempo, essa prática provocou sérias perturbações no meio ambiente, atingindo os ecossistemas, dada principalmente, à resistência de pragas aos inseticidas, causada pela seleção de insetos resistentes, surtos epidêmicos de pragas historicamente de importância secundária e diminuição da população de insetos benéficos. No ecossistema, foram detectados efeitos deletérios em animais selvagens, domesticados e mesmo no homem, assim como o acúmulo de resíduos tóxicos no solo, na água e nos alimentos. O controle químico de pragas, mesmo com produtos como o Dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), teve sua eficiência diminuída e seu custo aumentado até exceder níveis econômicos e socialmente aceitáveis (FLINT; VAN DEN BOSCH, 1981).

Atualmente, os métodos utilizados na proteção e defesa das culturas agrícolas vêm apresentando evolução considerável. O conhecimento e a utilização de métodos de diagnóstico envolvendo dinâmica populacional e epidemiologia, em várias culturas agrícolas, têm permitido prever a ocorrência de pragas e doenças (ZAMBOLIM, 1999).

Para a utilização racional de controle, utiliza-se o Manejo Integrado de Pragas (MIP). Este termo foi criado na metade da década de 1960, como um conceito contra a utilização maciça e abusiva de pesticidas na agricultura mundial. Desde esse período estabeleceram-se vários grupos e escolas com diferentes princípios. Em uma visão

prática, o MIP foi implementado de diversas maneiras, de acordo com as necessidades locais e a disponibilidade ou ausência de conhecimentos e instrumentos. Ele varia de um simples controle químico supervisionado de doenças e pragas a programas muito sofisticados incluindo o uso de modelos de população, sistemas computadorizados de previsão de doenças e, mais recentemente, a utilização da agricultura de precisão (AZEVEDO, 1999 *apud* ZAMBOLIM, 1999; CROCOMO, 1990).

Medidas de controle que causem menor impacto ambiental são de primordial importância, o que vem estimulando o ressurgimento do uso do controle biológico. Nas últimas décadas, alguns bioinseticidas à base de microrganismos entomopatogênicos estão sendo utilizados, sendo as bactérias as mais utilizadas, devido à facilidade de fermentação em meio líquido e da formulação (VILELA et al., 2008). Logo, é de vital importância a realização de novos ensaios utilizando-se estratégias não convencionais e alternativas no controle de pragas agrícolas. Nesse contexto, o emprego de microrganismos endofíticos para o controle biológico das formigas cortadeiras tem um aspecto inovador.

## **1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1.1 As formigas cortadeiras**

As formigas representam uma das sociedades mais complexas da ordem Hymenoptera, família Formicidae, e sua existência data de cerca de 100 milhões de anos, desde o período Cretáceo (SOUZA et al., 2006). A maioria das espécies de formigas se alimentam de outros insetos. A tribo Attini está no ápice da maior subfamília de formigas, denominada Myrmicinae (WEBER, 1982), cujos membros caracterizam-se por serem simbioses obrigatórios de um fungo utilizado como alimento (RIBEIRO, 2000). O fungo é cultivado no interior dos ninhos, nas chamadas “painéis subterrâneos” ou “jardins de fungo” (BASS, CHERRET, 1995) que podem ser um amplo jardim (50 cm de diâmetro) ou vários pequenos jardins (25 a 30 cm) (SILVA-PINHATI, 2005), conforme a espécie de formiga considerada.

Segundo Della Lucia (2011), a tribo Attini abrange 16 gêneros e cerca de 210 espécies. Os gêneros primitivos *Cyphomyrmex*, *Mycetophylax*, *Mycocepurus*, *Myrmicocrypta*, *Apterostigma*, *Mycetosoritis* e *Mycetarotes* utilizam fezes e carcaças de insetos ou matéria vegetal em decomposição como substrato para o fungo. O gênero *Pseudoatta* abrange espécies parasitas e são destituídas de operárias. Os gêneros *Trachymyrmex*, *Sericomyrmex*, *Attaichnus*, *Kalathomyrmex*, *Paramycetophylax*, *Acromyrmex* (quenquéns) e *Atta* (saúvas) pertencem ao grupo chamado Attini superiores. Brandão e Mayhe-Nunes (2001) descreveram um novo gênero, *Mycetagroicus*, o qual abrange três novas espécies.

Somente as formigas do gênero *Acromyrmex* e *Atta* são conhecidas como cortadeiras de folhas, pois cultivam seu fungo predominantemente sobre fragmentos frescos de origem vegetal (folhas e flores, principalmente) (VILELA et al., 2008). Segundo Wilson et al., (1982), *Acromyrmex* e *Atta* são também os gêneros mais evoluídos, apresentando polimorfismo e ninhos complexos. Della Lucia (1993) relata ainda a presença de castas distintas, ou seja, divisão de tarefas, na qual a rainha desempenha a função exclusiva de reprodução, os soldados protegem o formigueiro, as operárias são responsáveis pelo forrageamento e as jardineiras cuidam dos jardins de fungo.

Em certas épocas do ano (geralmente entre outubro e dezembro), os formigueiros adultos produzem formas aladas e férteis (MARICONI, 1985). Durante o vôo nupcial ou revoada, ocorre a fecundação das fêmeas (popularmente conhecidas como “içás”) pelos machos (conhecidos como “bitus”) (VILELA et al., 2008).

Ao deixar o ninho para iniciar o vôo nupcial, a rainha virgem leva uma pequena parte do micélio do fungo simbiote na cavidade posterior à boca (cavidade infrabucal) para com ele iniciar um novo jardim de fungo no futuro formigueiro (MARINHO, 2005).

Ao iniciar a nova colônia, esta pequena porção de fungo recebe muita atenção, sendo adubado com gotículas fecais. No quarto ou quinto dia, já se notam filamentos na cultura do fungo sobre a qual, iniciada a postura, são depositados os ovos, que em 45-60 dias darão origem às diferentes castas de formigas operárias (MARINHO, 2005). Quando

o fungo está desenvolvido, as jardineiras continuamente retiram pedaços de micélio, os quais são utilizados para a alimentação, principalmente das larvas. Pelo trabalho contínuo das forrageadoras, o fungo tem sempre condições de se renovar e expandir. Por outro lado, a matéria vegetal esgotada pelo fungo é retirada e conduzida às “panelas” de lixo (onde são também depositadas as formigas mortas) (MARICONI, 1985).

As formigas da tribo Attini ocorrem exclusivamente no continente Americano (aproximadamente 40° Latitude Norte à 44° Latitude Sul), mas espécies economicamente importantes (*Atta* spp.) distribuem-se em faixas menores (WEBER, 1966), não havendo relatos de sua ocorrência no Chile e em algumas ilhas das Antilhas (MARINHO, 2005). Este gênero possui colônias que chegam a milhões de operárias e podem viver mais de 10 anos (WEBER, 1966). Seu prejuízo à agricultura deve-se à derrubada das florestas naturais para as práticas de monocultura (especialmente de citros, cana de açúcar, café, cacau, entre outros), o que acarretou um desequilíbrio ecológico proporcionando condições ideais para o estabelecimento e proliferação de colônias das formigas cortadeiras (VILELA et al., 2008). Das quinze espécies de *Atta* existentes, ocorrem no Brasil (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990): *A. bisphaerica* Forel, *A. capiguara* Gonçalves, *A. cephalotes* L., *A. goiana* Gonçalves, *A. laevigata* Smith, *A. opaciceps* Mayr, *A. robusta* Borgmeier, *A. silvae* Gonçalves, *A. vollenweideri* Jonkman e *A. sexdens* (representada pelas subespécies *A. sexdens rubropilosa* Forel, *A. sexdens piriventris* Santschi e *A. sexdens sexdens* Santschi). A distribuição geográfica abrange todo o território nacional, exceto Fernando de Noronha (MARICONI, 1970, 1976; DELLA LUCIA; VILELLA, 1993). A espécie mais conhecida e economicamente e mais importante da América do Sul é *A. sexdens*, causando maiores prejuízos à lavoura (VILELA et al., 2008).

Devido à dificuldade do seu controle, caracteriza-se como uma das pragas que causam mais danos à agricultura nacional (MARICONI, 1985).

### 1.1.2 História de vida das cortadeiras

A agricultura, uma forma especializada de simbiose, evoluiu em apenas quatro grupos de animais: besouros ambrósia, cupins, formigas e humanos (SCHULTZ e BRADY, 2008). Os primeiros, insetos coleópteros representantes da família Curculionidae, subfamílias Scolitynae e Platypodinae, recebem essa denominação por se alimentar de um tipo de fungo chamado ambrósia, um ascomiceto derivado de fungos fitopatogênicos. Eles são transportados e cultivados nas galerias construídas por estes besouros na madeira. A associação originou-se entre 20-60 milhões de anos atrás (FARRELL et al., 2001). Cupins da subfamília Macrotermitinae, encontrados na África e Ásia, cultivam *Termitomyces* sp., um fungo basideomiceto. Ele funciona como um estômago externo desses insetos, sendo responsável pela quebra da celulose (AANEN et al., 2002). O fóssil mais antigo da associação fungo-térmita data de 7 milhões de anos (DURINGER et al., 2006), mas o provável surgimento da simbiose é de 24-34 milhões (Oligoceno), nas florestas africanas após a separação dos continentes (EMERSON, 1955), em um evento único (AANEN et al., 2002). Formigas da tribo Attini também cultivam um fungo basidiomiceto, do qual elas dependem para sua nutrição. Análises filogenéticas apontam para uma origem dessa associação há 50 milhões de anos (SCHULTZ e BRADY, 2008). O homem, uma espécie animal muito recente, iniciou a domesticação de plantas e animais selvagens no Holoceno, há 10.000 anos, um momento crucial para nosso sucesso evolutivo (DIAMOND, 2002).

A fungivoria é um hábito raro entre os animais, mesmo que fungos sejam um recurso abundante, crescendo principalmente nas florestas úmidas tropicais. Compostos altamente tóxicos produzidos por vários desses organismos atuam dissuadindo muitos predadores em potencial (WICKLOW, 1988). Ainda assim, a fungivoria tem sido relatada em alguns poucos gêneros de formigas, havendo a possibilidade de descoberta de novas espécies à medida que sejam estudados os hábitos de vida de milhares de espécies tropicais, a grande maioria desconhecida. Por exemplo, recentemente foi relatada a descoberta de uma nova estratégia de vida em formigas. *Euprenolepis procera*, uma espécie Formicinae das florestas tropicais do sudeste asiático, é especializada em forragear cogumelos (WITTE e MASCHWITZ, 2008). Por se tratar de um recurso

variável no tempo-espaco, essas formigas possuem hábitos nômades e tem desenvolvido capacidade de processar e assimilar esse recurso. A fungivoria tem sido também relatada em formigas especialistas em predação do fungo cultivado pelas Attini, como *Gnamptogenys hartmani* Wheeler (DIJKSTRA e BOOMSMA, 2003) e espécies de *Megalomyrmex* (MULLER et al., 2000). Além de utilizarem o fungo na alimentação, as formigas podem usá-lo para reforçar a parede dos seus ninhos ou túneis de passagem, como é o caso de *Azteca brevis* (MAYER e VOGLMAYR, 2009).

As formigas da tribo Attini foram além da simples fungivoria, pois também cultivam o fungo simbiote e asseguram a sua reprodução clonal (AUTUORI, 1956).

O transporte de folhas pelas formigas para o interior do seu ninho já era mencionado no mito da criação dos povos maias e chamou a atenção dos primeiros colonizadores europeus que chegaram às Américas. No entanto, apenas em 1874 foi proposta a finalidade real das folhas cortadas e de outros fragmentos vegetais que esses insetos transportavam para seus formigueiros (BELT, 1874): elas cultivavam um fungo utilizado na sua alimentação (revisto por AUTUORI, 1949). Posteriormente, Alfredo Moeller estudou minuciosamente a relação fungo-formiga, tendo sido o primeiro a propor uma classificação do fungo, *Rhizites gongylophora* (MOELLER, 1941).

Schultz e Brady (2008) esclareceram os passos que levaram, a partir de uma agricultura simples, até a agricultura mais complexa da tribo Attini (DELLA LUCIA, 2011). Essas formigas constituem um grupo monofilético, um clado incluindo todas as espécies derivadas de um único ancestral (SCHULTZ e MEIER, 1995), com distribuição exclusiva no Novo Mundo e aparente centro de diversidade nas regiões quentes do Neotrópico. Baseado em análises moleculares, foi estabelecido que, muito provavelmente, a agricultura entre as formigas teve uma única origem há 50 milhões de anos, isto é, após a separação da América do Sul e da África, que se deu há 90 milhões de anos (SCHULTZ e BRADY, 2008). Este período coincidiu com o ótimo climático do Eoceno (50-55 ma), que foi um período de aquecimento global, no qual surgiu uma grande diversidade de plantas.

A agricultura de Attini pode ser dividida em cinco sistemas distintos, por ordem de evolução:

1. **Agricultura inferior** – praticada pela maioria das espécies da tribo incluindo espécies do gênero *Myrmicocripta*, *Apterostigma*, *Mycetophylax*, *Mycetarotes*, *Mycetosoritis* e *Cyphomyrmex*. São espécies que usam como substrato do fungo partes mortas de plantas, carcaças de invertebrados e, ou, fezes de insetos. Elas cultivam um fungo menos especializado (Lepiotaceae), que se assemelha bastante geneticamente às espécies próximas de vida livre, sendo mesmo capaz de manter uma vida livre sem a ajuda das formigas. Existem evidências crescentes de que todos os fungos cultivados pelas Attini inferiores tenham parentes próximos de vida livre (VO et al., 2009). A aquisição de novos cultivares pode ocorrer entre essas formigas, desde que alguns cultivares possam exibir uma vida livre e uma em simbiose. Um clado parafilético (que inclui um grupo de descendentes de um ancestral comum, porém não contém a totalidade dos descendentes) do fungo parasita *Escovopsis* infecta esse jardim de fungo.

2. **Agricultura de um fungo Pterulaceae** – o grupo *Pilosum* do gênero *Apterostigma* iniciou o cultivo de um fungo fora da família Lepiotaceae, um fungo pertencente à família Pterulaceae, muito próximo dos gêneros *Pterula* e *Deflexula*. Essa transição única para um fungo simbiote de outra família se deu há 20 milhões de anos. Esse simbiote também é parasitado por uma espécie especialista de *Escovopsis*, derivada do parasita das Attini inferiores.

3. **Agricultura de leveduras** – diferentemente dos jardins de fungo na forma de micélio, esses jardins de fungo consistem de nódulos pequenos, crescendo na forma de levedura. Essa forma está restrita ao grupo rimosus do gênero *Cyphomyrmex*, e originou-se entre 5-25 milhões de anos atrás. Esse fungo também é capaz de uma existência selvagem, mas, nesta situação, cresce na forma de micélio. Ainda não se conhece um parasita *Escovopsis* nessa associação, o que sugere que a forma de levedura resiste ou previne a infecção por *Escovopsis*.

4. **Agricultura superior (incluindo as formigas cortadeiras)** – a transição para uma agricultura superior e, posteriormente, a utilização de partes frescas de plantas, recurso abundantemente disponível, foi o evento ecológico mais significativa da tribo Attini. Os fungos cultivados por essas formigas (*Sericomyrmex*, *Trachymyrmex*,

*Acromyrmex* e *Atta*) exibem alto grau de “domesticação”, quer dizer, uma série de adaptações para a vida conjunta com Attini, sendo assim provavelmente incapaz de levar uma vida livre. Além disso, somente o fungo simbiote das Attini superiores produz a *gongylidia*, estrutura especializada da hifa que acumula nutrientes e é preferencialmente consumida pelas formigas.

5. **Gêneros *Atta* e *Acromyrmex*** – os gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, em vez de utilizar partes mortas de plantas, cadáveres de invertebrados e fezes de insetos, passaram a usar essencialmente partes frescas de plantas. Embora algumas espécies do gênero *Trachymyrmex*, particularmente o grupo *septentrionalis*, também utilizem partes verdes de plantas e algumas espécies de *Sericomyrmex* o façam ocasionalmente, apenas os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* são considerados as verdadeiras formigas cortadeiras, pois todas as espécies dos gêneros utilizam partes verdes de plantas. O surgimento das cortadeiras se deu entre 5 e 15 milhões de anos atrás, um período que coincide com a expansão de pastagens na América do Sul. Essa coincidência suporta a hipótese proposta por Fowler de que as primeiras formigas cortadeiras eram cortadeiras de monocotiledôneas e a utilização de um espectro mais largo de plantas teria surgido secundariamente (FOWLER, 1983).

### 1.1.3 Origem da agricultura das formigas

Existem dois modelos principais que ordenam os estágios evolutivo-comportamentais que culminaram na fungicultura dos Attini. O mais tradicional, e amplamente aceito, proposto por Weber (WEBER, 1958; 1972), postula que as formigas praticavam a micofagia (primeiro o consumo); em seguida, elas adquiriram a habilidade de cultivá-lo (cultivo); finalmente, surgiu a transmissão vertical do fungo simbiote. O modelo alternativo reordena esses eventos, ressaltando-se que a dispersão do fungo teria surgido primeiro (primeiro a transmissão). Posteriormente, as formigas passaram a consumir o fungo (consumo) e depois a cultivá-lo (cultivo) (BAILEY, 1920). Dentro desses dois modelos, sete hipóteses tem sido propostas para explicar a origem da fungicultura em Attini, todas diferindo quanto ao substrato utilizado no cultivo do fungo simbiote: sementes, madeira, serrapilheira, micorrizas, refugio de artrópodes, material

componente da parede do ninho e o “pellet” infrabucal. Nas seis primeiras hipóteses, as formigas têm papel ativo na origem da simbiose formiga-fungo. Apenas a última, do “pellet” infrabucal, assume que o início dessa simbiose esteve sob o controle do fungo, o qual, inicialmente, utilizava as formigas como agentes da dispersão de esporos e micélio e, posteriormente, passou a servir como componente da dieta delas (MÜELLER et al., 2001). Suporte mais consistente para qualquer uma dessas hipóteses viria com a descoberta do grupo irmão dos Attini, pois ajudaria a revelar os hábitos alimentares da espécie ancestral. Infelizmente, até o presente, a elucidação do grupo irmão ainda encontra-se confusa (SCHULTZ e BRADY, 2008). A origem filogenética da tribo Attini permanece obscura. Em 1895, Carlo Emery propôs que a tribo Attini estava próxima da tribo *Ochetomyrmicini*, que inclui dos gêneros *Wasmannia*, *Ochetomyrmex* e *Blepharidatta*. Igualmente tem sido proposta a tribo Dacettini e o gênero *Proatta* (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990). A observação do hábito de vida de espécies desses gêneros, como *Blepharidatta brasiliensis* (RABELING et al., 2006), sugere que o ancestral Attini foi provavelmente um habitante da serrapilheira, construindo ninhos pequenos a médios (20-200 operárias), entre as folhas ou debaixo de troncos na floresta tropical. No entanto, até o presente, nenhuma análise filogenética tem sugerido, com grande probabilidade, o grupo irmão de Attini. Não surpreenderia se o grupo irmão de Attini ainda estivesse por ser descoberto. A própria relação filogenética da tribo Attini não está bem estabelecida, com muitas espécies podendo ser acomodadas em diferentes gêneros e novos gêneros serem criados para acomodar espécies que não se classificam em nenhum dos gêneros de Attini (BRANDÃO, 2007).

Em sua quase totalidade, o fungo cultivado pelas Attini pertence a dois gêneros *Leucoagaricus* e *Leucocoprinus*, pertencentes à tribo Leucocoprineae, da família Lepiotaceae (Agaricales – Basidiomycota). A exceção encontra-se no fungo cultivado por um grupo de espécie do gênero *Apterostigma*, que secundariamente cultivava um fungo da família Pterulaceae. Essa foi uma derivação ocorrida dentro de *Apterostigma*, ressaltando-se que as espécies basais do gênero cultivam um fungo da família Lepiotaceae.

Especies de *Cyphomyrmex* do grupo *rimosus* cultivam seu fungo simbiote como levedura (forma unicelular) em vez de micélio. Isso fez supor que essa forma fosse a ancestral, mas análises filogenéticas evidenciaram que se trata de uma forma derivada de *Cyphomyrmex* que cultiva a forma típica, isto é, micelial.

#### **1.1.4 O gênero *Atta***

Nas saúvas (Figura 1), a diferenciação morfológica entre as operárias é bem mais visível do que nas quenquéns. Ambos os gêneros de formigas cortadeiras apresentam castas permanentes e temporárias. Essas últimas constituem as centenas ou milhares de fêmeas aladas e milhares de machos alados que somente aparecem no interior das colônias em determinadas épocas do ano, vindo à superfície dos ninhos durante a revoada ou vôo nupcial (DELLA LUCIA, 2003).

Em *Atta* os indivíduos machos, comumente denominados “bitus”, apresentam o tórax e o abdome muito desenvolvidos em comparação com a cabeça e as mandíbulas. Segundo Hölldobler e Wilson (1990), os machos não desempenham uma função específica na colônia que os gerou e apenas recebem alimento de suas irmãs, enquanto aguardam o vôo nupcial. Porém, acredita-se que eles poderiam auxiliar nos processos de aeração das larvas e resfriamento da colônia com o bater das asas. Na maioria das vezes, nem são considerados uma casta. Sua longevidade é curta, morrendo logo após o vôo nupcial. As fêmeas aladas apresentam a cabeça, as mandíbulas, o tórax e o gáster bastante desenvolvidos e são chamadas, vulgarmente, de “içás”, rainhas ou tanajuras (WILSON, 1971).



**Figura 1** – Formiga cortadeira *Atta laevigata* (saúva) fazendo a nidificação. Fonte: [www.provenatnews.blogspot.com](http://www.provenatnews.blogspot.com)

As castas permanentes, no caso de *Atta*, abrangem uma fêmea áptera (chamada rainha), fundadora do saueiro, que constitui a casta reprodutiva, podendo viver por cerca de 20 anos em laboratório (DELLA LUCIA, 2003). É quase sempre única na colônia, embora escavações de saueiros de *A. texana*, realizadas por Moser e Lewis (1981), tenham possibilitado a observação de mais de uma rainha na colônia.

Também fazem parte da casta permanente, as inúmeras operárias que se encarregam das diversas tarefas na colônia, sendo todas estéreis.

### **1.1.5 O gênero *Acromyrmex***

Este gênero difere de *Atta* por apresentar quatro pares de espinhos dorsais. Em *Acromyrmex*, os inúmeros machos alados geralmente não recebem nomes comuns e as várias fêmeas aladas são chamadas de rainhas, constituindo a casta temporária nas colônias. Esses indivíduos são maiores que as operárias ápteras, porém, proporcionalmente menores em relação aos alados de *Atta* (DELLA LUCIA, 2003).

A casta permanente é composta por uma rainha reprodutiva, que nem sempre é única. São vários os trabalhos que relatam a poliginia no gênero (DELABIE, 1989; DELLA LUCIA, 2003). Em *A. octospinosus* (Figura 2), a rainha pode sobreviver até 10 anos em laboratório (HERNÁNDEZ et al., 2002).



**Figura 2** – Fêmea de *A. octospinosus*. Fonte: [www.agrolink.com.br](http://www.agrolink.com.br)

As operárias ápteras apresentam vários tamanhos e desempenham diferentes funções. Existe, nitidamente, um grupo de operárias mínimas mais envolvidas nos cuidados com o fungo simbiote, no recolhimento dos ovos do gáster da rainha e nos cuidados com a prole. Outro grupo faz o forrageamento, que envolve exploração e recrutamento para o corte e o transporte do material vegetal cortado até o ninho, bem como sua degradação inicial antes de ofertá-lo ao fungo. Atividades de escavação e descarte do lixo, bem como a defesa da colônia, também são desempenhadas por essas operárias. VILELA et al., (2008) verificaram diferenças anatômicas nas glândulas de veneno das operárias de três tamanhos de cápsula cefálica, em *A. subterraneus subterraneus*. Isso talvez signifique a existência de três castas polimórficas, mas não poliéticas, com relação à largura da cápsula cefálica: mínima (0,90 a 1,00 mm), média (1,69 a 1,83 mm) e máxima (2,28 a 2,38 mm).

### **1.1.6 O Fungo Simbiote**

A grande maioria dos fungos cultivados pelas formigas da tribo *Attini* pertencem a dois gêneros, *Leucocoprinus* e *Leucoagaricus* (tribo *Leucocoprinae*, Família Lepiotaceae) (ANTUNES et al., 2005), com exceção do gênero *Apterostigma*, a qual cultiva um fungo da família Tricholomataceae (CHAPELA et al., 1994).

Trabalhos envolvendo formigas cultivadoras de fungo, concluíram que sua evolução é muito mais abrangente do que se esperava, sendo que, em algumas espécies

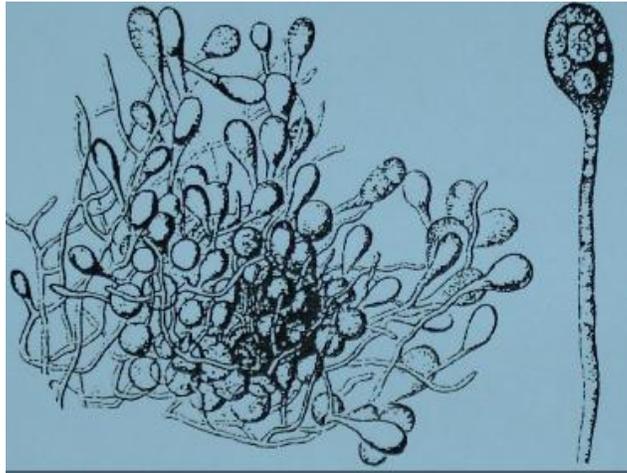
de *Attini* inferiores, a transmissão do fungo simbiote não ocorre apenas por “transmissão vertical” (intra específica), mas também, por “transmissão lateral” (inter específica) (MÜLLER et al., 1998, 2001; GREEN et al., 2002; ANTUNES et al., 2005).

O fungo foi visto pela primeira vez em seu estado perfeito por Möller (1893), em ninho de *Acromyrmex disciger* Mayr., sendo classificado como o basidiomiceto *Rozites gongylophora*. Posteriormente, Weber (1958) reclassificou-o em outro gênero, *Lepiota*, analisando material de ninhos de *Cyphomyrmex costatus* Mayr. Heim em 1957 relacionou-o aos gêneros *Leucocoprinus* e *Leucoagaricus* modificando novamente sua classificação. Weber (1979) denominou-o *Leucocoprinus gongylophorus*, sendo confirmado por Bononi et al. (1981).

Uma das dificuldades na identificação do fungo simbiote se deve ao fato de que a fase sexuada não é muito comum, pois as formigas limitam o seu desenvolvimento a uma fase vegetativa (ANTUNES et al., 2000), resultando na ausência das estruturas de frutificação e dificultando sua taxonomia. No entanto, alguns casos já foram observados (BONONI et al., 1981; MUCHOVEJ et al., 1991; CRUZ; BATISTA-FILHO, 1993; PAGNOCCA et al, 2001).

Após as análises das descrições morfológicas de basidiomas fúngicos realizadas anteriormente, Singer (1986) renomeou o fungo das formigas *Attini* como *Leucoagaricus gongylophorus*, denominação, aceita atualmente. Como todas essas descrições foram baseadas em aspectos morfológicos e muitas vezes, em ninhos mortos ou em processo de regressão, a suspeita de que tais estruturas poderiam pertencer a contaminantes nunca foi completamente descartada. Entretanto, Pagnocca et al. (2001), descreveram a ocorrência da fase sexuada do fungo em um ninho natural de *Ac. fallax* Santschi comprovando pela primeira vez, através de técnicas moleculares (RAPD), tratar-se do *Leucoagaricus gongylophorus* e não de um eventual contaminante.

O fungo produz estruturas especializadas chamadas gongilídeos (Figura 3), as quais constituem um entumescimento da porção terminal das hifas, ricos em lipídeos e carboidratos (QUILAN; CHERRET, 1979; ANTUNES et al., 2000) e que são fornecidos diretamente na boca das larvas, pelas operárias que as alimentam.



**Figura 3** – Esquema de um conjunto de gongilídeos, à direita esquema de uma hifa com gongilídeos (Fonte: Clémenton, 2004).

### **1.1.7 A simbiose formiga-fungo.**

Mutualismo é definido como uma interação benéfica recíproca entre diferentes organismos. No caso dos insetos, é estimado que 15 a 20% vivem em simbiose com microrganismos (BUCHNER, 1965 apud BORSAUX-EUDE; GROSS, 2000).

A associação formiga-fungo é muito antiga, datando de 45-60 milhões de anos (MÜLLER et al., 2001), mas até hoje não está totalmente desvendada. Para alguns autores, o fungo serve como principal fonte de alimento das operárias adultas, bem como das larvas (BIGI et al., 2004), sendo que as larvas e adultas preferem o estáfido (conjunto de gongilídeos), ao invés da hifa para sua alimentação (BIGI et al., 2004). Esta escolha pode ser explicada pelo acúmulo de nutrientes do gongilídeo, o qual disponibiliza para as formigas, uma concentração maior de nutrientes de fácil assimilação, o que não ocorreria em uma hifa normal (ANGELI-PAPA; EYME, 1985). Por outro lado, Bass e Cherret (1995) concluíram que o fungo participa como alimento para as operárias apenas na ordem de 9%, sendo o restante obtido das seivas das plantas durante o corte.

Algumas enzimas produzidas pelo fungo são ingeridas, concentradas pelas formigas e depois excretadas através do líquido fecal, que é rico em enzimas digestivas (proteínases, pectinase e amilase) podendo atuar na degradação do material vegetal (BOT et al., 2001).

Silva (2000), utilizando análises enzimáticas, concluiu que as formigas servem de “reservatório” de pectinases para o fungo e este, por sua vez, contribui com a fonte nutricional e as enzimas necessárias para a manutenção das formigas, caracterizando, assim, uma relação mutualística. Tal associação se justifica também pela capacidade metabólica do fungo de converter celulose e outros polímeros vegetais em produtos que poderiam ser metabolizados pelas formigas (D’ETORRE, HEINZE, 2001).

O fungo também possui a habilidade de detoxificar certos metabólitos secundários vegetais, os quais podem ter propriedades inseticidas (BOT et al., 2001) e assim podem oferecer uma vantagem adicional às formigas.

Cherret (1980) descreveu que o mutualismo entre as formigas cortadeiras de folhas e o fungo simbiote aumenta o grau de polifagia através da degradação desses compostos químicos que promovem a defesa das plantas, aumentando assim, o nicho alimentar de ambos.

Nesta relação mutualística, as formigas beneficiam seu fungo pela remoção das barreiras físicas como pêlos e ceras, além de outras que a planta apresenta, visando à proteção contra a entrada de fungos patogênicos (D’ETORRE, HEINZE, 2001).

O tratamento do material vegetal antes de ser ofertado ao fungo consiste na eliminação de barreiras físicas e microrganismos presentes nas folhas e aumento da superfície de contato. As formigas produzem substâncias com propriedades antibióticas em suas glândulas metapleurais (ácido fenilacético, ácido 3-hydroxidecanóico ou mirmicacina e ácido indolacético) (HUGHES, BOOMSMA, 2004), as quais atuam na limpeza dos fragmentos vegetais trazidos ao formigueiro. Porém, sabe-se que nenhum desses compostos são tão potentes a ponto de garantir a estabilidade do formigueiro (MARINHO, 2005).

### 1.1.8 *Streptomyces*

Currie et al. (1999a) observaram ainda a existência de um terceiro mutualista na simbiose formiga cortadeira-fungo. Trata-se de um actinomiceto do gênero *Streptomyces*. Nos gêneros mais primitivos de formigas, *Apterostigma* e *Myrmicocrypta*, a bactéria se encontra nas pernas dianteiras, enquanto que nas *Attini* superiores, *Trachymyrmex* e *Acromyrmex*, são mais concentradas na propleura. Ao menos nestas duas últimas espécies, a bactéria não é encontrada nos machos e é abundante nas rainhas virgens, sugerindo uma “transmissão vertical” (CURRIE, 2001).

Segundo Currie et al. (1999a), a função desta bactéria consiste em produzir uma substância com potencial antibiótico capaz de evitar infecções microbianas nos ninhos, especialmente em relação ao *Escovopsis* spp.. Além disso, nesses estudos conduzidos pelos autores, o filtrado das culturas dessa bactéria promoveu um aumento do crescimento do fungo simbiote de *Apterostigma* ( $47,9 \pm 7,6$  mg de peso seco contra  $5,3 \pm 2,4$  mg de peso seco do controle negativo). Dessa forma, os autores concluíram que alguma substância produzida pela bactéria pode também estimular o crescimento do fungo, beneficiando indiretamente as formigas. No entanto, o fungo utilizado para o experimento de Currie et al., (1999a) não é da mesma família dos fungos cultivados pelas demais formigas da tribo *Attini*, fungos da família Pterulaceae e Lepiotaceae, podendo então, esse resultado ser exclusivo desses gêneros. Um outro benefício para as formigas descrito por Currie (2001), é que esta bactéria pode também protegê-las de patógenos potenciais. Em contrapartida, as formigas dispersam os *Streptomyces* e lhes propiciam um nicho especial, além de lhes fornecer nutrientes para seu crescimento.

### 1.1.9 Métodos de controle das formigas-cortadeiras

As formigas cortadeiras têm sido alvo de várias tentativas de controle (Tabela 1) que incluem desde receitas caseiras, que passam de geração em geração, até recursos de

alta tecnologia. O primeiro registro de combate às saúvas ocorreu em 1587 e consistia em proteger as árvores atacadas isolando-as com água (MARINHO, 2005).

**Tabela 1** – Métodos utilizados para o combate às Formigas Cortadeiras.

<b>Produtos e / ou técnicas utilizadas para o Controle das Formigas Cortadeiras</b>
<b>Pó seco</b>
<b>Iscas Granuladas</b>
<b>Termonebulização</b>
<b>Uso de barreiras físicas de proteção</b>
<b>Escavação dos formigueiros</b>
<b>Controle biológico</b>
<b>Uso de plantas inseticidas</b>

Fonte: Adaptado Lima et al., 2001.

Atualmente, essas formigas podem ser controladas com barreiras físicas, métodos culturais, biológicos e químicos. Entretanto, o controle químico é o mais empregado e disponível comercialmente, embora apresente algumas limitações (VILELA et al., 2008). As estratégias de controle químico diferem, principalmente, pelo tipo de formulação, modo de aplicação e princípios ativos de diversos grupos químicos (TONHASCA JR. et al., 2001). Entre tais estratégias, as iscas tóxicas destacam-se por oferecerem maior segurança ao aplicador, dispensarem mão-de-obra e equipamentos especializados e permitirem o tratamento de formigueiros em locais de difícil acesso (VILELA et al., 2008).

Os inseticidas utilizados para o controle das formigas muitas vezes não produzem bons resultados. Isso ocorre devido ao emprego de formicidas não eficazes, às dosagens erradas, à distribuição parcial do formicida, entre outros.

Mesmo quando empregados de maneira correta, os inseticidas utilizados no controle de formigas cortadeiras e outras pragas podem causar vários problemas, como: a) sua toxicidade de amplo espectro, a qual atinge insetos inócuos ou benéficos, causando um desequilíbrio ecológico no ecossistema; b) o uso em grande escala associado a uma alta persistência no ambiente, os inseticidas incorporam-se na cadeia alimentar do homem, com efeito cumulativo e prejuízos para a saúde; c) resistência adquirida pelos insetos (LOPEZ, ORDUZ, 2003).

Até pouco tempo, o controle das saúvas e quenquéns era realizado basicamente através do uso de produtos organoclorados, em diferentes tipos de formulação e técnicas de aplicação.

O sucesso do produto comercial Mirex<sup>®</sup> (dodecacloro), segundo Cherret (1986), foi atribuído à falta de repelência das iscas, ação lenta do tóxico, possibilitando uma completa incorporação nos jardins de fungo (VILELA et al., 2008), além da estabilidade química e persistência, que permitiram ao composto, resistir ao metabolismo do fungo. Além de eficiente, apresentava baixo custo no mercado brasileiro.

No entanto, o dodecacloro apresenta extrema persistência e estabilidade em ambiente natural, além do poder de se acumular no tecido adiposo.

Com a proibição do uso dos organoclorados no Brasil em 1985, surgiu a necessidade de testar novas substâncias em iscas granuladas para o controle das formigas cortadeiras. Desde então, têm sido introduzidos novos compostos, dentre eles a sulfluramida, que atua na fosforilação oxidativa, interrompendo a produção de ATP (adenosina trifosfato), o diflubenzuron, que é um regulador de crescimento, o fenoxicarbe, que não possui efeito inibitório para *Atta sexdens*, a avermectina B1, que é fotodegradável, entre outros.

Dos novos grupos químicos, merecem destaque pelas boas qualidades formicidas, os inseticidas fipronil e hidrametilona, que atuam no sistema nervoso central dos insetos (LOPEZ, ORDUZ, 2003).

A termonebulização é outro método que tem sido empregado no controle de formigas cortadeiras, principalmente à base de inseticidas piretróides e fosforados. No entanto, o custo para aquisição, transporte e manutenção do equipamento, a formulação especial do inseticida, o gasto de tempo e o risco de intoxicação dos operadores, constituem desvantagens consideráveis (LARANJEIRO; LOUZADA, 2000).

### **1.1.10 Microrganismos Endofíticos**

O termo endófito foi mencionado pela primeira vez no início do século XX, para definir todos aqueles organismos que colonizam tecidos internos de plantas, mas foi Bary, em 1866, quem primeiro delineou uma possível distinção destes, com patógenos de plantas (AZEVEDO, 1998). Carroll (1986) restringiu o uso do termo endófito a microrganismos que causam infecções assintomáticas nos tecidos internos de plantas, excluindo os fungos patogênicos e mutualistas, tais como micorrizas. Petrini (1991) propôs a expansão da definição de Carroll, incluindo todos os organismos que habitam órgãos de plantas que, em algum período do seu ciclo de vida, colonizam tecidos internos da planta, sem causar dano aparente a seu hospedeiro. De acordo com este autor, estariam sendo considerados aqueles endófitos que apresentam uma fase epifítica um tanto longa, bem como patógenos latentes que podem viver assintomaticamente em seus hospedeiros por algum tempo de seu ciclo de vida.

Os microrganismos endofíticos foram considerados assintomáticos, ou seja, não produzem efeitos benéficos ou prejudiciais aos seus hospedeiros, até o final da década de 70. Porém, cada vez mais, novas funções e atividades vêm sendo atribuídas aos microrganismos endofíticos, conseqüentemente, vão surgindo novas possibilidades para o uso desses microrganismos em processos biotecnológicos. Fungos e bactérias endofíticos estão sendo utilizados no controle biológico como vetores para introdução de genes em

plantas e como produtores de fármacos (SALLES et al. 2000; ZHANG et al. 2006; STROBEL, DAISY 2003; BILLS et al. 2002).

Os endófitos produzem enzimas, antibióticos, substâncias anticancerígenas, gomas, auxinas, giberelinas. São responsáveis pela fixação do nitrogênio, podem solubilizar fosfatos e ser usados como agentes de controle biológico etc. (SOUZA, 2006; STROBEL, 2002; STROBEL et al. 1996).

A maioria dos estudos com os microrganismos endofíticos se concentra em plantas de climas temperados e somente mais recentemente esses estudos se voltaram para as plantas de clima tropical sendo que, também nestes casos, resultados interessantes vêm se confirmando e até ampliam-se as perspectivas de aproveitamento biotecnológico (SAMUELS, 2004; STROBEL, 2002; SOUZA et al. 2004; HANADA et al. 2009).

Atualmente, sabe-se que a biodiversidade microbiana é bem maior do que aquela, anteriormente estimada. Assim, tornam-se especialmente promissoras as investigações sobre a microbiota endofítica de plantas da Amazônia.

Considerando a importância dos microrganismos, o pouco que se conhece da biodiversidade existente e ainda a importância de explorar novos ecossistemas especiais, justificam-se essa abordagem utilizando-se os microrganismos endofíticos. A biodiversidade microbiana no interior das plantas é quase que totalmente desconhecida e especialmente nas plantas da Amazônia. Os dados de pesquisa nessa área na região ainda são preliminares, frutos de poucas teses, dissertações e de trabalhos de iniciação científica (PEREIRA et al. 2007).

## 1.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AANEN, D.K.; EGGLETON, P.; ROULAND-LEFÈVRE, C. ; GULBERG-FROSLEV, T. ; ROSENDAHL, S.R. ; BOOMSMA, J.J. 2002. The evolution of fungus-growing termites and their mutualistic fungal symbionts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.99 n. 23, 14887-14892 p.

ANGELI-PAPA, J.; EYME, J. 1985. Le champignon cultivés par les fourmis attine. **Ann. Sci. Nat. Bot. Paris**,7: 103-129 p.

ANTUNES, L.E.C.; CHALFUN, N. N. J.; REGINA, M. de A.; HOFFMANN, A. 2000. Blossom and ripening periods of blackberry varieties in Brazil. **Journal American Pomological Society**, Virginia, v.54, n.4, 164-168 p.

ANTUNES, L.E.C. 2005. Potencial de produção de pequenas frutas em diferentes regiões do Sul do Brasil. In: Encontro nacional de fruticultura de clima temperado do sul do Brasil, 8. **Anais...** Caçador: EPAGRI, 2005. v. 1, 61-63 p.

AUTUORI, M. 1949. Investigações sobre a biologia da saúva. **Ciência e cultura**, Rio de Janeiro, v.1, 4-12 p.

AUTUORI, M. 1956. La fondation dès sociétés chez lês fourmis champignonnistes Du genre “*Atta*” (Hym. Formicidae). In: Autuori, M. (Ed). **L’instinct dans Le comportement dès animaux et de l’ homme**. Paris: Masson et Cie, 77-104 p.

AZEVEDO, J. L. 1998. Microorganismos endofíticos. In: Melo, I. S & Azevedo, J. L. (Ed.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna, SP. Embrapa Meio Ambiente. 117- 137 p.

AZEVEDO, L.A. 1999. O Manejo Integrado de doenças e pragas do ponto de vista da indústria e defensivos. In: **Manejo Integrado de Pragas e Doenças**, UFV, Viçosa, 147 p.

AZEVEDO, J.L. ; MACCHERONI JUNIOR, W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. 2000. Endophytic microorganisms: Review on insect control and recent advantages on tropical plants. **Environmental Biotechnology**, v. 3 n. 1 31 p.

BAILEY, I. W. 1920. Some relations between ants and fungi. **Ecology**, Ihaca, v.1, 174-189 p.

BASS, M.; CHERRETT, J. M. 1995. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **Physiol. Entomol.**, 20:1-6 p.

BELT, T. 1874. **The naturalist in Nicaragua**. London: Bumpus, 306 p.

BIGI, F., GIOFFRE, A., KLEPP, L., SANTANGELO, M. P., ALITO, A., CAIMI, K., MEIKLE, V., ZAMARRAGO, M. 2004. The knockout of the lprG-Rv1410 operon

produces strong attenuation of *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbes Infect** 6, 182–187 p.

BILLS, G., A.; DOMBROWSKI, F.; PELAEZ, J.; POLISHOOK.; AN, Z. 2002. Recent and future discoveries of pharmacologically active metabolites from tropical fungi. Pp.165–194. In: Watling R., Frankland J. C., Ainsworth A. M., Issac S.; Robinson C. H.. (ed.), **Tropical mycology: micromycetes**; v. 2. CABI Publishing; New York - N.Y.

BONONI, V.L.R., TRUFEM, S.F.B., GRANDI, R.A.P. 1981. **Fungos macroscópicos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, depositados no Herbário do Instituto de Botânica**. *Rickia* 9: 37-53 p.

BORSAUX-EUDE, C.; GROSS, R. 2000. New insights into symbiotic associations between ants and bacteria. **Research in Microbiology**, Paris, v. 151, 513-519 p.

BOT, A. N. M., REHNER, S. A., BOOMSMA, J. J. 2001. Partial incompatibility between ants and symbiotic fungi in two sympatric species of *Acromyrmex* leaf-cutting ants. **Evolution** 55:1980-1991 p.

BRANDÃO, C.R.F., MAYHÉ-NUNES, A. J. 2001. A new fungus-growing ant genus, *Mycetragroicus* gen. n., with the description of three new species and comments on the monophyly of the Attini (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, 38(3B):639-665 p.

CARROLL, J. A. 1986. Bidirectional communication: Growth and immunity in domestic livestock. **American Society of Animal Science**.

BRANDÃO, C. R. F. 2007. Avanços da myrmecologia no Brasil. In: **Simpósio de mirmecologia**, 18. São Paulo. Anais, 1-3 p.

BUCHNER, P. 1965. Endosymbiosis of animals with plant microorganisms. **Interscience**, New York.

CHAPELA, I. H.; REHNER, S. A.; SCHULTZ, T. R.; MÜELLER, U. G. 1994. Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. **Science**, 266: 1691-1694 p.

CHERRETT, J.M. 1968. The foraging behaviour of *Atta cephalotes* (L.) (Hymenoptera: Formicidae). I. Foraging pattern and plant species attacked in tropical rain forest. **Journal of Animal Ecology**, 37: 387-402 p.

CHERRETT, J. M. 1980. Possible reasons for the mutualism between leaf-cutting ants (Hymenoptera:Formicidae) and their fungus. **Biol. Ecol. Méditer.**, 7 (3): 113-122 p.

CHERRETT, J.M. 1986. History of the leaf-cutting ant problems. In: Lofgren, C.S; Vandermeer, R.K. **Fire ants and leaf cutting ants: biology and management**. Boulder, Westview Press. 10-17 p.

CHERRETT, J. M.; POWELL, R. J.; STRADLING, D. J. 1989. The mutualism between leaf-cutting ants and their fungus. In: Wilding, N.; Collins, N. M.; Hammond, P. M.; Webber, J. F. (1989) **Insect-Fungus Interactions**. New York: Academic Press, 93-120 p.

CLÉMENÇON H. 2004. Cytology and plectology of the *Hymenomycetes*. **Bibliotheca Mycologica** 199, 1-488 p.

CROCOMO, W. 1990. **Manejo integrado de pragas**. São Paulo:[s.n]. 540 p.

CRUZ, B. P. B.; BATISTA FILHO, A. 1993. Manifestação da forma perfeita de *Leucocoprinus gongylophorus* (Moller) Heim em saueiro artificial de *Atta sexdens rubropilosa* Forel. **Arq. Inst. Biol.** v. 60, n.1/2, 66-69 p.

CURRIE, J.N. 1917. The citric acid fermentation. **J. Biol. Chem.**, London, v.31, 15-25 p.

CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. 1999a. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 96: 7998-8002 p.

CURRIE, C. R.; SCOTT, J. A.; SUMMERBELL, R. C.; MALLOCH, D. 1999b. Fungus-growing ants use antibioticproducing bacteria to control garden parasites. **Nature**, 398: 701-704 p.

CURRIE, C. R.; STUART, A. E. 2001. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**.

DE SOUZA, D. J.; SOARES, I. M. F.; DELLA LUCIA, T.M.C. 2007. *Acromyrmex ameliae* sp. n. (Hymenoptera: Formicidae): A new social parasite of leaf-cutting ants in Brazil. **Insect Science**, Hoboken, v.14 n.3 251-257 p.

DELABIE, J.H.C. 1989. Observações sobre a ocorrência de poliginia em colônia de *Acromyrmex subterraneus bruneus* Forel, 1893 (Formicidae, Myrmicinae, Attini) em cacauais. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, n. 18, v. 1, 193-197 p.

DE BARY, A. 1866. Neue untersuchungen über Uredineen. Monatsberichte Königlichen Akademie Preussichen der Wassenschaften zu Berlin. 15-49; 1865; 205-215 p.

D'ETTORRE, P.; HEINZE, J. 2001. Sociobiology of slave making ants. **Acta Ethology**, v.3, 67-82 p.

D'ETTORRE P., HEINZE, J., RATNIEKS, F.L.W. 2004. Worker policing by egg eating in the ponerine ant *Pachycondyla inversa*. **Proc. R. Soc. B.** 271, 1427–1434 p.

DELLA LUCIA, T.M.C.; FOWLER, H.G.; MOREIRA, D.D.O. 1993. **Espécies de formigas cortadeiras no Brasil**. Editora Folha de Vicososa, Vicososa. 262 p.

DELLA LUCIA, T. M. C.; VILELA, E. F. 1993. Métodos atuais de controle e perspectivas. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **As formigas cortadeiras**. Ed. Folha Nova de Viçosa, 163-190 p.

DELLA LUCIA T. M. C., PETERNELLI E. F. O., LACERDA F. G., PETERNELLI L. A. & MOREIRA, D. D. O., 2003, Colony behavior of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) in the absence of the queen under laboratory conditions. **Behav. Proc.**, 64: 49-55 p.

DELLA LUCIA, T. M. C. 2011. **Formigas Cortadeiras da Biologia ao Manejo**. UFV. 421 p.

DIAMOND, J. 2002. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. **Nature**, Londres, v.418, n. 6898 700-707 p.

DIJKSTRA, M. B.; BOOMSMA, J.J. 2003. *Gnamptogenys hartmani* Wheeler (Ponerinae: Ectatommini): na agropredador of *Trachymyrmex* and *Sericomyrmex* fungus-growing ants. **Naturwissenschaften**, Berlim, v.90 568-571 p.

DURINGER, P.; SCHUSTER, M.; GENISE, J.; LIKIUS, A.; MACKAYE, H.; VIGNAUD, P.; BRUNET, M. 2006. The first fossil fungus gardens of Isoptera: oldest evidence of symbiotic termite fungiculture (Miocene, Chad basin). **Naturwissenschaften**, Berlim, v.93, n.12 610-615 p.

EMERSON, A.E. 1955. Geographical origins and dispersions of termite genera. **Fieldiana Zoology**, Chicago, v.37, n. 18 465-521 p.

FARRELL, B.D.; SEQUEIRA, A.S.; O'MEARA, B. C.; NORMARK, B.B.; CHUNG, J.H.; JORDAL, B.H.2001. The evolution of agriculture in beetles (Curculionidae: Scolytinae and Platypodinae). **Evolution**, New York, v.55, n.10 2011 p.

FLINT, M. L.; VAN DEN BOSCH, R. 1981. **Introduction to integrated pest management**. New York, Plenum Press. 85 p.

FOWLER, H.G. 1983. Latitudinal gradients and diversity of the leaf-cutting ants (*Atta* and *Acromyrmex*) (Hymenoptera: Formicidae). **Revista de Biologia Tropical**, San José, v.31 213-216 p.

GREEN, A. M; MUELLER, U. G; ADAMS, R. M. M. 2002. Extensive exchange of fungal cultivars between sympatric species of fungus-growing ants. **Molecular Ecology**. Oxford, v.11, n. 2. 191-195 p.

HANADA, R. E.; DE JORGE SOUZA, T.; POMELLA, A. W.; HEBBAR, K. P.; PEREIRA, J. O.; ISMAIEL, A.; SAMUELS, G. J. 2008. *Trichoderma martiale* sp. nov., a new endophyte from sapwood of *Theobroma cacao* with a potential for biological control. **Mycological Research** v. 112, 1335-1343 p.

HANADA, R. E.; POMELLA, A. W.V.; SOBERANIS, W.; LOGUERCIO, L. L.; PEREIRA, J.O. 2009. Biocontrol potential of *Trichoderma martiale* against the black-pod disease (*Phytophthora palmivora*) of cacao. **Biological Control**, v. 50, 143-149 p.

HEIM, R. A. 1957. A propos du *Rozites gongylophora*. **Rev. Mycol.**, 22: 293-299 p.

HERNÁNDEZ, F. I. L. et al. 2002. Avaliação da composição de vários alimentos e determinação da cinética ruminal da proteína, utilizando o método de produção de gás e amônia *in vitro*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.1, 243-255 p.

- HÖLLDOBLER, B; WILSON, E. O. 1990. **The ants**. Cambridge, Harvard University Press. 733 p.
- HUGHES, W. O. H.,BOOMSMA, J. J. 2004. Genetic Diversity and Disease Resistance in Leaf-Cutting Ant Societies. **Evolution**. Vol. 58, No. 6 (Jun., 2004), 1251-1260 p.
- LARANJEIRO, A. J.; LOUZADA, R. M. 2000. Manejo de formigas cortadeiras em florestas. **Série Técnica IPEF**, Piracicaba, v. 13, n. 33. 115-124 p.
- LIMA, C. A., DELLA LUCIA, T. M. C., SILVA, N. A. 2001. **Formigas Cortadeiras Biologia e Controle**. Boletim de Extensão n. 44. Viçosa, UFV.
- LOPEZ, E., ORDUZ, S. 2003. *Metarhizium anisopliae* and *Trichoderma viride* for control of nests of the fungus-growing ant, *Atta cephalotes*. **Biological Control**. v. n. 2, June 2003, 194-200 p.
- MARIANO, R. DE L.R. 1993. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas** 1:369-409 p.
- MARICONI, F. A. M. 1970. **As saúvas**. São Paulo, Agronômica Ceres. 167 p.
- MARICONI, F. A. M. 1976. **Inseticida e seu Emprego no Combate às Pragas**. 1a ed. Vol. 1. São Paulo, Livraria Nobel, 466p.
- MARICONI, F.A.M. 1985. **Inseticidas e seu emprego no combate às pragas**. 7.ed. São Paulo: Distribuidora.
- MARINHO, M.C.N. 2005. **As transformações no mundo do trabalho e suas implicações na formação do executivo**. Universidade Católica de Goiás, Dissertação de Mestrado não publicada, Mestrado em Psicologia. Goiânia, GO.
- MAYER, V.E.; VOGLMAYR, H. 2009. Mycelial carton galleries of *Azteca brevis* (formicidae) as a multi-species network. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, Londres, v.276, n.1671 3265-3273 p.
- MOELLER, A. 1941. As hortas de fungo de algumas formigas sulamericanas. **Revista de Entomologia**, Rio de Janeiro, v.1 1-120 p.

- MÖLLER, A. 1893. Die pilzgärten einiger südamerikanischer ameisen. In: Batra, L. R. (Ed.). 1979. **Insect fungus symbiosis, mutualism and commensalism**. New York, John Willey & Sons, 77-116 p.
- MOSER, J. C., LEWIS, JR. 1981. Multiple nest queens of *Atta texana* (Buckley, 1960); (Hymenoptera: Formicidae). **Turrialba** 31 (3): 256-257 p.
- MUCHOVEJ, J. J., T. M. DELLA LUCIA, AND R.M.C. MUCHOVEJ. 1991. *Leucoagaricus weberi* sp. nov. from a live nest of leaf-cutting ants. **Mycol. Res.** 95: 1308-1311 p.
- MUELLER, U. G.; REHNER, A.; SCHULTZ, T. R. 1998. The evolution of agriculture ants. **Science**, 281: 2034-2038 p.
- MUELLER, U. G.; SCHULTZ, T. R.; CURRIE, C. R.; ADAMS, R. M. M.; MALLOCH, D. 2001. The origin of the attine ant-fungus symbiosis. **Quarterly Review Biol.**, 76: 169-197 p.
- MUELLER, U.G.; DASH, D.; RABELING, C.; RODRIGUES, A. 2008. Coevolution between attine ants and actinomycete bacteria: a reevaluation. **Evolution**, Hoboken, v.62 n.11 2894-2912 p.
- PAGNOCCA, F. C. et al., 2001. RAPD analysis of the sexual state and sterile mycelium of the fungus cultivated by the leaf-cutting ant *Acromyrmex hispidus fallax*. **Mycological research**. Cambridge. v. 105. n. 2. 173-176 p.
- PALLADINO, P. 1996. Entomology, ecology and agriculture. The making of scientific careers in North America. **Amsterdam, Harwood Academic Publishers**. 115 p.
- PEREIRA, J. O.; SOUZA, A. Q. L.; HANADA, R. E. 2007. Diversidade de Microrganismos Endofíticos de Plantas da Amazônia Brasileira. In: In: Coata-Maia, L; Malosso, E.; Yano-melo, A . M.. (Org.), ed. Recife. (Org.). **Micologia: avanços no conhecimento**. 01 ed. Recife: Sociedade Brasileira de Micologia, v. 01, 141-148 p.
- PETRINI, O. 1991. Fungal endophytic of tree leaves. In: Andrews J. and Hirano SS (eds) **Microbial ecology of leaves**. Spring Verlag, 179-197 p.

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

RABELING, C.; VERHAAGH, M.; MUELLER, U. 2006. Behavioral ecology and natural history of *Blepharidatta brasiliensis* (Formicidae, Blepharidattini). **Insectes Sociaux**, Basel, v.53 n.3 300-306 p.

RIBEIRO, S. B. 2000. **Caracterização de espécies bacterianas encontradas em ninhos de *Atta sexdens* L. e isolamento de *Streptomyces* de formigas da Tribo Attini**. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada), Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista.

SALLES, J.F.; GITAHY, P.M.; SKOT, L.; BALDANI, J.I. 2000. Use of endophytic diazotrophic bacteria as a vector to express the cryA gene from *Bacillus thuringiensis*. **Brazilian Journal of Microbiology** 31:155-161 p.

SAMUELS, G.J. 2004. *Trichoderma ovalisporum*: A new endophytic species with potential to control frosty pod rot of cocoa; **Mycol. Prog.**

SCHULTZ, T.R.; BRADY, S.G. 2008. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v.105 n.14 5435-5440 p.

SCHULTZ, T. R.; MEIER, R.A. 1995. A phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. **Systematic Entomology**, New York, v.20 337-370 p.

SILVA, A. 2000. **Participação do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* na produção de enzimas intestinais da formiga *Atta sexdens***. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada), Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista.

SILVA-PINHATI, A. C. O. et al. 2004. Low diversity within sympatric and allopatric fungal symbiotic with leaf-cutting ants (Attini: Formicidae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, 1463-1472 p.

SILVA-PINHATI, A. C. O.; BACCI, J. M.; SIQUEIRA, G.C.; SILVA, A.; PAGNOCCA, C.F.; BUENO, C. O.; HEBLING, J. A. M. 2005. Isolation and Maintenance of Symbiotic Fungi of Ants in the Tribe Attini (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical Entomology**. 34 (1), jan-fev, 1-5 p.

SINGER, R. 1986. **The Agaricales in modern taxonomy**. 4.ed. Koenigstein, Koeltz scientific books.

SOUZA, J. A.; SCHUCH, M. W.; SILVA, L. C. 2006. Efeito do tipo de ramo e do regime de luz fornecido à planta matriz no estabelecimento *in vitro* de araçazeiro cv. “Irapuã”. **Ciência Rural**, 36:1920- 1922 p.

SOUZA, A.Q.L.; SOUZA, A.D.L.; ASTOLFI FILHO, S.; PINHEIRO, M.L.B.; SARQUIS, M.I.M.; PEREIRA, J.O. 2004. Atividade Antimicrobiana de Fungos Isolados de Plantas Tóxicas da Amazônia: *Palicourea Longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos Cogens* Bethan; **Acta Amazônica** 34(2): 185 -195 p.

SOUZA, A.Q.L. 2006. **Potencial Genético e Químico dos endófitos de *Murray paniculata* L. (Jack)**. Tese de doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil, 128 p.

STAMFORD, N. P.; et al., 2001. **Enzyme Concentration Kinetic Model Amylase Activity Cell Growth Growth Models Growth Rate**.

STAMFORD, N.P.; FREITAS, A.D.S.; FERRAZ, D.S.; SANTOS, C.E.R.S. 2002. Effect of sulphur inoculated with *Thiobacillus* on saline soils amendment and growth of cowpea and yam bean legumes. **J. Agric. Sci.**, 139:275-281 p.

STROBEL, G.; YANG, X.; SEARS, J.; KRAMER, R.; SIDHU, R.S.; HESS, W.M. 1996. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. **Microbiology** 142, 435 p.

STROBEL, G.A. 2002. Microbial gifts from rain forests; **Can J Plant Pathol**. 24:14–20 p.

STROBEL, G. A.; DAISY, B. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiol Mol Biol Rev** 67, 491–502 p.

SUMNER, S.; HUGHES, W. O. H.; PEDERSEN, J. S.; BOOMSMA, J. J. 2004. Ant parasite queens revert to mating singly. **Nature** 428, 35-36 p.

SUTO, S.S.; KANDA, A.; SUZUKI, F.; SATO, S.; TAKATA, T.; TATSUKA, M. 2002. **Aurora-B Regulates RNA Methyltransferase NSUN2.**

TONHASCA, A. JR.; BRAGANÇA, M. A. L.; ERTHAL JR, M. 2001. Parasitism and biology of *Myrmosicarius grandicornis* (Diptera, Phoridae) in relationship to its host, the leaf-cutting ant *Atta sexdens* (Hymenoptera, Formicidae). **Insectes Sociaux** 48: 154–158 p.

VILELA, E.F. 1986. Status of leaf-cutting ant control in forest plantations in Brazil. In: Lofgren, C.S.; Vander Meer, R.K., eds. **Fire ants and leaf-cutting ants biology and management.** Boulder, CO: Westview Press: 399-408 p.

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

VO, T.L.; MUELLER, U.G.; MIKHEYEV, A.S. 2009. Free-living fungal symbionts (lepiotaceae) of fungus-growing ants (Attini: Formicidae). **Mycologia**, Lawrence, v.101 n.2 206-210 p.

WEBER, N.A. 1958. Evolution in fungus-growing ants. In: Becker, E. C. (Ed.). **Proceedings of the Tenth International Congress of Entomology, Montreal, August 17-25, 1956.** Ottawa, 1055 p; Mortimer Ltd., v.2 459-473 p.

WEBER, N.A. 1966. Fungus-growing ants. **Science**, 153: 587-604 p.

WEBER, N.A. 1972. The Attines: the fungus-culturing ants. **American Scientist**, Research Triangle Park, v.60, 448-456 p.

WEBER, N.A. 1979. Fungus culturing by ants. In: Batra, L. R. (Ed.). **Insect -fungus symbiosis, mutualism and commensalism.** New York: John Willey & Sons.

WEBER, N. A. 1982. Fungus ants. In: Hermann, H. R. (Ed.) **Social Insects.** New York: Academic Press, 255-363 p.

WICKLOW, D.T. 1988. Metabolites in the coevolution of fungal chemical defence systems. In: Pyrozinski, K. A.; Hawksworth, D. L. (Eds). **Coevolution of fungi with plants and animals**. London: Academic Press 173-201 p.

WILSON, E. O. 1971. **The insect societies**. Cambridge, Harvard University Press. 548 p.

WILSON, L.T.; GUTIERREZ, A.P.; HOGG, D.B. 1982. Within-plant distribution of cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hübner) on cotton: development of a sampling plan for eggs. **Environmental Entomology**, Lanham, v.11, 251-254 p.

WITTE, V.; MASCHWITZ, U. 2008. Mushroom harvesting ants in the tropical rain Forest. **Naturwissenschaften**, Berlin, v.95 n.11 1049-1054 p.

ZAMBOLIM, L. 1999. **Manejo Integrado de Pragas e Doenças**, UFV. 147 p.

ZHANG, H.W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. 2006. Biology and chemistry of endophytes. **Nat Prod Rep** 23, 753–771 p.

## **2-ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE MICRORGANISMOS ASSOCIADOS AO JARDIM DE FUNGOS SIMBIÓTICOS DAS FORMIGAS CORTADEIRAS *Atta sexdens***

### **RESUMO**

As formigas cortadeiras (*Atta* sp. e *Acromyrmex* sp.) são consideradas importantes pragas na agricultura devido ao hábito de cortar pequenos pedaços de vegetais para alimentação de seus fungos simbiotes. Estas formigas apresentam uma sofisticada divisão de trabalho durante o forrageamento, cultivo do jardim de fungos e devolução dos materiais forrageados. Mas pouco se sabe sobre os microrganismos que participam desse processo, formando a esponja do jardim de fungos simbiotes. Dentro dessa abordagem, este trabalho teve por objetivo realizar o isolamento, purificação, identificação e conservação dos microrganismos associados ao jardim de fungos das formigas cortadeiras *Atta sexdens* em alguns formigueiros localizados no estado do AM. Para isto, foram coletadas treze colônias de formigas com aproximadamente cinco meses de existência, contendo todas as castas (rainha, machos, soldados e operárias), as quais foram encaminhadas ao laboratório de Microrganismos LABGEMMA da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, onde foram realizados procedimentos de assepsia do material e inoculados pequenos fragmentos da esponja de fungos em meio de cultura BDA (Batata dextrose Ágar) e Pagnocca (PAGNOCCA et al., 1996). Após um período de aproximadamente sete dias, foram obtidas culturas de colônias monospóricas dos microrganismos e microcultivos que possibilitaram observações macroscópicas e microscópicas das colônias de fungos. Em seguida, os fungos purificados foram conservados em método segundo Castellani (1939); glicerol a 15%, e tubos de ensaio com meio inclinado coberto por óleo mineral. Foi realizada ainda a extração de DNA dos principais microrganismos isolados para a identificação molecular por meio da PCR e o seqüenciamento do DNA. A partir do isolamento deste jardim de fungos associados às formigas cortadeiras, identificou-se por meio de estudos macroscópicos e microscópicos os seguintes fungos: *Leucoagaricus gongylophorus*, *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., Leveduras e Bactérias gram negativas e positivas. A identificação por meio de métodos

moleculares revelou a presença de *L. gongylophorus*; *Bionectria ochroleuca*; *A. flavus*; *T. longibrachiatum*; *Fusarium solani* e Leveduras.

## 2. INTRODUÇÃO

Poucos animais apresentam capacidade de cultivar seu próprio alimento. Algumas linhagens de insetos, entre elas, formigas, cupins e besouros, há aproximadamente 50-60 milhões de anos, desenvolveram a capacidade de cultivar fungos para alimento. Alguns destes insetos tornaram-se dependentes do cultivo para alimento e desenvolvem uma sociedade de cooperação com tarefas divididas, que os tornam ecologicamente muito importantes (MUELLER, GERALDO, 2002). Em alguns destes grupos de insetos, o consumo de fungo é a principal fonte de alimento, em outros, os fungos apenas complementam a dieta (MUELLER et al., 2001).

Esta dependência de fungos como principal fonte de alimento ocorreu duas vezes em formigas (Formicidae) (MUELLER et al., 2001); no monofilético grupo formado por formigas da tribo Attini (Myrmicinae: Formicidae: Hymenoptera) (SCHULTZ, MEIER, 1995; BRANDÃO, MAHYE-NUNES, 2001), que são dependentes obrigatórias dos fungos que cultivam para alimento (WEBER, 1972; HÖLLDOBLER, WILSON, 1990); e nas formigas *Megalomyrmex silvestrii* (Myrmicinae, tribo Solenopsidini), que são parasitas sociais de formigas da tribo Attini e que consomem os fungos cultivados por atíneos hospedeiros (BRANDÃO, 1990; ADAMS et al., 2000).

A tribo Attini compreende mais de 200 espécies, distribuídas em 16 gêneros (SCHULTZ, MEIER, 1995; BRANDÃO, MAHYE-NUNES, 2001). Estas formigas são herbívoras dominantes na região Neotropical, entre as latitudes 12° N e 33° S (WEBER, 1979; HÖLLDOBLER, WILSON, 1990), com grande concentração de espécies na região Amazônica (MUELLER et al., 2001). Esta dominância é resultado da integração metabólica entre os simbiosomas (MARTIN, 1970; BASS, CHERRETT, 1995; NORTH et al., 1997; SIQUEIRA et al., 1998) estabelecida durante os milhões de anos de co-evolução.

Tradicionalmente, a tribo Attini é subdividida em: um grupo monofilético derivado, denominado atíneos superiores, estando incluídas as formigas cortadeiras de folhas do gênero *Atta* e *Acromyrmex* e também as não cortadeiras *Trachymyrmex* e *Sericomyrmex*; e um grupo parafilético, chamado de atíneos primitivos, incluindo as formigas mais basais (MUELLER et al., 2001).

As formigas pertencentes aos gêneros considerados basais são caracterizadas por apresentarem colônias de tamanho muito pequeno; uma exceção é somente o gênero *Myrmocrypta*, que apresenta colônias maiores. Em contraste, os atíneos derivados apresentam grandes colônias, sendo o gênero *Atta* o que apresenta os maiores ninhos dentro da tribo (HÖLLDOBLER, WILSON, 1990).

Os ninhos de atíneos consistem de formigas e jardins de fungos que são encontrados em uma ou mais câmaras, dependendo do gênero. O jardim de fungo é composto por hifas de fungos e normalmente dominado por um único clone de fungo simbiote (HÖLLDOBLER, WILSON, 1990; WEBER, 1972).

As formigas fornecem aos fungos substratos predominantemente de origem vegetal (HÖLLDOBLER, WILSON, 1990). As formigas das espécies dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta* cortam folhas frescas e têm recebido atenção especial dos pesquisadores devido aos danos causados a plantas silvestres e cultivadas (MAYHÉ-NUNES, 1995). Os demais atíneos cultivam fungos sobre fezes de animais, carcaças de insetos e, principalmente, material vegetal em decomposição (WILSON, 1971, HÖLLDOBLER, WILSON, 1990, MAYHÉ-NUNES, 1995).

Fungos e formigas se beneficiam com a relação simbiótica; os fungos são utilizados na dieta das formigas que, por sua vez, fornecem aos fungos substratos para crescimento e proteção contra parasitas e competidores (QUILAN, CHERRETT, 1977; CURRIE, STUART, 2001).

O mutualismo entre fungos e formigas vai além destes dois organismos, sendo muito mais complexo do que se supunha inicialmente. Em trabalhos recentes, foram identificados dois simbiontes adicionais de atíneos: um fungo parasita do gênero *Escovopsis* (CURRIE et al., 1999a; CURRIE, 2001) e uma bactéria filamentosa (actinomiceto) do gênero *Pseudonocardia* que é cultivada na superfície do corpo das formigas (CURRIE et al, 1999b) e produz um antibiótico que inibe o crescimento de *Escovopsis* (CURRIE, 2001). A associação formiga fungo-parasita-bactéria é uma das mais complexas associações simbióticas que pode ser encontrada na natureza (CURRIE et al, 2003).

A origem da tribo Attini é obscura pelo fato de todas as representantes serem cultivadoras obrigatórias de fungos, não existindo qualquer associação facultativa entre

atíneos e fungos que possa refletir o estágio primitivo desta associação. Mesmo os parentes mais próximos dos atíneos não apresentam associação facultativa com fungos, podendo sugerir uma rápida transição evolucionária do ancestral caçador para a formiga cultivadora de fungos (MUELLER, 2002; MUELLER et al., 2001; DINIZ et al, 1998).

É difícil determinar a natureza desta associação e o passo evolucionário tomado durante a formação da associação original, devido ao enorme tempo e diversificação desde a origem do cultivo de fungos por formigas (MUELLER, 2002). Existem dois principais modelos para a origem da fungicultura: o tradicional, sendo que, primeiramente, por acidente um fungo cresce em ninhos de formigas tornando-se parte da sua dieta (consumo), em seguida as formigas desenvolvem a capacidade de cultivar os fungos adicionando substratos (cultivo) e, em um último estágio, os fungos são transmitidos do ninho de origem para os descendentes (transmissão) (WEBER, 1972a); e o modelo alternativo, no qual inicialmente as formigas dispersam fungos especializados (transmissão), em seguida as formigas incorporam estes fungos em sua dieta (consumo) e desenvolvem a capacidade de cultivá-los adicionando substratos (MUELLER et al., 2001).

Sete hipóteses são propostas e cada uma mostra um diferente substrato (ou forma) que o ancestral de atíneos pode ter utilizado durante a transição de formigas caçadoras para cultivadoras: 1) sementes, 2) paredes dos ninhos, 3) madeira podre, 4) micorriza, 5) corpo de artrópodes, 6) fezes de formigas e 7) pellet infrabucal (MUELLER et al., 2001).

No modelo tradicional, observa-se que quem dirigiu o mecanismo originário do mutualismo foi à formiga, começando a cultivar o fungo em um dos seis substratos descritos acima (dependendo da hipótese) e, portanto este foi domesticado passivamente, tornando-se parte da dieta das formigas.

O modelo alternativo sugere que a associação entre fungos e formigas pode ter sido controlada por fungos que utilizaram as formigas para dispersar esporos ou micélios, através do “pellet” infrabucal, e só depois serviu como componente da dieta das formigas (MUELLER et al., 2001).

Todavia, ainda não está claro se a fungicultura em atíneos surgiu de um ancestral micofágico ou de um sistema de fungos utilizando formigas como vetor (MUELLER et al., 2001; MUELLER, GERALDO, 2002). No entanto, a fungicultura se originou uma só

vez em cada grupo como descrito por CHAPELA, et al., (1994) e MUELLER et al., (1998).

## **2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1.1 Morfologia e estrutura dos fungos**

Os fungos são seres eucarióticos, heterotróficos, que não sintetizam clorofila, portanto não fazem fotossíntese, não armazenam amido como material de reserva e sim glicogênio e não têm celulose na parede celular, com exceção de alguns fungos aquáticos. São ubíquos, podendo ser encontrados no ar, solo, água, vegetais e animais (GRIFFIN, 1994; DEACON, 1997).

Do ponto de vista morfológico, distinguem-se em leveduras e bolores (MARKHAM, 1994). Essa distinção não tem valor taxonômico, pois ambas as formas podem ser encontradas num mesmo grupo de fungos (SIEVERS et al., 1999).

As leveduras são geralmente unicelulares, de forma esférica, elíptica ou filamentosa. O tamanho varia de 1 a 5 $\mu$ m de diâmetro a 5-30 $\mu$ m de comprimento (MOORE-LANDECKER, 1996).

Os bolores são constituídos por células multinucleadas (cenócitos), que formam tubos chamados hifas; ao conjunto de hifas dá-se o nome de micélio. As hifas podem ser contínuas ou septadas.

A célula fúngica (leveduras e bolores), tem membrana citoplasmática lipoprotéica, cuja função principal é regular as trocas com o meio ambiente. Possui uma parede celular rígida, que confere resistência às pressões osmóticas e mecânicas. Sua natureza é polissacarídica em maior proporção, contendo também proteínas e lipídeos. No citoplasma encontram-se, além dos componentes usuais em solução, vacúolos, mitocôndrias, retículo endoplasmático, ribossomas e material de reserva (gorduras e carboidratos) (BUZZINI e MARTINI; 1999). O núcleo, tipicamente eucariótico, contém

nucléolo, vários cromossomas e histonas envoltos por uma membrana nuclear (CHEN e JOHNS, 1993).

Os esporos dos fungos têm uma importância toda especial, pois além de serem a forma mais freqüente de reprodução, são os principais veículos de disseminação. Os esporos podem ter origem assexuada e sexuada. A maneira pela qual se formam e se dispõem, constitui elemento importante na identificação, particularmente nos bolores (CARLILE e WATKINSON, 1994), podendo ser reconhecidos como: *Conídeos* – Células isoladas ou em cadeias, localizadas na extremidade de uma hifa, o conidióforo, frequentemente se originando de uma célula especial, o *sterigma*; em outros casos, originam-se por brotamento do conidióforo; *Esporangiosporos* – Esporos localizados no interior de um saco denominado esporângio, formado na extremidade de uma hifa; *Arthroconídeos* – Resultam simplesmente da fragmentação de uma hifa; *Clamidoconídeos* – Formados por uma célula qualquer do micélio, em torno da qual se desenvolve uma parede espessa. São mais resistentes que os outros tipos de esporos.

Na reprodução sexuada, os esporos são formados pela união de duas células e fusão de seus núcleos seguida de divisão, o que produz um número variável de células. Há, também, vários tipos conforme segue: *Ascosporos* – Os esporos formados, em número de oito, ficam contidos no interior de um saco, ou asco, formado pela parede resultante da fusão das duas células iniciais; *Oosporos* – Formados pela fusão de uma célula masculina pequena com uma célula feminina grande; *Basidiosporos* – Esporos formados na extremidade de células especiais chamadas basídeos; *Zigosporos* – Conseqüentes da fusão de duas células idênticas.

### **2.1.2 Crescimento microbiano**

As necessidades nutritivas dos microrganismos são as mesmas que as de todos os seres vivos, que, para renovarem seu protoplasma e exercerem suas atividades, exigem fontes de energia e fontes de material plástico.

Em sistemas biológicos, o aumento da massa resultante de um acréscimo ordenado de todos os componentes de protoplasma considera-se como crescimento microbiano (PROSSER, 1995). O padrão de crescimento dos fungos depende da morfologia que apresentam. Assim, nos fungos levuriformes, o crescimento se produz por aumento isodiamétrico do tamanho da célula, seguido por divisão celular, o que conseqüentemente, produz um incremento da população (além de sua biomassa) constituindo, assim, um processo reprodutivo (GROVE et al., 1970).

Nos fungos com uma morfologia filamentosa de crescimento e com um talo cenocítico, não micelial (p. ex., *Blastocladales*), o crescimento se produz por aumento celular, divisão celular e síntese de protoplasma. Finalmente, os fungos filamentosos com micélio verdadeiro crescem por uma combinação de aumento de divisões celulares, mas se diferenciam do que ocorre nos levuriformes, porque esse crescimento não é um processo reprodutivo, já que não implica aumento do tamanho da população (DAWES, 1999).

Tomando como exemplo as leveduras, a duplicação da população ocorre principalmente por gemação, tipo de divisão assincrônica e assimétrica, que implica a formação de uma célula-mãe e de uma gema, distinguíveis fisicamente; a gema cresce até alcançar, aproximadamente, o tamanho da célula-mãe e, nesse momento, se separa dela (JENNINGS, 1992).

Dessa maneira, uma população de leveduras em crescimento tem uma distribuição permanentemente variável da idade de suas células. A presença das células-mãe de *cicatrizas da gema*, uma por gema formada, indica a quantidade de células-filhas produzidas pela célula-mãe. Em condições ótimas, as leveduras podem duplicar tipicamente a biomassa em 90-120 minutos, mas quando as condições são contrárias (p. ex., esgotamento de nutrientes), tal duplicação ocorre em 6-7 horas (COOKE e WHIPPS, 1993).

Sob certas condições de crescimento e associadas às diferentes etapas do ciclo de vida, em *Saccharomyces cerevisiae*, as gemas não se separam da célula-mãe e formam longas cadeias ramificadas de células, o *pseudomicélio* (2n) ou *micélio invasivo* (n). O

crescimento na forma de pseudomicélio é comum em determinadas leveduras patogênicas (DAWES, 1999).

Nos fungos que produzem hifas, o crescimento se produz por alongamento das células e ramificação das hifas que crescem sobre o meio que será colonizado. O crescimento ocorre na extremidade da hifa (*crescimento apical*) por formação de septos (exceto no caso de fungos com hifas cenocíticas) de forma tal que cada compartimento hifal retém sua integridade e tem uma idade relativa em relação aos demais (CARLILE, 1994).

Dependendo da interação do ambiente físico-químico e do genoma do fungo, o micélio pode ser longo e difuso, ou curto e muito ramificado ou pode ocorrer uma mistura dos dois.

As hifas têm forma cilíndrica e vão se afinando até a região distal, constituindo a ponta da mesma, que se caracteriza por um contorno arredondado nos últimos 50-100  $\mu\text{m}$  da hifa (DAWES, 1999).

O crescimento hifal é considerado um crescimento em extensão e está restrito ao extremo da hifa, que se expande continuamente devido à chegada de novo material celular, que é transportado até a ponta por correntes citoplasmáticas sendo sintetizado nas zonas subapicais do micélio com capacidade de crescimento (JENNINGS, 1992).

### **2.1.3 Associação fungos e insetos**

Os insetos são os organismos de maior sucesso sobre a Terra, em parte, por causa da capacidade de se alimentar de uma ampla variedade de dietas (ISHIKAWA, 2003). Muitas dessas dietas apresentam deficiências nutricionais que, em parte, podem ser supridas por microrganismos (TAMAS et al., 2002). Assim, os microrganismos durante milhões de anos de evolução influenciaram o desenvolvimento e a sobrevivência dos insetos, quer servindo de alimento, quer fornecendo vias metabólicas novas; os insetos, por sua vez, permitiram a disseminação desses microrganismos (BERENBAUM, 1988; WERNEGREN, 2004; SCHULTZ et al., 2005).

O termo simbiose foi utilizado pela primeira vez por Anton Bary, em 1879, para definir uma associação íntima entre organismos de diferentes espécies, normalmente entre um hospedeiro e um microrganismo (RIO et al., 2003). Apesar de a simbiose representar todas as relações do parasitismo até o mutualismo, o termo é normalmente utilizado para relações onde há benefício mútuo.

Muitos microrganismos estão envolvidos no processamento alimentar dos insetos. Por exemplo, insetos que se alimentam de dietas de difícil digestão por causa da presença de moléculas complexas (BREZNAK e BRUNE, 1994; CAZEMIER et al., 2003), dietas com deficiências nutricionais, como o floema, deficiente em lipídios e aminoácidos essenciais, e sangue, pobre em várias vitaminas do complexo B (RAINEY et al., 1995; ADAMS e DOUGLAS, 1997; BYRNE et al., 2003). Outros microrganismos são necessários para deseintoxicação do material vegetal e mesmo na defesa do inseto contra invasões de patógenos e ataque de parasitóides (OLIVER et al., 2003; DILLON e DILLON, 2004). Os microrganismos podem estar presentes tanto interna como externamente ou manter ou não uma relação complexa com o hospedeiro, mas a maioria das relações ecológicas entre microrganismos e insetos é construtiva (ALVES, 1998).

As relações simbióticas nutricionais em várias ordens de insetos desenvolveram-se independentemente com diferentes tipos de microrganismos. Alguns grupos de insetos desenvolveram sistemas de cultivo onde o simbiote fúngico é mantido externamente servindo de alimento para o inseto (ectossimbiose). Outros grupos mantêm relações mais íntimas carregando os simbiossitos internamente (endossimbiose); esses simbiossitos podem ainda estar presentes no lúmen do intestino na forma livre, os extracelulares, ou dentro de células especializadas, os intracelulares (STEVENS et al., 2001; DILLON e DILLON, 2004; WERNEGREN, 2004).

#### **2.1.4 Simbiossitos externos – Os insetos que cultivam fungos**

Há milhões de anos, insetos pertencentes a três ordens distintas Isoptera, Hymenoptera e Coleoptera, desenvolveram a habilidade de cultivar fungos específicos como alimento. Dois desses grupos de insetos “fazendeiros” ficaram dependentes das colheitas cultivadas e desenvolveram sociedades divididas em castas que cooperam em sistemas de cultivo complexos (MUELLER e GERALDO, 2002).

Esses fungos são cultivados sob condições específicas, nas quais os insetos associados regulam o crescimento dos fungos em jardins especialmente preparados, permitindo o desenvolvimento controlado e sadio. Na falta desses insetos, os jardins são rapidamente tomados por contaminantes microbianos, caracterizando-se assim uma relação de interdependência entre os fungos e os insetos. Os insetos associados também previnem a ocorrência de ácaros e nematóides, invasores comuns que contaminam os jardins com esporos de outros fungos (CURRIE et al., 1999; CURRIE, 2001; FARRELL et al., 2001).

A simbiose com fungos permitiu às formigas, térmitas e besouros-das-ambrósias ocuparem nichos com recursos abundantes, mas que se encontravam inacessíveis. Assim, em suas complexas inter-relações com seus simbiossiontes, esses insetos desempenham papel importante em seus ecossistemas e em alguns casos são considerados pragas importantes nos sistemas agrícola-florestais (MUELLER e GERALDO, 2002).

## **2.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.2.1 Coleta e manutenção dos insetos em laboratório.**

Treze colônias (com idade máxima de 5 meses) da espécie *Atta sexdens*, foram coletados nos meses de junho e julho de 2009, no município de Manaus, AM e transportados para o Laboratório de Entomologia e Acarologia Agrícola, da Universidade Federal do Amazonas, UFAM. Nesta fase do desenvolvimento, os ninhos apresentam uma única câmara de fungos de aproximadamente 10 a 15 cm de diâmetro, localizada a poucos centímetros da superfície, facilitando sua escavação (AUTUORI, 1950).

Os ninhos foram escavados de modo a minimizar o contato com partículas de solo e a desestruturação das esponjas (jardim de fungos), evitando-se que a terra se depositasse sobre as mesmas. Os ninhos foram acomodados em recipientes de plástico transparente, recebendo água, alimento e outros cuidados. Os recipientes (Figura 4B) permitem a observação do seu interior e garantem uma boa circulação das operárias e aeração do sistema. A alimentação foi basicamente de folhas novas de laranjeira (*Citrus sinensis* L.)

e mangueira (*Mangifera indica* L). Após a estabilização dos formigueiros, por um período de dez dias, iniciaram-se os experimentos.



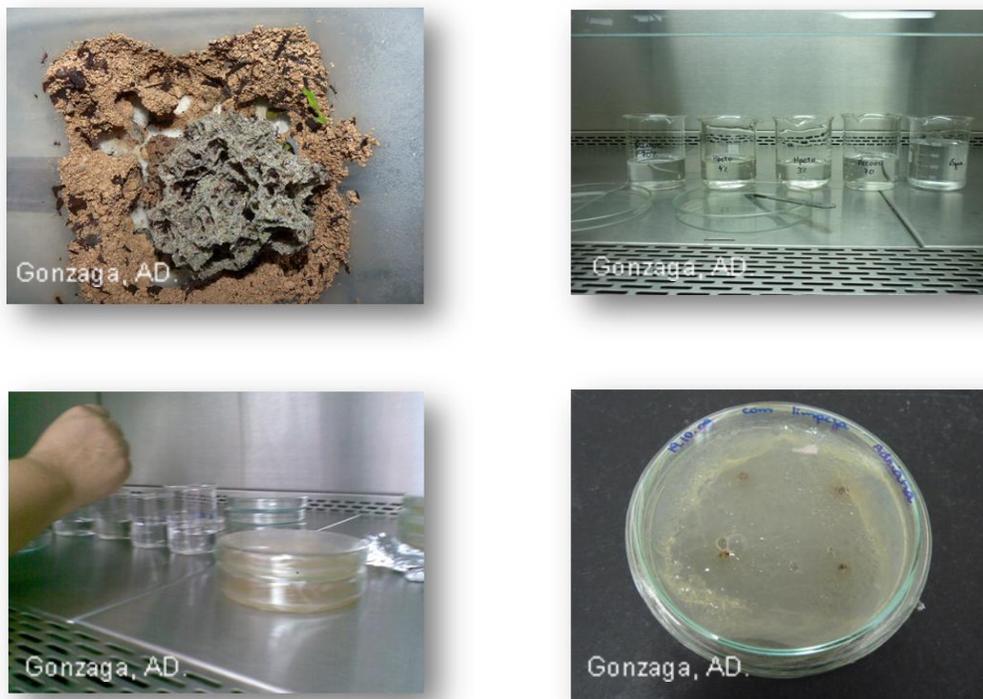
**Figura 4** – A – Coleta dos ninhos; B- Recipiente onde foram acomodados os ninhos das formigas cortadeiras *A. sexdens*. Fonte: Gonzaga, 2009.

### 2.2.2 Isolamento dos microrganismos

Os recipientes contendo os ninhos foram conduzidos para o Laboratório de Genética de Microrganismos (LAGEM) onde foi realizado o isolamento dos microrganismos presentes no jardim de fungos (Figura 5). Para o isolamento, fragmentos dos jardins (esponjas) foram imersas em água destilada autoclavada por um minuto, etanol 70% por um minuto, hipoclorito de sódio (NaOCl) 3% por um minuto, novamente lavados em etanol 70% por 30 segundos e por último em água destilada esterilizada. Após esse processo de assepsia foram retirados fragmentos do fungo simbionte e transferidos para placas de Petri contendo diferentes meios de cultura (BDA - Batata Dextrose Ágar e Pagnocca - glucose 10g, cloreto de sódio 5g, bacto peptona 5g, extrato de malte 10g, ágar 15g, água destilada 1000mL). Também foi isolado o fungo diretamente do formigueiro, transferindo-se pequenos fragmentos das esponjas para placa de Petri com o meio de cultura BDA e Pagnocca (PAGNOCCA et al., 1996). As placas de cultivo foram transferidas para estufa tipo B.O.D (Biological Oxygen Demand) a 26°C. Após 7 dias, efetuou-se o inóculo, transferindo-se fragmentos de ágar contendo

hifas, para novas placas contendo meio de cultura BDA e Pagnocca, para realizar a purificação.

Algumas bactérias que cresceram mesmo na presença de antibiótico foram isoladas e purificadas pela metodologia de esgotamento com estrias cruzadas foram crescidas em 1mL de caldo nutriente por 24h e depois, acrescido 150µL de glicerol. Após esta etapa, as bactérias foram conservadas a -20°C. Outra forma de conservação foi em meio de cultura nutriente *soft*, onde as bactérias foram inoculadas com o auxílio de uma agulha de platina, incubadas por 24h, a 26°C e depois lacradas e conservadas a -4°C



**Figura 5** – Isolamento dos microrganismos presentes no jardim de fungos associados das formigas cortadeiras.

### 2.2.3 Identificação dos microrganismos

Para a identificação dos fungos esporulantes presentes no formigueiro (jardim de fungos simbiotes) realizaram-se microcultivos. Observações macroscópicas da colônia

(crescimento, coloração, textura e pigmento) e microscópicas das estruturas vegetativas e reprodutivas (hifas, gongilídeos, conídios e conidióforos) foram realizadas.

#### **2.2.4 Obtenção de colônias monospóricas**

Todos os fungos isolados do formigueiro (jardim de fungos simbiotes) foram submetidos aos procedimentos de cultivos a fim de se obter uma nova colônia a partir de um único esporo. Para tal, utilizou-se a técnica de diluição seriada seguida de plaqueamento de acordo com o protocolo de AZEVEDO e COSTA (1973). Após as diluições, 50 µL das suspensões  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  foram plaqueadas em triplicata, em meio BDA e após dois dias, foi selecionada uma colônia oriunda de um único conídio. As placas contendo a cultura pura, foram armazenadas em estufa B.O.D a 26°C até o crescimento e esporulação para posterior conservação.

#### **2.2.5 Conservação dos microrganismos**

Os isolados utilizados no presente trabalho foram conservados por meio de 3 processos: (1) método segundo CASTELLANI (1939); (2) método do glicerol a 15%, onde a solução de esporos foi armazenada e conservada a -20°C e (3) método dos tubos de ensaio com meio inclinado coberto por óleo mineral, onde após o crescimento do fungo e sua esporulação, foi acrescido óleo mineral até que toda a colônia fique submersa e estes foram mantidos à temperatura ambiente.

#### **2.2.6 Extração de ácidos nucléicos para identificação molecular dos fungos**

A extração de DNA dos fungos foi realizada conforme o protocolo utilizado por SOUZA (2006), com algumas modificações:

1. Triturar o micélio filtrado em nitrogênio líquido e transferir 200mg do pó para microtubos de 2mL;

2. Adicionar 1mL de tampão de extração (CTAB - Tris 2,42g; NaCl 8,2g; EDTA 0,74g; Água mili-Q 100 mL), misturar suavemente e incubar em banho-maria a 65°C por 30 minutos;
3. Resfriar os tubos no gelo, adicionar 200µL de clorofil (Clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 24:1), misturar bem, centrifugar a 12.000 rpm por 2 minutos;
4. Remover a fase aquosa e transferir para outro tubo limpo. Adicionar 500µL de clorofil e agitar suavemente. Centrifugar a 12.000 rpm por 3 minutos;
5. Transferir a fase aquosa para outro tubo limpo. Adicionar 600µL de isopropanol ou etanol (a -20°C), homogeneizar (gentilmente), deixar precipitando a -20°C, por, no mínimo, 60 minutos. Centrifugar a 12.000 rpm por 3 minutos.
6. Descartar o sobrenadante e adicionar ao sedimento 1mL de etanol (70%) e deixar agir durante 5 a 10 minutos. Repetir o procedimento mais uma vez e adicionar 1mL de etanol (95%) durante 2 a 3 minutos.
7. Centrifugar a 12.000 rpm por 5 minutos, descartar o sobrenadante e secar o sedimento invertendo-se o tubo sobre um papel autoclavado por mais ou menos 30 minutos.
8. Dissolver o sedimento em 50µL de tampão TE (Tris base 108g; Ácido Bórico 55g; EDTA 7,4g; Água destilada 1.000mL).

### **2.2.7 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)**

A partir dos “*primers*” descritos por WHITE et al. (1990) para a região ITS-1 do rDNA, as reações foram realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 2,5 min; seguida de 40 ciclos de 15 seg de desnaturação a 94°C; 30 seg de anelamento a 58°C e 1,5 min de extensão a 72°C, concluindo com 10 min de extensão final a 72°C.

O produto da PCR foi conferido por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com gel blue green e visualizado sob luz ultravioleta.

### **2.2.8 Reação de seqüenciamento e análise das seqüências obtidas**

Todas as amostras foram seqüenciadas com os *primers* das regiões ITS-1 e ITS-2 e seus complementares. Para as reações de seqüenciamento, foram feitas reações de 10µL, contendo 5,0 µL do produto da reação, 2,0µL de “*DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for Mega BACE (Amersha Biosystems)*”, e 10 pmoles de cada iniciador senso (“*forward*”) e anti-senso (“*reverse*”). Os produtos das reações de seqüenciamento foram lidos por seqüenciador automático, nos dois sentidos de leitura, para maior garantia e fidelidade da análise.

As seqüências foram comparadas com a sua fita complementar e confrontadas, por meio do BLAST, com seqüências já depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

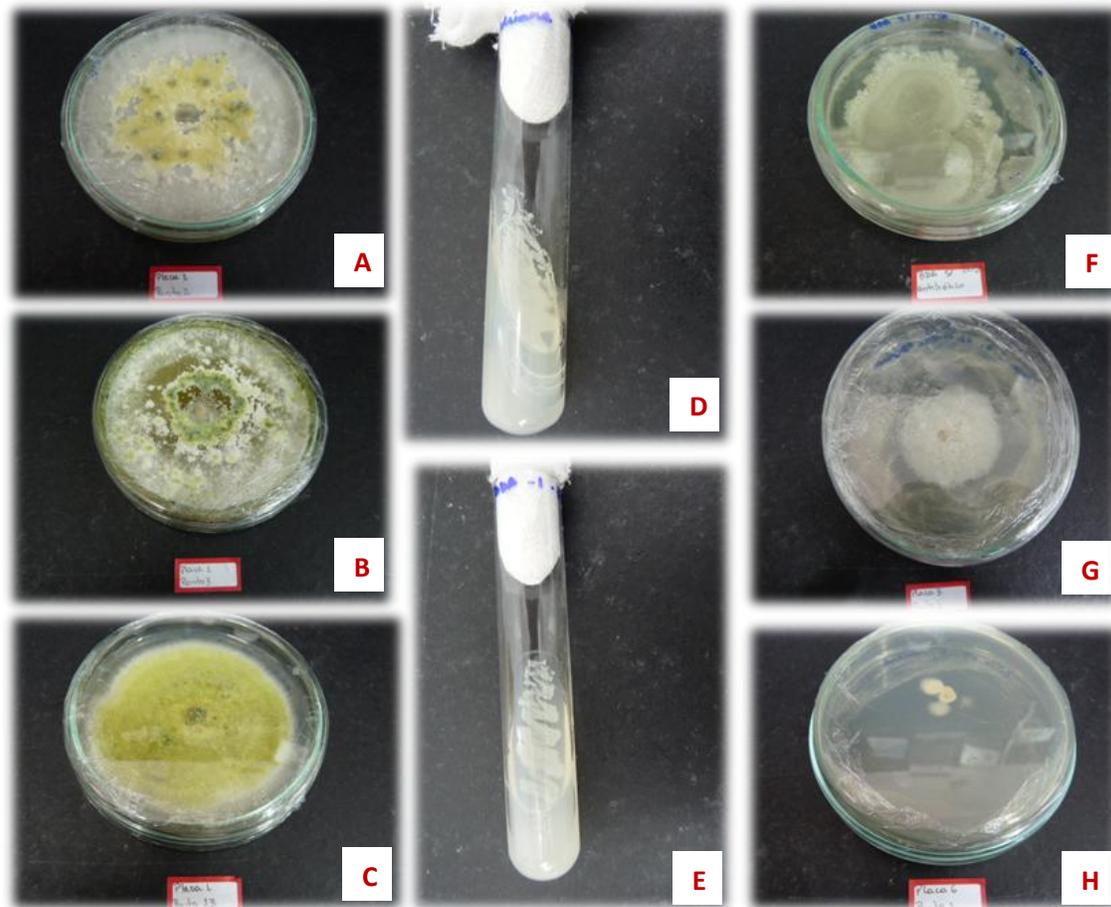
A partir do jardim de fungos associados às formigas cortadeiras, foram isolados seis microrganismos, representados por fungos filamentosos mitospóricos (*Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp.), basidiomiceto (*Leucoagaricus gongylophorus*) Leveduras e Bactérias gram negativas e positivas, que cresceram mesmo na presença de antibióticos.

WHEELER (1907), BROWN JUNIOR (1966); WEBER (1969) descreveram também estes mesmos microrganismos fazendo parte dos jardins de fungos associados às formigas cortadeiras. A literatura registra ainda a presença de *Leucoagaricus weberi*; *Escovopsis weberi* (MUCHOVEJ et al., 1991) e *Escovopsis aspergilloides* (SEIFERT et al., 1995) e Actinomicetos da família *Pseudonocardiaceae* CURRIE et al. (1999, 2003), como sendo também microrganismos encontrados associados a estas formigas.

Estudos bioquímicos e micromorfológicos confirmam que os fungos simbiotes de Attini são basidiomicetos, os quais estão divididos em três grupos: G1- inclui os fungos cultivados pelos gêneros *Atta*, *Acromyrmex*, *Trachymyrmex* e *Sericomyrmex*; único grupo que possui gongilídeos; G2- cultivados pelas espécies morfológicamente derivadas do gênero primitivo *Apterostigma*, possuem abundantes grampos de conexão e hifas aéreas extremamente alongadas, que em algumas espécies servem como proteção aos ninhos; G3- cultivados pelos gêneros *Cyphomyrmex*, *Mycetosorites*, *Mycetophylax*,

*Mycocarpus*, *Mycetarotes* e *Myrmecocrypta*, são relativamente mais heterogêneos, com alguns exemplares mais próximos ao grupo G1, enquanto outros estão mais relacionados a espécies de basidiomicetos não domesticados pelas formigas (CHAPELA et al., 1994).

Posteriormente estes fungos foram identificados com auxílio de ferramentas moleculares (tabela 2) para a confirmação da espécie, segundo a metodologia encontrada no item 2.2.8. Os resultados do seqüenciamento de DNA indicaram a presença de: *Leucoagaricus gongylophorus*; *Bionectria ochroleuca*; *Aspergillus flavus*; *Trichoderma longibrachiatum*; *Fusarium solani* e Leveduras como os microrganismos associados às formigas (Figura 6).



**Figura 6** – Microrganismos isolados do jardim de fungo simbiote. Placas A e C – *Aspergillus flavus*; B – *Trichoderma longibrachiatum*; D e F – Bactérias Gram-negativas; E – Leveduras; G e H - *Leucoagaricus gongylophorus*. Fonte: Gonzaga, 2009.

**Tabela 2** – Dados do sequenciamento dos fungos isolados do jardim de fungos simbiotes das formigas cortadeiras *Atta sexdens*.

<b>Fungos simbiotes das formigas cortadeiras – <i>A. sexdens</i></b>		
<b>Sigla dos fungos</b>	<b>Índice de similaridade</b>	<b>Sequência blast – Outubro de 2011</b>
<b>P L</b>	30%	<i>Leucoagaricus gongylophorus</i>
<b>P 5.1</b>	97%	<i>Bionectria ochroleuca</i>
<b>P 2.1</b>	87%	<i>Pichia caribbica</i>
<b>P 4.2</b>	98%	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
<b>P 2.1b</b>	99%	<i>Nectria haematococca</i>
<b>P1.1.b</b>	97%	<i>Aspergillus flavus</i>
<b>P 2.2a</b>	94%	<i>Fusarium solani</i>

Todos os microrganismos isolados e identificados foram preservados para estudos posteriores em ensaios de antagonismo.

A associação simbiótica entre as formigas que foram objetos deste estudo, juntamente com os fungos por elas cultivados é considerada uma das razões de seu sucesso ecológico na natureza.

Wheeler, em 1910, já previa este fato dizendo: “*O estudo das Attini está apenas começando, e o avanço neste fascinante tema será mais difícil para micologistas do que para entomologistas*” (MUELLER, 2002). Aparentemente o desafio continua.

Uma das razões dos poucos estudos realizados com fungos de Attini é a sua difícil identificação. Os estudos realizados até o momento indicam ser basidiomicetos os cultivares de todos os gêneros de Attini (WEBER, 1966), porém há dificuldades na definição do táxon destes fungos, devido ao fato de, na maioria dos casos, apenas

desenvolvem hifas estéreis, seja no ninho ou em culturas isoladas de laboratório, dificultando a taxonomia tradicional deste grupo, que é baseada na morfologia do basidioma, estrutura de reprodução destes fungos e que é indispensável na identificação até nível de espécie.

Se em nível taxonômico de Filo os estudos taxonômicos não foram fáceis até o momento, a identidade em nível de espécie destes fungos está distante de ser definida. Estudos tentando verificar se há a ocorrência de uma mesma espécie de fungo sendo cultivada por diferentes espécies de Attini foram realizados por STRADLING e POWELL (1986). Estes autores fizeram testes de interação entre linhagens isoladas de *A.sexdens*, *Atta cephalotes*, *Acromyrmex octospinosus* e *Trachymyrmex urichi*, e em suas conclusões, sugeriram que as diferentes espécies estudadas cultivam a mesma espécie de fungo. Em estudos moleculares realizados por CHAPPELLA et al., (1994) observaram-se diferenças até em nível taxonômico de Família entre os fungos cultivados por diferentes categorias de Attini. MUELLER (2002) faz um relato de todas as ocorrências de basidiomas em ninhos de formigas forrageadoras e, a partir deste trabalho pode-se inferir que, ao menos para as espécies dos gêneros considerados mais evoluídos (*Atta* e *Acromyrmex*) há o cultivo da mesma espécie de fungo. SILVA-PINHATI et al., (2004) confirmam esta hipótese, após avaliar DNA ribossomal e espaçadores gênicos de diferentes linhagens de fungos cultivados por *Atta* e *Acromyrmex*.

Os resultados encontrados nesta pesquisa confirmam a presença de fungos predominantes nos ninhos de *Atta sexdens* e descreve a presença de outros microrganismos que vivem em associação simbiótica com essas formigas cortadeiras.

## 2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M. D. et al., 2000. The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**. v. 287 no. 5461. 2185-2195 p.
- ALVES, S.B. 1998. Patologia e controle microbiano: Vantagens e desvantagens, p.21-37. In S.B. Alves (ed.), **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba, FEALQ, 1163p.

AUTUORI, M. 1950. Longevidade de uma colônia de saúva (*Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908) em condições de laboratório. **Ciência e Cultura**, 2: 285-286 p.

AZEVEDO, J.L.; COSTA, S.O.P. 1973. **Exercícios práticos de genética**, São Paulo: EDUSP, 288p.

BASS, M.; CHERRETT, J. M. 1995. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **Physiol. Entomol.**, 20:1-6 p.

BERENBAUM, M. R. 1996. Roach clips and other short subjects. **Am. Entomol.** 42: 197-198 p.

BERENBAUM, M.R. 1988. North American ethnobotanicals as sources of novel plant-based insecticides. In: ARNASON, J.T.; PHILOGÈNE, B.J.R.; MORAND, P. **Insecticide of plant origin**. Washington, DC, American Chemical Societ. v.387. 44-58 p.

BUZZINI P.; MARTINI A. 1999. Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. **Bioresource Technol.** 71, 41-44 p.

BRANDÃO, C. 1990. Os Guaranis: Índios do Sul – Religião, Resistência e Adaptação. **Revista de Estudos Avançados**. Vol. 04 N. 10 São Paulo: USP 53-90 p.

BRANDÃO, C.R.F., MAYHÉ-NUNES, A. J. 2001. A new fungus-growing ant genus, *Mycetragroicus* gen. n., with the description of three new species and comments on the monophyly of the Attini (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, 38(3B):639-665 p.

BREZNAK, J. A.; BRUNE. A. 1994. Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. **Ann. Rev. Entomol.** 39: 453- 487 p.

BROWN, J. R.; MCLEAN, D. M. 1966. Observations on Halogens as Bathing Water Disinfectants. **Journal of Applied Microbiology**. v 29, n 3, 559–565 p.

BYRNE, D. N.; T. S. BELLOWS JR. 1991. Whitefly biology. **Annu. Rev. Entomol.** 36: 431-457 p.

BYRNE, F. J., S.; CASTLE, N.; PRABHAKER.; TOSCANO, N. C. 2003. Biochemical study of resistance to imidacloprid in B biotype *Bemisia tabaci* from Guatemala. **Pest Manag. Sci.** 59: 347-352 p.

CARLILE, M.J.; WATKINSON, S.C. 1994. **The fungi**. San Diego: Academic, 428p.

CASTELANI, A. 1939. Viability of mold culture of fungi in distilled water. **J. Trop. Med. Hyg.**, 42: 225 p.

CAZEMIER, A. E., VERDOES, J. C., REUBSAET, F. A. G., HACKSTEIN, J. H. P., VAN DER DRIFT, C.; OP DEN CAMP, H. J. M. 2003. **Promicromonospora pachnodae sp. nov., a member of the (hemi) cellulolytic hindgut flora of larvae of the scarab beetle *Pachnoda marginata***. *Antonie van Leeuwenhoek* 83, 135–148 p.

CHAPELA, I. H.; REHNER, S. A.; SCHULTZ, T. R.; MÜELLER, U. G. 1994. Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. **Science**, 266: 1691-1694 p.

CHEN, K. C.; JOHN, K. C. W. 1993. "Creditor's decision to waive the violations of accounting-based debt covenants," **The Accounting Review** 68, 218-232 p.

CHERRETT, J.M. 1968. The foraging behaviour of *Atta cephalotes* (L.) (Hymenoptera: Formicidae). I. Foraging pattern and plant species attacked in tropical rain forest. **Journal of Animal Ecology**, 37: 387-402 p.

CHERRETT, J. M. 1980. Possible reasons for the mutualism between leaf-cutting ants (Hymenoptera:Formicidae) and their fungus. **Biol. Ecol. Méditer.**, 7 (3): 113-122 p.

CHERRETT, J.M. 1986. History of the leaf-cutting ant problems. In: Lofgren, C.S; Vandermeer, R.K. **Fire ants and leaf cutting ants: biology and management**. Boulder, Westview Press. 10-17 p.

CHERRETT, J. M.; POWELL, R. J.; STRADLING, D. J. 1989. The mutualism between leaf-cutting ants and their fungus. In: Wilding, N.; Collins, N. M.; Hammond, P. M.; Webber, J. F. **Insect-Fungus Interactions**. New York: Academic Press, 93-120 p.

COOKE, R.C.; WHIPPS, J.M. 1993. Ecophysiology of Fungi. **Blackwell Scientific Pub.**, London, U.K.

CURRIE, J.N. 1917. The citric acid fermentation. **J. Biol. Chem.**, London, v.31, 15-25 p.

CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. 1999a. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 96: 7998-8002 p.

CURRIE, C. R.; SCOTT, J. A.; SUMMERBELL, R. C.; MALLOCH, D. 1999b. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, 398: 701-704 p.

CURRIE C R; STUART A E. 2001. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. Proceedings. **Biological sciences** / The Royal Society .

CURRIE, C. R.; BOT, A. N. M.; BOOMSMA, J. J. 2003a. Experimental evidence of a tripartite mutualism: bacteria protect ant fungus garden from specialized parasites. **Oikos**, 101: 91-102 p.

CURRIE, C. R.; SCOTT, J. A.; SUMMERBELL, R. C.; MALLOCH, D. 2003b. **Corrigenda reported in Nature**, 423: 461 p.

DAWES, R.M., MULFORD, M., 1996. The false consensus effect and overconfidence: Flaws in judgment, or flaws in how we study judgment?. **Organizational Behavior and Human Decision Processes** 65 (3), 201–211 p.

DAWES, R.M., FAUST, D., MEEHL, P.E., 1989. Clinical versus actuarial judgment. **Science** 243, 1668–1674 p.

DAWES, R.M. 1999. Two methods for studying the incremental validity of a Rorschach variable. **Psychological Assessment**, 131, 297-302 p.

DEACON, T. 1997. **The Symbolic Species. The Co-evolution of Language and the Human Brain**. London: Penguin Books.

DILLON, R. J.; DILLON, V. M. 2004. THE GUT BACTERIA OF INSECTS: Nonpathogenic Interactions. **Annual Review of Entomology. Vol. 49: 71-92 p.**

DINIZ, A. R.; ANDRADE, M. J. de; CARVALHO, J. G. de; RAMALHO, M. A. P.; BERGO, C. L. 1998. Avaliação preliminar da resposta do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) à aplicação foliar de molibdênio e adubação nitrogenada em cobertura. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 22, n. 2, 226-231p.

FARRELL, M.; RYAN, S.; LANGRICK, B. 2001. Breaking bad news within a paediatric setting: an evaluation report of a collaborative education workshop to support health professionals. **J. Adv. Nurs.**, v.36, n.6, p.765-75 p.

GRIFFIN, D. 1994. **Sátira: Reintrodução A Crítica**. Lexington: University of Kentucky Press.

GROVE, M.D., SPENCER, G.F., ROHWEDDER, W.K., MANDAVA, N., WORLEY, J.F., JR., J.D.W., STEFFENS, G.L., FLIPPEN-ANDERSON, J.L., CARTER COOK, J. 1979. Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. **Nature** 281, 216–217 p.

GROVE, S. N., BRACKER, C. E. 1970. Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi: Vesicles and Spitzenkörper. **J. Bact.** 104, 989-1009 p.

GROVE, S. N., BRACKER, C. E., MORRE, D. J. 1970. An ultrastructural basis for hyphal tip growth in *Phythium ultimum*. **Amer. J. Bot.** 59,245-266 p.

HÖLLDOBLER, B; WILSON, E. O. 1990. **The ants**. Cambridge, Harvard University Press. 733 p.

ISHIKAWA, H. 2003. Insect symbiosis: An introduction. In: Miller TA, editor. **Insect symbiosis**. Boca Raton, Florida: CRC Press. pp. 1–21.

JENNINGS, N. R. 1992. **On being responsible**. In: Werner, E. and Demazeau, Y., editors, *Decentralized AI 3 - Proceedings of the Third European Workshop on Modelling Autonomous Agents and Multi-Agent Worlds (MAAMAW-91)*, 93-102 p.

LOECK, A. E; ROSENTHAL, M. D; GUSMÃO, L. G. 1994. Mini-formigueiro: método de criação de formigas cortadeiras na ausência da rainha. **Na. Soc. Entomol. Brasil** 23 (2).

MARTIN, M. M. 1970. The biochemical basis of the fungus-at-tine ant symbiosis. **Science**. 169:16–20 p.

MARKHAM, J. C. 1977. Description of a new western Atlantic species of *Argeia* Dana with a proposed new subfamily for this and related genera (Crustacea, Isopoda, Bopyridae). **Zoologische Mededelingen** 52(9):107- 123 p.

MARKHAM, J. C. 1994. Crustacea Isopoda: Bopyridae in the MUSORSTOM collections from the tropical Indo-Pacific I. Subfamilies Pseudioninae (in part), Argeiinae, Orbioninae, Athelginae and EntophiJinae. In A. Crosnier, ed., *Resultats des Campagnes MUSORSTOM* 10(6). **Memoires du Museum National d'Histoire Naturelle (A)** 161:225- 253.

MAYHÉ-NUNES, A. J. 1995a. **Filogenia de los Attini (Hymenoptera, Formicidae): un aporte al conocimiento de las hormigas fungívoras.** Tese de Doutorado, Universidad Simón Bolívar, Caracas. 274 p.

MAYHÉ-NUNES, A. J. 1995b. Sinopse do gênero *Mycetarotes* (Hymenoptera, Formicidae), com a descrição de duas espécies novas. **Boletín de Entomología Venezolana 10:** 197-205 p.

MOORE-LANDECKER, E. 1996. **Fundamentals of the Fungi.** Prentice Hall International Inc., New Jersey.

MUELLER, U. G. 2002. Ant versus fungus versus mutualism: Ant-cultivar conflict and the deconstruction of the attine ant-fungus symbiosis. **American Naturalist**, 160: S67-S98 p.

MUELLER, U. G.; GERALDO, N. 2002. **Fungus-farming insects: Multiple origins and diverse evolutionary histories.** *PNAS*. 23:15247-15249 p.

MUCHOVEJ, J. J.; DELLA LUCIA, T. M.; MUCHOVEJ, R. M. C. 1991. *Leucoagaricus weberi* sp. nov. from a live nest of leaf-cutting ants. **Mycol. Res.**, 95 (11): 1308-1311 p.

MUELLER, U. G.; REHNER, A.; SCHULTZ, T. R. 1998. The evolution of agriculture ants. **Science**, 281: 2034-2038 p.

MUELLER, U. G.; SCHULTZ, T. R.; CURRIE, C. R.; ADAMS, R. M. M.; MALLOCH, D. 2001. The origin of the attine ant-fungus symbiosis. **Quarterly Review Biol.**, 76: 169-197 p.

NORTH, R. D.; JACKSON, C. W.; HOWSE, P. E. 1997. Evolutionary aspects of ant-fungus interactions in leaf-cutting ants. **Tree.**, v. 12 p. 386-389 p.

OLIVIER M, GOLDGAR DE, SODHA N, OHGAKI H, KLEIHUES P, HAINAUT P, EELES RA. Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. **Cancer Res.** 2003;63:6643-50 p.

PAGNOCCA, F. C. *et al.*, 1996. Microbiological changes in the nests of leaf-cutting ants fed on sesame leaves. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 120. n. 5, 317-320 p.

PERNAL S.F.; CURRIE, R.W. 2001. Improved flight and rearing room design for honey bees (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology** 94:793-805 p.

PROSSER, E. S. 1995. *Vem comigo tocar flauta doce!* Brasília: Musimed Editora. Vol.1.

QUILAN, R. J.; CHERRETT, J. M. 1977. The role of substrate preparation in the symbiosis between the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) and its food fungus. **Ecological Entomology**, v. 2, p. 161-170 p.

RAINEY, F. A., ZHILINA, T. N., BULYGINA, E. S., STACKEBRANDT, E., TOUROVA, T. P. & ZAVARZIN, G. A. 1995. The taxonomic status of the fermentative halophilic anaerobic bacteria: description of Haloanaerobiales ord. nov., Halobacteroidaceae fam. nov., *Orenia* gen. nov. and further taxonomic rearrangements of the genus and species level. **Anaerobe** 1, 185-199 p.

RIO, R.V., LEFEVRE, C., HEDDI, A., AKSOY, S. 2003. Comparative genomics of insect-symbiotic bacteria: influence of host environment on microbial genome composition. **Appl Environ Microbiol** 69: 6825–6832 p.

SCHULTZ, T.R.; MEIER, R. 1995. A phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. **Systematic Entomology** 20: 337-370.

SCHULTZ, T.R., MUELLER, U.G., CURRIE, C.R. & REHNER, S.A. 2005. Reciprocal illumination: A comparison of agriculture in humans and in fungus-growing ants. Pp. 149-190 in **Insect- Fungal Associations: Ecology and Evolution**, F. E. Vega and M. Blackwell, editors. New York: Oxford University Press.

SEIFERT, K. A. (1995) *Escovopsis aspergilloides*, a rediscovered hyphomycete from leaf-cutting ant nests. **Mycologia**, 87 (3): 407-413 p.

SIEVERS, N.; BERTSCH, E.; FISCHER, R. 1999. Isolation of nuclear migration mutants of *Aspergillus nidulans* using GFP expressing strains. **Mycological Research**, 103 (8): 961-966 p.

SILVA-PINHATI, A. C. O. et al. 2004. Low diversity within sympatric and allopatric fungal symbiotic with leaf-cutting ants (Attini: Formicidae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, 1463-1472 p.

SIQUEIRA, C. G. et al. 1998. Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 12, p. 4820-4822 p.

SOUZA, A.Q.L. 2006. **Potencial Genético e Químico dos endófitos de *Murray paniculata* L. (Jack)**. Tese de doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil, 128 p.

SUH, R. S., PHADKE, N., OHL, D. A., TAKAYAMA, S., SMITH, G. D. 2003. Rethinking gamete/embryo isolation and culture with microfluidics. **Hum Reprod Update**. 9: 451 -61 p.

STRADLING D. J.; POWEL, R. J. 1986. The cloning of more highly productive fungal strains: a factor in the speciation of fungus growing ants. **Experientia**, 42: 962-964 p.

STEVENS DR, R SEIFERT, BUFE B, F MULLER, KREMMER E, GAUSS R, W MEYERHOF, KAUPP UB, B LINDEMANN. 2001. Hiperpolarização ativado canais HCN1 e HCN4 mediar respostas a estímulos azedo. **Nature** 413:631-635.

TAMAS, I., KLASSON, L., CANBACK, B., NASLUND, A. K., ERIKSSON, A. S. 2002. 50 million years of genomic stasis in endosymbiotic bacteria. **Science** 296: 2376–2379 p.

WEBER, N. A. 1966. Fungus-growing ants. **Science**, 153: 587-604 p.

WEBER, J., R. GREER, B. VOIGHT, E. WHITE AND R. Roy, 1969. Unusual strength properties of echinoderm calcite related to structure. **J. Ultrastruct. Res.**, 26: 355-366 p.

WEBER, N.A. 1972. Gardening ants: the Attines. Philadelphia: **The American Philosophical Society**, 87-115 p.

WEBER, N.A. 1979. **Fungus culturing by ants. In: Batra, L. R. (Ed.). Insect -fungus symbiosis, mutualism and commensalism**. New York: John Willey & Sons.

WERNEGREEN, J. J. 2004. Endosymbiosis: Lessons in Conflict Resolution. **PLoS Biol** 2(3): 68.

WILSON, E. O. 1971. **The insect societies**. Cambridge, Harvard University Press. 548 p.

WHEELER, W. M. 1907. The polymorphism of ants, with an account of some singular abnormalities due to parasitism. **Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.** 23: 1-93 p.

WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J. 1990. Amplificação e seqüenciamento de genes de fungos ribosomal RNA para filogenética. In: Innis MA, Gelfand DH, Shinsky JJ, White TJ, editors. **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**, 315-322 p.

### **3- ATIVIDADE ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE PLANTAS DA AMAZÔNIA CONTRA O FUNGO SIMBIONTE *L. gongylophorus*, E DOS FUNGOS ASSOCIADOS (*Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., e leveduras) PRESENTES NOS NINHOS DE *Atta sexdens*;**

#### **RESUMO**

Interações entre microrganismo compartilhando um mesmo nicho ecológico revestem-se de características fundamentalmente competitivas. Os organismos vivos, bactérias principalmente, são capazes de perceber alterações no ambiente e a presença de outros seres vivos em sua proximidade, sendo isso crucial para sua sobrevivência. Nas relações antagonistas, em uma situação em que um microrganismo aciona seu arsenal de recursos para inibir o crescimento e a multiplicação de outro ou mesmo de provocar sua morte, há que se pensar em múltiplas possibilidades, como competição por nutrientes e por nichos ecológicos sequestra de íons de ferro, produção de substâncias antimicrobianas, como antibióticos e compostos voláteis tóxicos. Este trabalho teve como objetivo verificar a atividade antagonista de 160 bactérias endofíticas de plantas da Amazônia contra microrganismos presentes no ninho das formigas cortadeiras *Atta sexdens*. Os ensaios foram feitos *in vitro* pelo método de culturas pareadas, e consistiu no confronto direto do antagonista, bactérias endofíticas, contra os microrganismos simbioses e outros, que foram isolados de ninhos das formigas. O foco dos estudos eram os fungos *Leucoagaricus gongylophorus*, *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp. e Leveduras. As bactérias endofíticas selecionadas para o ensaio fazem parte da coleção de estudo do Laboratório de Microrganismos da Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Todos os ensaios de antagonismos foram feitos em meio BDA onde as bactérias endofíticas, em confronto com os fungos isolados dos formigueiros, eram colocadas em pólos opostos de uma placa de Petri e a 1 cm da borda interna da placa. Em relação à inibição do isolado *L. gongylophorus*, 38 bactérias apresentaram resultados positivos os quais foram constatados pela distância entre as culturas pareadas *Aspergillus* sp. teve o crescimento inibido por 21 bactérias e *Trichoderma* sp. foi inibido por 19 bactérias. Um resultado surpreendente ocorreu em relação ao isolado de levedura, que teve o crescimento inibido

por somente três antagonistas, mas por outro lado atuou como agente inibidor da maioria das bactérias endofíticas. Na avaliação geral, seis bactérias endofíticas foram capazes de inibir todos os três fungos filamentosos do formigueiro mostrando-se promissoras para o controle dos fungos associados a formigas cortadeiras.

### 3. INTRODUÇÃO

A introdução de bactérias benéficas visando aumentar a produtividade de culturas é uma atividade praticada, empiricamente, há séculos (ROMEIRO, 2007). Intuitivamente, agricultores percebiam que adicionar ao solo comum solo onde leguminosas haviam sido cultivadas aumentava a produtividade do primeiro (BASHAN, 1998). Pesquisas foram sendo realizadas em torno dessa idéia e, em 1896, já era registrada a primeira patente nos EUA sobre o uso de *Rhizobium* sp. para inoculação de sementes (NOBBE; HILTNER, 1896).

Também o conceito biológico de enfermidades de plantas, por praticas empíricas, remonta de longa data. Conforme COOK e BAKER (1983), desde 5.000 a.C. os egípcios não tinham problemas com *Sclerotium cepivorum* em cebola, posto que as inundações cíclicas do rio Nilo encarregavam-se de manter as margens cultiváveis cobertas com lâmina d'água, o que favorecia a prevalência, na microbiota do solo, de antagonistas naturais ao patógeno. A enfermidade, contudo, passou a ter importância após a construção da represa de Assuã, a qual alterou esse ciclo natural de inundações.

Os chineses, já por volta de 4.000 a.C., costumavam deixar o solo em repouso se a colheita era pobre, aumentando intuitivamente as chances de a população de antagonistas presentes na microbiota do solo recuperar-se. Os maias, 1.000 anos a.C, entremeavam fileiras de cravo-de-defunto nos campos de plantio usando esta planta, hoje reconhecida como efetiva antagonista a alguns nematóides, de forma intuitiva para seu controle biológico (KHAN et al., 1971).

Antes mesmo da invenção do microscópio, que permitiu a percepção científica da existência de microrganismos, e de ser jogada por terra a teoria da geração espontânea, COOK e BAKER (1983) relatam que se costumava recorrer a procedimentos curiosos para tratar ferimentos de podas, como aplicar fezes e urina (AUSTEN, 1657), pincelar uma mistura de esterco, cal e cinza ou mesmo vedar o ferimento com lama conforme citado por BAKER e COOK (1974). Obviamente, todos esses tratamentos implicavam dispensa, no local do ferimento, de material contendo uma diversificada e desconhecida

microbiota, e é possível que alguns dos seus componentes exercessem alguma forma de antagonismo contra os patógenos-alvo.

SUTTON e PENG (1993) lembram que, na Roma antiga, Plínio (420 a.C) menciona o uso de resíduos de extração de azeite de oliva como medida de controle das ferrugens. Adicionalmente, desde os tempos do Brasil Colônia até os dias que correm em pequenas propriedades da Zona da Mata de Minas Gerais, costuma-se “imunizar” (e esse é, exatamente, o termo empregado) o feijão recém-colhido, recobrando-se a superfície dos grãos com lama preparada com terra de formigueiro, numa forma empírica de controle do carruncho (ROMEIRO; GARCIA, 2003).

Depois de 1850, com o desenvolvimento de técnicas de cultivo de microrganismos em meio líquido e, após 1880, em placas, foi-se percebendo a existência das interações antagonísticas entre microrganismos. Assim, ROBERTS (1874, citado por COOK e BAKER, 1983) cunhou o termo antagonismo ao perceber que bactérias tinham dificuldade de crescer em meio líquido contaminado por *Penicillium* sp.; no fim do século XIX. Segundo MADIGAN et al., (2003), Viullemin em 1889, criou o termo antibiose ao constatar, *in vitro*, a inibição de microrganismos uns pelos outros.

Os primeiros trabalhos envolvendo a introdução consciente de antagonistas visando o controle biológico de enfermidades de plantas aconteceram no início do século XX, nas décadas de 1920-1940. Assim, HARTLEY (1921) dispensou em solo de viveiros de mudas de essências florestais, fungos previamente selecionados *in vitro* como potenciais antagonistas, para o controle de tombamento. Também MILLARD e TAYLOR (1927) relatam haver reduzido a severidade da sarna (*Streptomyces scabies*) pelo uso do antagonista *S. precox* veiculado a fragmentos de grama, trabalhando em vasos com solo estéril. Interessantemente, *S. precox* não mostrou antagonismo *in vitro* contra o patógeno, mas causou decréscimo na população de *S. scabies*, veiculado ou não a fragmentos de grama. HENRY (1931) selecionou actinomicetos, bactérias e fungos que, quando adicionados a solo estéril, proporcionam proteção relativa a plantas de trigo contra *Helminthosporium sativum*.

A partir da década de 1940, por todo o mundo, uma grande ênfase foi dada ao uso de fungos como agentes de biocontrole e também a estirpes atenuadas de vírus para imunização de plantas contra estirpes virulentas, passando por estudos com solos supressivos e micorrizas, numa evolução rápida, ainda que por etapas, da pesquisa com controle biológico de enfermidades de plantas (BAKER; COOK, 1974; COOK e BAKER, 1983). Parece que a comunidade científica havia percebido que antagonistas – quer introduzidos, quer autóctones – eram capazes de reduzir a severidade de doença.

O uso de organismos procariontes para o biocontrole de enfermidades de plantas – uso este menos especulativo e de forma mais científica e direcionada – parece ter se iniciado há algumas décadas apenas. Talvez o mérito principal caiba a pesquisadores chineses, que iniciaram importantes trabalhos nas décadas de 1950 e 1960. Por exemplo, YIN et al., (1957, 1965) selecionaram uma cultura de *Streptomyces* sp. de uma coleção de 4.000 actinomicetos isolados de raízes de algodão e alfafa com forte atividade antagonista *in vitro* contra *Verticillium albo-atrum* e *Rhizoctonia solani*, à qual denominaram de “Strain 5406”. Por promover controle biológico das enfermidades incitadas pelos dois patógenos, foram usadas por mais de duas décadas em plantios comerciais. Também merecem menção os trabalhos do grupo do Dr. Chen (CHEN et al., 1996) sobre a experiência chinesa, desde a década de 1960 até os dias que correm, com o uso rotineiro de rizobactérias como ativadoras de defesas e como promotoras de crescimento de plantas. A microbiolização de sementes, antes do plantio, com propágulos de rizobactérias, tem sido prática agrônômica rotineira na China continental onde o governo se encarrega de distribuir aos agricultores 3.000 toneladas de formulações de células de rizobactérias todos os anos, para serem utilizadas em 35.000.000 de hectares. Talvez por razões políticas que motivaram o isolamento da República Popular da China em todos os níveis, de intercâmbio científico inclusive, talvez pela própria filosofia de pesquisa e enfoque de problemas, somente em tempos recentes o mundo ocidental tem tomado conhecimento e percebido a incomensurável potencialidade do desenvolvimento de tecnologias específicas para ativação de mecanismos de defesa de plantas como alternativa inteligente ao uso indiscriminado de agrotóxicos.

No mundo ocidental, na década de 1970, são dignas de nota pesquisas com bactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR) em países como Inglaterra, Austrália e Rússia (antiga URSS). Os trabalhos de (BROADABENT et al., 1971) com bactérias de solo – rizobactérias – tanto na promoção de crescimento como no controle biológico de doenças não podem ser esquecidos.

Também nas décadas de 1970 e 1980, não podem deixar de serem mencionadas as pesquisas do australiano Allen Kerr e seus colaboradores, da Universidade de Adelaide, na Austrália. No início da década de 1970, o grupo de trabalho de Kerr obteve, de solo, isolamento de *A. radiobacter* (saprófitas) fortemente antagonicos a *A. tumefaciens in vitro*. A continuidade das pesquisas mostrou que esse antagonismo era também exercido *in vivo*, estabelecendo-se assim o primeiro caso de controle biológico de uma bacteriose de planta que realmente funciona em campo, adotado como prática cultural rotineira em muitos países do mundo (KERR, 1979; 1980; KERR e TATE, 1984). O controle fundamenta-se, principalmente, na produção de uma bacteriocina, denominada Agrocina 84, produzida por certos isolamentos de *A. radiobacter* (saprófita), notadamente pelo isolamento-padrão K84.

Na década de 1980, os trabalhos de Milton Schroth e seu grupo, nos EUA, foram de imensa importância na pesquisa com controle biológico. Fora da China talvez fosse onde mais se trabalhava com rizobactérias, quer como promotora de crescimento de plantas quer como agentes de controle biológico (SCHROTH e BECKER, 1990) e muita ênfase se deram a espécies de *Pseudomonas* e a sideróforos (KLOEPPER et al., 1981).

Com o avanço dos conhecimentos científicos e a melhoria das técnicas microscópicas, tem-se constatado que os insetos são seres altamente infestados por microrganismos. Esse fato apresenta uma grande importância e torna ainda mais complexo o trabalho dos patologistas de insetos que se dedicam ao estudo por determinação dos agentes das doenças, dos sintomas e outros tipos de relacionamentos e interações entre insetos e microrganismos, incluindo o estudo do controle microbiano de pragas (ALVES, 1998).

Os microrganismos podem estar presentes internas ou externamente ao corpo dos insetos, mantendo ou não relações complexas com os mesmos. A maioria das relações ecológicas entre microrganismos e insetos é construtiva, resultando em benefícios aos insetos, aos microrganismos ou a ambos (ALVES, 1998) (tabela 3).

**Tabela 3** – Principais tipos de associações entre microrganismos insetos.

<b>Tipos de Associações</b>	<b>Atuação / Consequência</b>
<b>Beneficiam insetos</b>	Servem de alimentos
	Atuam como substratos
	Produzem feromônios
	Ajudam na digestão
	Fixam nitrogênio
	Evitam contaminação
<b>Usam insetos para disseminar</b>	Doenças de plantas
	Doenças de animais
<b>Sem funções definidas</b>	Ocorrem sobre insetos
	Ocorrem dentro dos insetos
<b>Causam doenças em insetos</b>	Micoses
	Viroses
	Bacterioses
	Protozooses
	Rickettsioses
	Verminoses, etc.

## 3.1 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

### 3.1.1 Interações Microbianas e Antagonismo

Interações entre microrganismos compartilhando um mesmo nicho ecológico revestem-se de características fundamentalmente competitivas.

Qualquer organismo vivo (bactérias principalmente) é capaz de perceber alterações no ambiente e a presença de outros seres vivos em sua proximidade, sendo isso crucial para sua sobrevivência. Considerado um dado nicho ecológico (rizosfera, rizoplane, fitoplane), sabe-se que bactérias estão continuamente sujeitas a diversas, contínuas, imprevisíveis e inesperadas alterações no ambiente que as circunda, como mudanças na disponibilidade de nutrientes, acidez, temperatura, disponibilidade de água, presença de outros microrganismos, entre outros (BAKER e COOK, 1974).

Em se tratando de bactérias, a microbiota circundante, quer procariótica, quer eucariótica, quase sempre é hostil por produzir e liberar no meio substâncias antibacterianas, por competir por água e nutrientes, por sequestrar íons importantes e, eventualmente, até mesmo por predação e hiperparasitar (CHIN et al., 2003).

Assim, bactérias, para se estabelecerem e conseguirem sobreviver nesse ambiente mutante, competitivo e adverso, precisam estar aptas a monitorar, continuamente, as condições externas e ser capazes de ajustar, de maneira rápida e precisa, suas estruturas, fisiologias e comportamentos. Para isso, elas precisam alterar a expressão de seus genes eficiente e rapidamente em resposta a sinais e potenciais ameaças do ambiente e da microbiota presente (DUFFY et al., 2004).

Quando se pensa em antagonismo microbiano (uma situação em que um microrganismo aciona seu arsenal de recursos para inibir o crescimento e a multiplicação de outro ou mesmo de provocar sua morte) há que se pensar em múltiplas possibilidades, como competição por nutrientes e por nichos ecológicos, sequestro de íons de ferro, produção de substâncias antimicrobianas, como antibióticos e compostos voláteis tóxicos, interferência com sinais (“*quorum sensing*”, por exemplo) e assim por diante (LIM et al., 2002).

### 3.1.2 Produção de substâncias antimicrobianas

A produção de substâncias antimicrobianas por microrganismos, como forma de exercer antagonismo sobre outros microrganismos, é praticamente universal (LIM et al., 2002). Há uma gama muito grande dessas substâncias descritas e estudadas. CHIN-A-WOENG et al., (2003) comentam que bactérias, como as espécies fluorescentes do gênero *Pseudomonas*, são muito versáteis em produzir substâncias antimicrobianas com propriedades antifúngicas e antibacterianas, como fenazinas, acetilfloroglucinol, oomicina, antranilatos, pioluteorina, pioverdinas, amônia, pioquelinas, lipopeptídeos cíclicos etc.

Segundo WHIPPS (2001), *Pseudomonas fluorescens*, isolamento F113, promove o biocontrole de *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* em batata graças à produção de DAPG (2,4 – diacetil-floroglucinol). Realmente, segundo RONIN et al., (1986), nessa interação agente-fitobactéria-planta, o biocontrole não é obtido pela co-dispensa, na planta, do patógeno e de um mutante do antagonista defeutivo para a síntese de DAPG, excluindo-se, pois, a hipótese de competição.

Existem muitas outras substâncias envolvidas na antibiose, como as herbicolinas A, B, O e I (ISHMARU et al., 1988; KEMPF e WOLF, 1989) e as pantocinas A e B, excretadas por *Pantoea agglomerans* (WRIGHT et al., 1996).

As fenazinas, substâncias antimicrobianas muito estudadas, merecem um especial destaque. Segundo CHIN-A-WOENG et al., (2003) elas encompassam uma família de pigmentos nitrogenados heterocíclicos com ação antimicrobiana de largo espectro, sendo produzidas apenas por bactérias, como as do gêneros *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Brevibacterium*, *Burkholderia* etc. Fenazinas são mais efetivas contra fungos, mas podem ter ação também contra bactérias. Presume-se que sua ação antifúngica aconteça quando elas se associam à membrana da hifa e atuam como redutor, provocando o desacoplamento da fosforilação oxidativa e causando o acúmulo de radicais superóxido e peróxido que são tóxicos às células fúngicas. Bactérias produtoras de fenazina, como *Pseudomonas aeruginosa*, são dotadas de eficientes superóxido-desmutases como forma de autoproteção. *Pseudomonas aureofaciens* tem na fenazina

PCA (fenazina-1-carboxilato) a ferramenta de antagonismo contra *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, segundo PIERSON et al., (1998). WELLER (1988) também relata a produção de fenazinas por espécies de *Pseudomonas* e que estas substâncias são inibitórias para vários fungos, como espécies de *Pythium* sp. e de *Rhizoctonia* sp. Comenta também que espécies do gênero *Bacillus* produzem várias substâncias antifúngicas e antibacterianas de largo espectro, como peptídeos, lipopeptídeos e aminoglicosídeos. *B. cereus*, uma espécie muito utilizada como agente de biocontrole de doenças de plantas (HSIEH et al., 2001; LYVER et al., 1998; SILVA et al., 2003 e 2004), produz dois antibióticos de largo espectro (zwittermicina e kanosamina) sendo bactérias insensíveis ao segundo.

Com relação à zwittermicina, utilizando *E. coli* como organismo modelo, HANDELSMAN e STABB (1996) sugerem que o antibiótico deve atuar sobre o organismo – alvo em nível de membrana e no metabolismo de ácidos nucleicos.

DUFFY et al., (2004) relatam que espécies fluorescentes de *Pseudomonas* produzem várias substâncias como mecanismos de antagonismo, a exemplo de fenazinas, PHL (2,4 – diacetil-floroglucinol), pyoluteorina, PCA e pirrolnitrina, entre outros.

Outro grupo de compostos antimicrobianos que merece específica atenção são as bacteriocinas. Termo cunhado por JACOB et al.,(1953), elas têm sido conceituadas como substâncias produzidas por bactérias e capazes, em baixas concentrações, de inibir a multiplicação de outras bactérias taxonomicamente afins; conseqüentemente, são elas antibióticos por definição (KURYLOWICZ, 1981; MADIGAN et al., 2003). Foi o trabalho pioneiro de GRATIA (1925) o primeiro claramente elucidativo sobre a atividade antibacteriana de bacteriocinas, ao observar que um isolamento de *E. coli* produzia, em meio líquido de cultura, uma substância termoestável e dialisável, capaz de inibir, em baixas concentrações, o crescimento de outro isolamento da mesma espécie. É possível que esse tenha sido o passo inicial para o estudo das bacteriocinas (JACK et al., 1995).

Bacteriocinas geralmente são de natureza protéica (STANIER et al., 1986), variando de polipeptídeos de baixo peso molecular, como os sintetizados por espécies do grupo corineforme fitopatogênico (GROSS e VIDAVER, 1979), a moléculas protéicas

grandes e particuladas, como as produzidas por patovares de *Pseudomonas syringae* (VIDAVER, 1983; SMIDT e VIDAVER, 1986). No caso do isolamento K84 de *Agrobacterium radiobacter*, usado comercialmente no biocontrole da galha incitada por *A. tumefaciens* em várias plantas (KERR, 1980), a bacteriocina produzida (Agrocina 84) não é de natureza protéica, mas um análogo da adenina (KERR, 1980; KERR e TATE, 1984). Quanto ao modo de ação das bacteriocinas, células de estirpes sensíveis possuem em sua superfície sítios receptores que são bioquimicamente reconhecidos pela bacteriocina (JACK et al., 1995; RILEY, 1998) num processo de complementaridade molecular, à semelhança de outras moléculas informais (DARNELL et al., 1990). A partir desse reconhecimento, a bacteriocina ganha o interior da célula via processos ainda não muito bem esclarecidos e, dependendo da interação microbiana em foco, múltiplos mecanismos de ação podem atuar, isolada ou concomitantemente, ocasionando a morte de células sensíveis. Dentre esses, a morte das células sensíveis pode se dar por alterações na permeabilidade do sistema de membranas, inibição de síntese e, ou, degradação de ácidos nucléicos, interferência na síntese de proteínas, bloqueio da síntese de peptídeo-glicano, interferência na geração de energia, comprometimento do fenômeno de transdução, etc.

Em termos de ecologia bacteriana, assume-se que as estirpes produtoras possuem uma vantagem adicional, em termos de sobrevivência e competição, sobre aquelas incapazes de sintetizá-las e que a elas são sensíveis. RILEY (1998) considera isso uma “vantagem competitiva” quando microrganismos, por serem taxonomicamente afins, possuem potencialidades bioquímicas e fisiológicas semelhantes, para disputarem nichos ecológicos no ambiente em que vivem.

### **3.1.3 Competição por nichos ecológicos**

Competição por espaço (nichos ecológicos) é um mecanismo de antagonismo microbiano e pode ter importantes implicações em controle biológico de enfermidades de plantas.

BONATERRA et al., (2003) trabalharam com o agente de biocontrole *Pantonea agglomerans* (Strain EPS125), eficiente no controle da podridão marrom (*Monilinia laxa*) e podridão mole (*Rhizopus stolonifer*) em frutos de abricó, pêsego e nectarina. *P. agglomerans* coloniza, multiplica-se e sobrevive em ferimentos. A co-semeadura do antagonista dos patógenos em difusatos de cascas de frutos e em suco de nectarina inibiram a germinação de conídios e o alongamento de hifas dos últimos. Contudo, nenhuma inibição era observada se havia a separação física dos antagonistas e dos patógenos através de uma membrana que permitia a passagem de nutrientes e metabólitos, descartando-se, pois, a competição por nutrientes ou a produção de substâncias antifúngicas pela bactéria.

Obviamente que é de certa forma, redundante considerar competição por nichos ecológicos um específico mecanismo de antagonismo, posto que, para competir por espaço físico, um microrganismo precisa acionar vários outros mecanismos de ataque e de defesa.

### **3.1.4 Competição por nutrientes**

CHIN-A-WOENG et al., (2003) consideram que microrganismos, para se multiplicarem, são altamente dependentes da disponibilidade de nutrientes prontamente utilizáveis e que a competição é muito grande em qualquer microbiota. Competir por nutrientes é uma das formas mais básicas e universais de antagonismo e, nesses casos, o período de reprodução da bactéria é crítico. Na opinião de DUFFY et al., (2004), a população bacteriana aumenta em função da disponibilidade de nutrientes no ambiente, e organismos que se multiplicam rapidamente e são capazes de utilizar uma gama de nutrientes mais ampla têm mais chance de sobreviver e de suplantar os competidores. Para WELLER (1988), organismos fisiologicamente versáteis, como espécies do gênero *Pseudomonas*, competem melhor. Inclusive, ZINSER e KOLTER (2004) lembram que, em consequência da intensa competição por nutrientes, microrganismos passam a maior parte de suas vidas nutricionalmente carentes.

Em situações de controle biológico de enfermidades de plantas, há de se ter em mente que a superfície de órgãos vegetais abriga uma diversificada microbiota, que tem como uma das principais fontes de nutrientes os exsudatos da planta. Qualquer procaríota agente de controle biológico que se queira introduzir deve ser necessariamente capaz de competir, com eficiência e rapidez, pelos escassos nutrientes em disponibilidade, ou ele não se estabelecerá nem sobreviverá (GOTO, et al., 1990).

*Pantoea agglomerans* (isolamento CPA-2) é um efetivo antagonista contra *Penicillium digitatum* e *Penicillium italicum*, ambos patógenos pós-colheita de frutos cítricos. POPPE et al., (2003), estudaram possíveis mecanismos de antagonismo, como antibiose, produção de enzimas quitinolíticas e competição, não encontrando resultados positivos nos dois primeiros casos. Quando estudaram competição por nutrientes, por meio de uma técnica específica que impedia o contato físico entre os componentes microbianos da interação, observaram que essa inibição parecia ser um dos mecanismos de antagonismo.

### **3.1.5 Hiperparasitismo**

Existem situações em que parasitas e predadores especializam-se de tal forma que o fenômeno precisa ser tratado diferencialmente. No caso de bactérias, dois tipos de parasitas merecem específica menção: os bacteriófagos e os procaríotas do gênero *Bdellovibrio*.

FLANNAGAN et al., (2004) relatam que *Bdellovibrio bacteriovorus*, parasita de várias bactérias Gram-negativas, é dependente de eficiente movimento flagelar para ser capaz de infectar a bactéria hospedeira. Assume-se, pois, que, se a bactéria suscetível conseguir interferir na motilidade, pode escapar da infecção. *Bdellovibrio* sp. (Strain HD94-12-7) é capaz de infectar e provocar lise da bactéria hospedeira *Vibrio fluvialis* e que o organismo infectante é sensível a diferentes condições do ambiente (LI et al., 2006), donde se depreende que, se o organismo antagonizado tiver condições de alterar o ambiente, tornando-o desfavorável, pode escapar do predador.

Bacteriófagos, ou mais simplesmente fagos, são vírus que infectam bactérias (DARNELL et al., 1990) e foram descobertos no início do século XX. Do ponto de vista estrutural, fagos são organismos muito simples, constituídos de uma capa protéica no interior da qual se situa o material genético. Ao infectar uma bactéria, o fago adere à sua superfície e depois insere seu material genético. Uma vez no interior da célula, o genoma se replica, originando fagos-filhos. A seguir, ocorrem colapso e morte da célula bacteriana. O ciclo de vida de um fago engloba duas fases básicas: lítica e lisogênica (DARNELL et al., 1990; STANIER et al., 1986).

Na fase lisogênica, fagos associam-se ao genoma do hospedeiro ou sofrem circularização e se comportam, morfológicamente, como se fossem plasmídeos, ao passo que, na fase lítica, o material genético do fago se desprende do cromossoma bacteriano ou se descirculariza e, utilizando estruturas da própria célula bacteriana, replica-se no citoplasma, sintetiza sua capa protéica e ocasiona a morte da célula por lise, liberando uma nova geração de fagos-filhos.

Segundo DUFFY (2003), fagos costumam exibir alta especificidade de hospedeiro, o que acaba implicando no surgimento rápido de bactérias resistentes. Da mesma forma que fagos podem infectar bactérias, estas podem desenvolver resistência a fagos. SCHNABEL e JONES (2001) propuseram fagos para o biocontrole da queima bacteriana das rosáceas frutíferas, mas encontraram isolados suscetíveis e resistentes a um mesmo fago dentro de uma coleção de culturas de *Erwinia amylovora*.

Estudando a resistência de *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*, FREIGOUN et al., (1994) observaram que ela se deve a vários mecanismos, sendo o mais importantes as modificações passíveis de acontecer na parede celular do patógeno bacteriano, dificultando a absorção da partícula viral.

### **3.1.6 Predação e Parasitismo**

No contexto deste tópico, predação e parasitismo estão sendo considerados quase como sinônimos, embora pesquisadores possam às vezes estabelecer uma sutil diferença

entre os dois termos. De qualquer modo, está-se excluindo, de predação e parasitismo, a atividade enzimática para exercício do antagonismo, a qual será tratada em um tópico à parte.

WHIPPS (1990) comenta que actinomicetos podem parasitar hifas de fungos numa situação em que propágulos aderem à parede da hifa e os nutrientes passam do organismo parasitado para o parasitante, como no caso do antagonismo exercido por *Enterobacter cloacae* contra *Pythium ultimum*.

EL-TARABILY et al.,(1997) estudaram o antagonismo exercido por actinomicetos contra *Phythium coloratum*, constatando que *Actinoplanes philippinensis* e *Micromonospora carbonaceae* cresciam epifiticamente na superfície de hifas e oósporos, causando freqüentemente colapso do citoplasma de células e de oósporos do hospedeiro.

## **3.2 MATERIAL E MÉTODO**

### **3.2.1 Atividade Antagonista *in vitro***

O antagonismo foi ensaiado pelo método de cultura pareada, ou simplesmente pareamento, que consistiu no confronto direto do antagonista (bactérias endofíticas) e do fungo simbionte *L. gongylophorus* e seus fungos associados.

Foram utilizados da coleção do LABGEMMA 160 bactérias endofíticas de diferentes plantas da Amazônia (Ej – *Peperomia* sp.; Dg – *Duguethia stelachanta*; Ansp – *Rollinia* sp.; Cosp – *Malvaviscus* sp.; Pp – *Pothomorphe peltata*; Stsp – *Strychnos* sp.; Cj- *Arrabidea* sp. e Qp- *Phyllanthus* sp) que apresentaram anteriormente em outros testes ação antifúngica ou antibacteriana.

Os fungos simbiontes foram cultivados em placas de petri com meio BDA (Batata Dextrose Ágar), pH 6,8 a 28°C, de 7 a 14 dias. Com o auxílio de um vazador de rolhas, foram retirados cilindros de ágar de 5 mm de diâmetro, das bordas das colônias dos fungos em crescimento. As bactérias endofíticas foram inoculadas em BDA, por 18 a 22

horas a 37°C. Após este período, foram coletadas por meio por meio de uma alça de platina e a seguir também transferidas para as placas do ensaio

O cilindro de meio de cultura contendo o fungo alvo a ser inibido bem como a bactéria atuando como possível agente inibidor foram colocados em pólos opostos equidistantes a 1 cm da borda interna da placa de Petri onde seriam realizados os ensaios. Durante a incubação, foi analisada a inibição do crescimento do fungo simbiote. Os testes foram realizados em triplicata e foram utilizados como controle placas contendo somente o fungo.

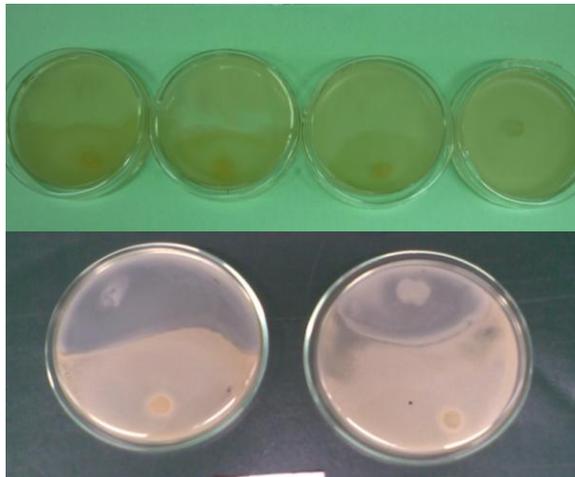
### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Após a identificação taxonômica dos fungos associados às formigas cortadeiras *A. sexdens* foram iniciados os testes de antagonismo. Para os testes foram utilizadas 160 bactérias endofíticas de diferentes plantas medicinais da Amazônia, estas bactérias apresentaram anteriormente ação antifúngica e antibacteriana mostrando-se como promissora ferramenta para o controle destes fungos.

Trabalhos utilizando amostras dessas bactérias foram realizados anteriormente por LIMA et al., (2010) que avaliaram antagonismo contra *Candida albicans* Algumas dessas bactérias endofíticas apresentaram resultados positivos de antibiose contra *C. albicans* e outras apresentaram micoparasitismo. Estes resultados sugerem que a biodiversidade de bactérias endofíticas de plantas arbóreas da Amazônia pode ser uma rica fonte de antifúngicos e de outras substâncias de valor biotecnológico.

Portanto, com resultados tão promissores em outros experimentos optou-se por utilizar 160 bactérias para o controle dos fungos associados às formigas cortadeiras: *L. gongylophorus*; *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., e leveduras. Os testes de antagonismo foram realizados pelo método de cultura pareada ou simplesmente pareamento, que consiste no confronto direto do antagonista (bactérias endofíticas) e dos fungos simbiotes.

O teste de antagonismo contra o fungo *L. gongylophorus* foi realizado no mês de janeiro de 2010 (Figura 7). Das 160 bactérias endofíticas utilizadas 38 apresentaram resultado positivo de antagonismo (antibiose). Todos os testes foram realizados em triplicata tendo como meio de cultura BDA (Batata Dextrose Agar). Conforme a tabela 4, podemos observar os principais resultados para este teste.



**Figura 7** – Atividade antagonista de bactérias endofíticas de plantas da Amazônia contra o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* fungo simbiote associado às formigas cortadeiras *Atta sexdens*.

Testes realizados com extratos vegetais de *Cedrela fissilis*, conhecida popularmente como cedro ou cedro real, contra as formigas cortadeiras *Atta sexdens* e seus fungos associados mostraram que extratos brutos de fruto, galho, caule e folha, alguns foram inativos e outros inibiram no máximo 40% o desenvolvimento do fungo (extratos brutos hexânico, ambos de galho e folha). Dos extratos brutos da raiz, os que apresentaram melhor atividade foram o hexânico e o diclorometânico, ambos inibindo em 100 % o crescimento do fungo simbiote na concentração de 1000 g/mL (GODOY et al., 2003).

Certos fungos apresentam potencial para utilização no controle biológico de formigas cortadeiras. Segundo QUIROZ (1996), os fatores de mortalidade mais

importantes para rainhas de *Atta mexicana* são os fungos entomopatogênicos. Em levantamentos realizados pelo autor, no México, foram identificadas as espécies *Aspergillus parasiticus*, *Paecilomyces farinosus*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* e *Metarhizium* sp., destacando-se nos ensaios de patogenicidade *Bauveria bassiana* e *P. farinosus*, como os mais promissores para controle biológico de *A. mexicana*. No Brasil, a maioria dos estudos tem sido realizada com *B. bassiana* e *M. anisopliae*, entretanto os resultados ainda não são conclusivos.

ALVES e SOSA-GOMEZ (1983) relatam a ocorrência destes fungos em rainhas de *Atta sexdens rubropilosa*, provocando a mortalidade em operárias, em condições de laboratório. Em floresta de *Eucalyptus grandis*, resultados promissores foram obtidos com a utilização de *B. bassiana*, em iscas, para controle de *Acromyrmex* spp. (DIEHL-FLEIG et al., 1992). No entanto, o controle biológico microbiano de formigas cortadeiras tem sido questionado devido ao fato destes insetos sociais reconhecerem agentes patogênicos e emitirem reações comportamentais de defesa (KERMARREC et al., 1986).

Obtivemos, portanto dos 160 testes de antagonismo utilizando bactérias endofíticas de plantas medicinais da Amazônia, 38 resultados positivos para a atividade antagonista do tipo antibiose, 55 resultados moderados e/ou médios da atividade antagonista, 64 de resultado negativo para atividade antagonista e em 03 bactéria apresentaram-se contaminada por outro microrganismo.

Além disso, neste primeiro teste medimos o espaçamento da área onde estava inoculado o fungo e a bactéria, conforme podemos observar na tabela 4. Neste sentido, podemos verificar que as bactérias: LB 18/03 QPC1 1.1; LB 04/03 COSP 42/32; LB 20/03 QPR1 2.2; LB 20/03 QPR2 3.2; ISP2 09/03 LB CJF 1.2; ISP2 09/03 CJRCO 1.1, mostraram-se com um maior espaçamento entre o fungo e as bactérias quando comparado com as demais, mas tal fato não descarta a possibilidade das outras bactérias serem utilizadas como antagonistas contra o fungo *L. gongylophorus*.

**Tabela 4** – Atividade Antagonista de bactérias endofíticas de plantas medicinais da Amazônia contra *L. gongylophorus* fungo associado às formigas cortadeiras.

<b>TABELA – ANTAGONISMO</b>				
<b>Identificação da Bactéria</b>	<b>Antagonismo</b>	<b>Diâmetro entre o fungo e a bactéria em cm</b>	<b>Diâmetro do Fungo em cm</b>	<b>Diâmetro da Bactéria em cm</b>
ISP2 20/03 EJF1 1.3	Negativo	Zero	Zero	Zero
ISP2 17/03 QPR2 3.2	Negativo	Zero	Zero	Zero
LB 20/03 QPF2 1.2	Moderado	0,5	2,2	2,7
LB 20/03 QPF2 3.1	Ótimo	2.4	6.8	5.0
LB 17/03 QPR1 3.1	Negativo	Zero	Zero	Zero
ISP2 20/03 CJC 3.3	Negativo	Zero	Zero	Zero
ISP2 17/03 QPR1 1.2	Ótimo	1.46	7.0	3.0
LB 17/03 QPR2 2.1 <sup>a</sup>	Negativo	Zero	Zero	Zero
ISP2 20/03 CJRCA 1.1	Moderado	1,46	Placa 9	3.0
ISP2 17/03 CJRC 2.2	Negativo	Zero	Zero	Zero
ISP2 17/03 QPR2 2.1	Moderado	0,7	2	2.5
LB 17/03 QPR2 3.2 <sup>a</sup>	Negativo	Zero	Zero	Zero
ISP2 17/03 QPR2 1.1	Negativo	Zero	Zero	Zero
ISP2 17/03 QPF2 2.3	Moderado	0.9	2.1	3.0
ISP2 20/03 QPC2 3.2	Ótimo	2.0	5.0	5.0
ISP2 20/03 QPC1 3.3	Negativo	Zero	Zero	Zero
ISP2 18/03 QPF1 3.2	Moderado	0.9	2.0	2.0
BDA 18/03 QPR1 1.1	Moderado	1.0	6.5	5.0
BDA 18/03 QPC2 2.2	Ótimo	2.0	5.5	2.2
BDA 18/03 QPC1 2.1	Moderado	0,5	1.5	1.7
ISP2 18/03 CJF1 3.3	Negativo	Zero	Zero	Zero
ISP2 QPF2 3.1	Ótimo	2.0	1.5	3.5
ISP2 20/03 QPF2 2.2	Ótimo	2.0	1.7	2.0

ISP2 17/03 QPC2 2.1	Ótimo	2.0	2.0	2.5
LB 17/03 QPR2 2.3	Moderado	0.7	1.8	2.0
LB 17/03 QPR2 2.1b	Negativo	Zero	Zero	Zero
LB 18/03 QPC1 1.1	Ótimo	3.5	5.5	4.4
ISP2 20/03 QPR2 3.3	Moderado	0,5	2.2	2.7
LB 17/03 QPR2 3.2b	Moderado	1,0	2.0	2.5
LB 17/03 QPF2 2.1	Ótimo	1.43	4.35	4.0
LB 17/03 QPR2 1.1	Negativo	Zero	Zero	Zero
ISP2 17/03 QPF2 2.3	Ótimo	1.5	1.5	2.3
ISP2 20/03 QPC1 3.3	Ótimo	2.0	6.8	3.5
LB 17/03 QPF1 3.2	Moderado	1.0	2.9	3.0
LB 17/03 CJRCA 2.2	Negativo	Zero	Zero	Zero
LB 17/03 QPR1 3.1	Moderado	1.0	3.6	2.5
LB 17/03 CJRCA 3.1	Negativo	Zero	Zero	Zero
ISP2 20/03 QPR1 2.3	Moderado	0.7	2.7	2.5
LB 17/03 QPR1 2.2	Moderado	1.0	1.8	1.5
ISP2 17/03 QPR1 1.2	Moderado	1.0	2.0	2.8
ISP2 17/03 QPF2 3.2	Moderado	0.9	2.4	3.0
LB 17/03 CJRCA 1.2	Ótimo	1.6	3.5	4.0
ISP2 20/03 CJRCO	Ótimo	1.7	3.6	3.5
3.2				
LB 17/03 CJC 3.3	Negativo	Zero	Zero	Zero
ISP2 20/03 CJRCO	Negativo	Zero	Zero	Zero
2.3				
LB 17/03 CJRCA 1.3	Moderado	0.6	3.1	1.7
LB 17/03 CJRCA 3.3	Negativo	Zero	Zero	Zero
LB 17/03 CJRCO 3.1	Negativo	Zero	Zero	Zero
LB 19/03 CJRCO 2.3	Moderado	0.6	5.6	0.6
LB 20/03 CJF 1.2	Negativo	Zero	Zero	Zero
LB 17/03 CJRCO 1.3	Negativo	Zero	Zero	Zero
LB 17/03 CJRCO 1.1	Negativo	Zero	Zero	Zero

ISP2	20/03	CJRCA	Ótimo	1.5	2.5	2.0
2.1						
ISP2	20/03	CJRCA	Moderado	0.7	2.7	2.1
1.1						
ISP2	20/03	CJR2A	Moderado	1.0	4.5	3.0
1.3						
ISP2	17/03	CJRC 2.2	Negativo	Zero	Zero	Zero
ISP2	20/03	QPR2 2.3	Ótimo	1.5	4.2	0.2
ISP2	03/04	DGCR2	Moderado	0.6	3.0	1.5
1.3 <sup>a</sup>						
LB	20/03		Moderado	1.2	2.8	0.8
AQNSPF32.1B						
ISP2	28/03	DGCR1	Moderado	0.7	4.5	1.7
1.1						
LB	30/03	CJRA 1.1	Contaminado			
ISP2	13/03	DGCR2	Ótimo	1.9	3.5	1.2
1.2						
ISP2	14/08	ANSPC2	Ótimo	2.5	3.5	1.1
2.1a						
ISP2	07/05	DGC1	Ótimo	2.5	2.7	2.2
2.3d						
LB	04/03	COSP 42/32	Ótimo	3.0	2.5	1.0
LB	20/03	QPF1 2.1 <sup>a</sup>	Moderado	0.5	4.0	3.0
LB	23/03	QPF1 3.3b	Ótimo	2.4	3.5	0.7
ISP2	09/03	COSPR2	Ótimo	2.2	2.9	1.2
BAC I						
LB	20/03	QPC2 3.3	Negativo	Zero	Zero	Zero
LB	20/03	QPR1 2.2	Ótimo	3.0	2.6	2.0
ISP2	09/03	COSPR2	Moderado	1.0	4.2	0.6
BAC I						
ISP2	08/09	PPC1 1.2	Moderado	0.9	3.8	0.9

LB 20/03 CJC 1.1	Negativo	Zero	Zero	Zero
LB CJRCA 1.2	Moderado	0.9	3.7	0.8
ISP2 11/04 CJRCO	Negativo	Zero	Zero	Zero
2.2				
LB 30/03 CJRCO 1.3	Negativo	Zero	Zero	Zero
ISP2 11/04 CJRCO	Moderado	0.5	4.5	0.5
3.3				
LB 20/03 QPF1 1.3	Negativo	Zero	Zero	Zero
LB 20/03 QPF1 3.3	Moderado	1.0	4.3	0.7
LB 30/03 QPC1 1.3	Moderado	1.0	2.4	3.6
LB 20/03 QPF1 3.3 <sup>a</sup>	Moderado	0.5	5.3	0.5
LB 30/03 QPR2 3.3 <sup>a</sup>	Ótimo	1.9	3.5	2.0
LB 30/03 QPC2 3.2	Moderado	0.6	4.3	1.6
LB 20/03 QPF2 2.3	Moderado	0.2	3.2	2.9
LB 23/03 QPF1 1.	Negativo	Zero	Zero	Zero
LB QPC2 2.1	Negativo	Zero	Zero	Zero
LB QPF1 1.3	Negativo	Zero	Zero	Zero
LB 20/03 QPC1 2.3	Negativo	Zero	Zero	Zero
LB 20/03 QPR2 3.2	Ótimo	3.2	3.6	2.0
ISP2 11/04 QPR1 3.2	Ótimo	1.7	4.3	0.5
LB 20/03 QPF2 3.3	Ótimo	1.9	3.9	0.4
ISP2 11/04	Ótimo	2.0	3.7	2.0
CONTROLE QP				
ISP2 16/06/08	Negativo	Zero	Zero	Zero
ANSPC2 2.1b				
ISP2 26/08/08	Negativo	Zero	Zero	Zero
ANSPCR1 2.2b				
ISP2 17/06/08	Negativo	Zero	Zero	Zero
DGCC2 3.1d				
ISP2 14/08/08	Moderado	0.9	5.5	1.0
STSPC2-2 1.1 <sup>a</sup>				

ISP2	09/05/08	Moderado	0.5	6.0	0.5
ANSPR2 1.2					
ISP2 LB 9/03 QPF2		Moderado	0.6	5.6	0.8
3.1					
ISP2	CJRCA	Ótimo	1.5	3.7	1.8
2.1					
LB	CJRCA	Moderado	0.7	4.6	2.3
1.3					
ISP2	CJF1 1.3	Moderado	0.2	5.4	2.9
ISP2 09/03 CJR2A		Moderado	0.5	4.7	4.0
1.3					
ISP2	CJRCA	Moderado	1.0	6.0	0.5
3.2					
ISP2	CJRCA	Moderado	0.2	3.0	0.2
1.3					
ISP2	QPF2 3.2	Ótimo	2.6	3.0	1.0
ISP2 09/03 LB CJF1		Ótimo	3.1	3.5	1.1
.2					
ISP2 09/03 LB		Negativo	Zero	Zero	Zero
CJRCA 3.3					
ISP2 09/03 CJRCA		Ótimo	3.0	4.9	1.2
1.1					
ISP2	QPC2	Ótimo	2.8	3.5	1.9
3.3					
LB 20/03 CJRCA 2.2		Negativo	Zero	Zero	Zero
LB 30/03 CJRCA 3.2		Negativo	Zero	Zero	Zero
ISP2	11/04	Negativo	Zero	Zero	Zero
CONTROLE					
CRAJIRU					
ISP2 11/04 CJRCA		Moderado	1.0	4.7	1.0
	CJRCA 3.3	Ótimo	2.1	4.5	1.2

LB 20/03 CJC 1.3	Negativo	Zero	Zero	Zero
LB 30/03 CJRCO 2.2	Negativo	Zero	Zero	Zero
ISP2 17/06/08	Negativo	Zero	Zero	Zero
DGCC2 3.1c				
ISP2 09/03 COSPR2	Negativo	Zero	Zero	Zero
BAC I				
LB 30/03 CJRCO 2.2	Negativo	Zero	Zero	Zero
AVEIA 26/08 DGR1	Negativo	Zero	Zero	Zero
2.2b				
LB 09/03 COSR3	Negativo	Zero	Zero	Zero
BAC				
LB 09/03 COSPR2	Negativo	Zero	Zero	Zero
2.1				
LB 09/03 COSPR2 /	Negativo	Zero	Zero	Zero
32				
LB 09/03 COSF2	Negativo	Zero	Zero	Zero
BAC				
LB 09/03 COSPR2	Moderado	1.0	4.0	0.8
BAC				
LB 09/03 COSP	Negativo	Zero	Zero	Zero
MBDA 16				
LB 09/03 COSPF 23	Moderado	0.8	3.7	1.0
ISP2 09/03 COSPR2	Negativo	Zero	Zero	Zero
13 BAT A				
ISP2 09/03 COSP	Negativo	Zero	Zero	Zero
MBDA				
LB 09/03 COSPR2	Moderado	1.0	4.6	2.2
3.3				
LB 09/03 COSP	Negativo	Zero	Zero	Zero
MBDA				
LB 09/03 COSPR2	Moderado	0,7	4.0	3.3

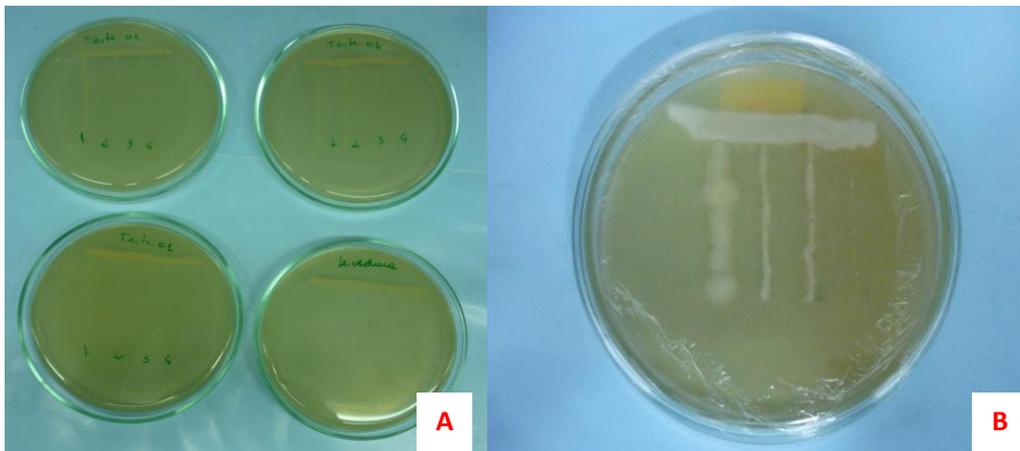
3.3 GETO						
LB	09/03	COSPR2 13	Negativo	Zero	Zero	Zero
LAT						
LB	09/03	COSPR1	Moderado	1.0	5.0	2.1
BAC						
ISP2		COSPR2 13	Negativo	Zero	Zero	Zero
LAT						
ISP2	09/03	COSPR2	Negativo	Zero	Zero	Zero
13 LAT b						
LB	09/03	COSPR3	Negativo	Zero	Zero	Zero
BAC						
LB	09/03	COSPR2 13	Moderado	0.4	6.0	2.0
RAT						
LB	09/03	COSPH2	Contaminado			
2.1						
ISP2	09/03	COSPR2	Moderado	1.0	5.0	2.2
BAC						
LB	09/03	COSPR1	Moderado	0.5	6.0	1.5
BAC						
LB	09/03	COSPH2	Moderado	0.5	5.0	2.2
2.1						
ISP2	09/03	COSPB2	Negativo	Zero	Zero	Zero
13 LAT						
LB	09/03	COSPR1	Ótimo	1.2	4.0	0.6
BAC						
LB	09/03	COSPH2	Contaminado			
2.1						
ISP2	09/03	COSPB2	Ótimo	1.4	3.0	1.2
13 LAT X						
ISP2	09/03	COSP F1	Moderado	1.0	4.2	1.4
3.2						

ISP2	09/03	COSP	Moderado	1.0	3.2	2.2
MBDA 13						
ISP2	09/03	COSPH	Ótimo	1.5	3.5	0.5
BDA1						
A			Negativo	Zero	Zero	Zero
B			Negativo	Zero	Zero	Zero
C			Negativo	Zero	Zero	Zero
D			Moderado	0,7	5.5	0.8
LB	30/03	QPC1 3.3	Negativo	Zero	Zero	Zero
LB	17/03	QPC2 2.1	Moderado	1.0	5.3	0.5
	08/09	CJC 2.2	Ótimo	2.7	3.7	4.0
		DGCC2 1.3	Negativo	Zero	Zero	Zero
		EJC1 1.1b	Negativo	Zero	Zero	Zero
BAC 1						
		DGR2 1.3	Ótimo	2.0	4.5	1.2
		PPR2 2.1 <sup>a</sup>	Negativo	Zero	Zero	Zero

Atualmente têm se realizado estudos com algumas espécies botânicas para o controle do jardim de fungos associados às formigas cortadeiras, sendo um dos destaques, *Trichilia emetica*, conhecida por possuir atividades contra *Schistosoma haematobium* (SPARG et al., 2000). Alguns trabalhos com diferentes espécies de *Trichilia* relataram a presença de tetranotirpenóides nas raízes, com atividade deterrente (SIMMONDS et al., 2001), bem como o isolamento de limonóide da casca do caule (CORTEZ, 2000).

Resultados obtidos com os extratos de *Trichilia* sp. sobre o desenvolvimento do fungo simbionte mostraram que os extratos e frações de folha não inibiram ou inibiram discretamente (20%) o fungo. Resultados mais expressivos foram obtidos com os extratos hexânicos brutos de galho e dos frutos, ambos inibindo em 60% o crescimento do fungo. Do fracionamento dos extratos de galhos (GODOY, 2003) obteve a fração mais ativa que apresentou inibição de cerca de 40%. As análises das frações mostraram que os principais compostos presentes eram os ácidos graxos hexadecanóico e oléico. Estes resultados vieram a confirmar os ensaios realizados por SIMMONDS et al., (2001) que, analisando

a atividade de ácidos graxos variando o número de carbonos de 6 a 31, verificou que a toxicidade para o fungo esteve entre 6 a 12 carbonos, sendo que, maiores cadeias carbônicas resultaram na perda da atividade. Outro fator verificado foi que o grau de insaturações favorecia a atividade antifúngica destes compostos. Segundo GODOY (2003), o ácido hexadecanóico (palmítico) na concentração de 100 mg/mL não inibiu o fungo, enquanto que o ácido oléico na mesma concentração inibiu o desenvolvimento do fungo em 40%. Já o ácido linoléico e o linolênico inibiram 80% o fungo também na concentração de 100 mg/mL.



**Figura 8** – Atividade antagonista de bactérias endofíticas de plantas medicinais da Amazônia, contra a levedura isolada do jardim de fungo simbiote das formigas cortadeiras *Atta sexdens*. A e B – Testes de antagonismo contra a levedura.

Neste segundo teste de antagonismo, verificou-se que a levedura isolada do jardim de fungos simbiotes inibiu o crescimento da maioria das bactérias endofíticas utilizadas como antagonistas, figura 8. Conforme observado na tabela 5, também foram obtidos poucos resultados positivos de antagonismo das bactérias endofíticas contra a levedura. MAGLIANI et al. (1997), descrevem que algumas leveduras podem secretar compostos (micocinas ou toxinas killer), geralmente glicoproteínas antagônicas para outras espécies de leveduras. Dentre as estirpes isoladas de ninhos de *A. sexdens* por CARREIRO et al., (2002), foi constatada a presença de atividade “killer” em espécies de *Aureobasidium*,

*Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulasporea*, *Tremella* e *Trichosporon*. Essa atividade killer pode ser um instrumento para a manutenção da estrutura da comunidade de leveduras (CARREIRO et al., 2002).

**Tabela 5** - Atividade Antagonista de bactérias endofíticas de plantas medicinais da Amazônia contra uma levedura isolada do jardim de fungos associados às formigas.

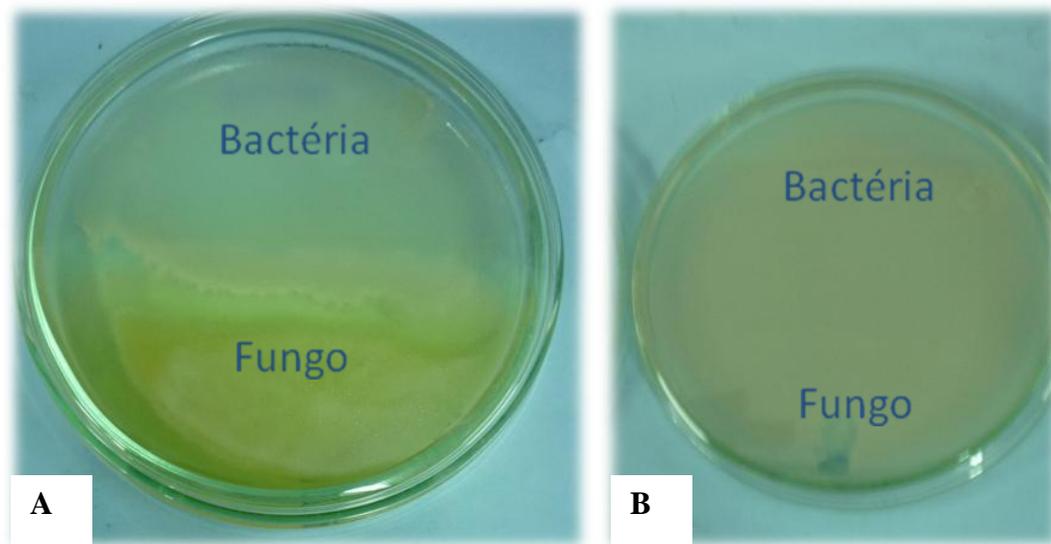
Nome das Bactérias	Resultados
ISP2 17/03 QPC2 2.1	Houve um deslocamento da levedura
ISP2 17/03 CJRC 2.2	Inibiu o crescimento da levedura

A pesquisa de Rodrigues e colaboradores (2009) mostraram que o antagonismo de leveduras isoladas de ninhos de *A. texana* em relação ao fungo parasita *Escovopsis*, sendo que as espécies *Bullera sinensis*, *Cryptococcus magnus* e espécies de *Pseudozyma* inibiram significativamente as duas estirpes de *Escovopsis* testadas. Esta observação evidenciou um papel biológico das leveduras até então desconhecido em relação à defesa do ninho contra *Escovopsis*.

Por outro lado, LITTLE e CURRIE (2007) encontraram um possível novo simbionte associado a formigas da espécie *Apterostigma pilosum*, uma Attini basal. Leveduras negras do gênero *Phialophora* foram isoladas da cutícula, na região do tórax, isto é, no mesmo local em que as bactérias simbiotes se encontram. Elas podem utilizar nutrientes diretamente da *Pseudonocardia*, o que promove o crescimento dessas leveduras e diminui o crescimento da *Pseudonocardia*, dessa forma interferindo de modo negativo na proteção aos ninhos. Assim poderiam reduzir o crescimento das bactérias produtoras de antibióticos que inibem o fungo *Escovopsis*. Portanto, as leveduras negras podem sinergizar indiretamente a infecção por *Escovopsis* nos ninhos dessas formigas (LITTLE; CURRIE, 2008).

Muitos dos gêneros e espécies de formigas nunca foram estudados quanto à ocorrência e características das leveduras associadas aos seus ninhos, principalmente, com ninhos de Attini não cortadeiras, mostrando uma nova linha promissora de pesquisas.

No teste seguinte, das 160 bactérias endofíticas utilizadas no confronto direto contra o *Trichoderma* sp., dezenove (19) apresentaram resultado positivo para antagonismo, nove (9) apresentaram resultado moderado e cento e trinta e dois (132) apresentaram resultado negativo. Na tabela 6 podemos observar todas as bactérias que apresentaram o resultado positivo de antagonismo do tipo antibiose para este fungo.



**Figura 9** – Atividade antagonista de bactérias endofíticas de plantas da Amazônia contra *Trichoderma* sp. A – placa mostrando a atividade antagonista; B – placa mostrando que o fungo não cresceu.

**Tabela 6** – Resultados positivos dos testes de antagonismo das bactérias endofíticas contra o fungo isolado *Trichoderma* sp.

<b>Teste Antagonismo - Resultados ótimos</b>	
<b>Bactérias</b>	<b>Placa 4.2</b>
ISP2 17/03 QPC2 2.1	Antagonismo positivo
LB 20/03 QPF2 2.3	Antagonismo positivo
LB 09/03 COSP MBDA	Antagonismo positivo
LB 20/03 QPF2 3.1	Antagonismo positivo
ISP2 20/03 QPF2 2.2	Antagonismo positivo
ISP2 20/03 QPR2 3.3	Antagonismo positivo
ISP2 08/09 PPC1 1.2	Antagonismo positivo
LB 09/03 COSPH2 2.1	Antagonismo positivo
ISP2 09/03 CJRCO 1.1	Antagonismo positivo
ISP2 17/03 CJC 3.3	Antagonismo positivo
LB 18/03 QPC1 1.1	Antagonismo positivo
ISP2 09/03 COSPR2 BAC	Antagonismo positivo
ISP2 CJRCO 3.3	Antagonismo positivo
LB 17/03 CJRCO 1.1	Antagonismo positivo
LB 20/03 QPF1 3.3	Antagonismo positivo
LB 09/03 COSPR1 BAC	Antagonismo positivo
LB 09/03 COSPF2 BAC	Antagonismo positivo

ISP2 09/03 COSPNBDA 2

Antagonismo positivo

LB

QPC2 2.1

Antagonismo positivo

MENDES (2010) realizou um experimento para a avaliação da atividade antagonista das actinobactérias sobre os fungos filamentosos isolados do jardim de fungo de *Trachymyrmex* sp. (grupo Iheringi) mostrando que das 38 actinobactérias isoladas, apenas 9 (23,68%) apresentaram inibição do crescimento de pelo menos um dos fungos filamentosos isolados do jardim de fungo de *Trachymyrmex* sp. (grupo Iheringi) (*Fusarium solani*, *Mucor* sp. e *Trichoderma spirale*).

Diversos autores têm relato a presença de actinobactérias não pertencentes ao gênero *Pseudonocardia* associadas a formigas Attini (KOST et al., 2007; MUELLER et al., 2008; HARDER et al., 2009; ZUCCHI, et al., 2010). Estas actinobactérias podem não fazer parte da simbiose e sim serem apenas transitórias ou frutos de contaminação.

Porém, actinobactérias não-*Pseudonocardia* isoladas do exoesqueleto de operárias apresentaram forte atividade sobre o crescimento de *Escovopsis*, maior atividade se comparada com as estirpes de *Pseudonocardia* spp. e também inibiram o crescimento dos fungos *Fusarium solani*, *Mucor* sp. e *Trichoderma spirale*, sugerindo que estas bactérias, além de controlarem o crescimento do *Escovopsis* também podem atuar na defesa do ninho contra outros fungos. Aparentemente, muitas actinobactérias contribuem para a não contaminação dos ninhos de Attini produzindo compostos antimicrobianos (MENDES, 2010).

Outro teste de antagonismo foi realizado por FAVARIN (2005) testando linhagens de *Streptomyces*, o qual mostrou resultados de inibição da germinação dos conídios de todas as linhagens do fungo *Escovopsis weberi*. Houve inibição da germinação dos conídios até mesmo com a adição da menor concentração dos filtrados testada, ou seja, para uma proporção de 10 % do filtrado, obtiveram cerca de 80 % de germinação dos conídios, e com o aumento da concentração dos filtrados incorporados ao

meio de cultivo, a porcentagem de germinação dos conídios diminuiu, sendo totalmente inibidos quando testados com a adição da maior concentração de filtrados, 50 %.

O quarto teste de antagonismo foi realizado com o fungo isolado *Aspergillus flavus*, figura 10, este teste foi realizado com duas metodologias diferentes para a adequação e verificação dos resultados, mas ambos apresentaram resultados positivos, entre os mesmos destacaram-se 21 bactérias endofíticas com resultados positivos de antagonismo (tabela 7) para este fungo, dez com resultado de antagonismo moderado e 129 apresentando resultados negativo.



**Figura 10** – Teste de Antagonismo com as bactérias endofíticas de plantas da Amazônia, mostrando a inibição do fungo *Aspergillus flavus*, isolado do jardim de fungo simbiote das formigas cortadeiras *Atta sexdens*.

**Tabela 7** – Resultados positivos de antagonismo para o fungo *Aspergillus flavus* isolado do formigueiro de *Atta sexdens*.

<b>Antagonismo Positivo: bactérias endofíticas x <i>A. flavus</i></b>
<b>Isolados bacterianos antagônicos</b>
LB 20/03 QPF2 2.3
LB 20/03 QPF2 3.1
ISP2 17/03 QPR1 1.2
ISP2 18/03 QPF1 3.2
ISP2 20/03 QPF2 2.2
BDA 18/03 QPC2 2.2
ISP2 20/03 QPR2 3.3
LB 30/03 QPC2 3.2
LB 09/03 COSP MBDA 16
ISP2 17/03 CJC 3.3
LB 18/03 QPC1 1.1
ISP2 CJRCO 3.3
LB 20/03 QPF1 3.3
ISP2 QPF2 3.2
LB 19/03 CJRCO 2.3
LB 09/03 COSPR2 3.3

---

LB 20/03 QPC2 3.3

ISP2 COSPR2 13 LAT

LB 09/03 COSPR2 3.3 GETO

LB 20/03 QP 1.2

ISP2 09/03 COSPR2 BAC J

---

Após a realização de todos os testes de antagonismo (*Leucoagaricus gongylophorus*, Levedura, *Trichoderma longibrachiatum*, *Aspergillus flavus*), os dados foram reunidos em planilhas com os resultados mais promissores e foram escolhidas as bactérias que proporcionaram um resultado positivo em 3 ou 4 testes (tabela 9).

**Tabela 8** – Resultados de todos os testes de antagonismo com as bactérias endofíticas de plantas medicinais da Amazônia, contra os isolados *Leucoagaricus gongylophorus*, Levedura, *Trichoderma longibrachiatum*, *Aspergillus flavus* provenientes do jardim de fungos associados das formigas cortadeiras *Atta sexdens*.

<b>Teste Antagonismo - Resultados ótimos</b>					
<b>Bactérias endofíticas</b>	<b>Levedura</b>	<b>Leucoagaricus</b>	<b>Placa 4.2</b>	<b>Placa 1.1B</b>	<b>Placa 1.1B outra metodologia</b>
ISP2 17/03 QPC2 2.1 *	X	X	X		
LB 20/03 QPF2 2.3 *		X	X	X	
LB 20/03 QPF2 3.1 *		X	X		x
ISP2 18/03 QPF1 3.2 *		X		X	x
ISP2 20/03 QPF2 2.2 *		X	X		x
ISP2 20/03 QPR2 3.3 *		X	X	X	
ISP2 20/03 QPC1 3.3		X			
LB 30/03 QPC2 3.2		X		X	

\* Bactérias endofíticas escolhidas para formar o “Pool” das bactérias utilizadas no teste *in vivo* com as formigas cortadeiras e seu fungo simbionte.

Como observado na tabela 9, das 160 bactérias endofíticas utilizadas nos testes de antagonismo apenas seis apresentaram ação antagonista contra, pelo menos, três fungos simbiontes (QPC2 2.1, QPF2 2.3, QPF2 3.1, QPF1 3.2, QPF2 2.2, QPR2 3.3). Tais bactérias foram, portanto, utilizadas para os testes *in vivo*.

### **3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Bactérias endofíticas conhecidas inicialmente como assintomáticas passaram a ter destaque já que cada vez mais, novas funções e atividades vêm sendo atribuídas aos microrganismos endofíticos, conseqüentemente, vão surgindo novas possibilidades para o uso desses microrganismos em processos biotecnológicos. Fungos e bactérias endofíticos estão sendo utilizados no controle biológico como vetores para introdução de genes em plantas e como produtores de fármacos (SALLES et al. 2000; ZHANG et al. 2006; STROBEL e DAISY 2003; BILLS et al. 2002).

Os endófitos produzem enzimas, antibióticos, substâncias anticancerígenas, gomas, auxinas, giberelinas. São responsáveis pela fixação do nitrogênio, podem solubilizar fosfatos e ser usados como agentes de controle biológico etc. (SOUZA, 2006; STROBEL, 2002; STROBEL et al. 1996).

A maioria dos estudos com os microrganismos endofíticos se concentra em plantas de climas temperados e somente mais recentemente esses estudos se voltaram para as plantas de clima tropical sendo que, também nestes casos, resultados interessantes vêm se confirmando e até ampliam-se as perspectivas de aproveitamento biotecnológico (SAMUELS, 2004; STROBEL, 2002; SOUZA et al. 2004; HANADA et al., 2009).

Considerando a importância dos microrganismos, o pouco que se conhece da biodiversidade existente e ainda diante dos resultados obtidos nesta pesquisa onde explorou-se novos novos métodos de controle biológico de formigas cortadeira, justificam-se novas pesquisas com essa abordagem utilizando-se os microrganismos endofíticos. A biodiversidade microbiana no interior das plantas é quase que totalmente desconhecida e especialmente nas plantas da Amazônia. Os dados de pesquisa nessa área na região ainda são preliminares, frutos de poucas teses, dissertações e de trabalhos de iniciação científica (PEREIRA et al., 2007).

O fato de alguns endófitas exercerem atividade antagonística contra fitopatógenos, em bioensaios, *in vitro*, pode sugerir uma potencialidade como agentes de biocontrole. Tal fato corrobora para os resultados vistos neste trabalho onde bactérias endofíticas utilizadas nos testes de antagonismo contra os fungos associados das formigas cortadeiras comprovaram ação antagonista, mostrando-se, *in vitro*, promissoras para o controle dos fungos associados a formigas cortadeiras, e indiretamente viabilizando-se o controle das próprias formigas.

Para estas seis bactérias com resultado positivo foi realizado o “pull das bactérias”, ou união das mesmas, para futuros testes de mortalidade *in vivo* contra formigueiros.

### 3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S.B.; SOSA GOMEZ, D.R. 1983. Virulência do *Metharhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. para castas de *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908). **Poliagro**, v.5, n.1, 1-9 p.

ALVES, S.B. 1998. Patologia e controle microbiano: Vantagens e desvantagens, p.21-37. In S.B. Alves (ed.), **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba, FEALQ, 1163p.

AUSTEN, R. A. 1657. **A Treatise of fruit trees**. Henery Hall, Oxford.

BAKER, E. F.; COOK, R.J. 1974. **Biological control of plant pathogens**. W.H. FREEMAN; CO. SANFRANSISCO, 433pp.

BASHAN, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnol. Adv.** 16:729-770 p.

BASHAN, Y.; LEVANONY, H. 1991. Alterations in membrane potential and in proton efflux in plant roots induced by *Azosprillum brasilense*. **Plant Soil** 137:99-103 p.

BILLS, G., A.; DOMBROWSKI, F.; PELAEZ, J.; POLISHOOK; AN, Z. 2002. Recent and future discoveries of pharmacologically active metabolites from tropical fungi. 165–194 pp. In: Watling R., Frankland J. C., Ainsworth A. M., Issac S.; Robinson C. H.. (ed.), **Tropical mycology: micromycetes**; v. 2. CABI Publishing; New York - N.Y.

BONATERRA, A.; MARI, M.; CASALINI, L.; MONTESINOS, E. 2003. Biological control of *Monilinia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in postharvest of stone fruit by *Pantoea*

*agglomerans* EPS125 and putative mechanisms of antagonism. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v. 84, 93-104 p.

BROADBENT, P., FRASER, L. R.; LONG, J. K. 1971. Exocortis virus in dwarfed citrus trees. **Plant Dis. Rep.** 55: 998-99 p.

CARREIRO, S.C.; PAGNOCCA, F.C.; BACCI, M, JR.; BUENO, O.C.; HEBLING, M.J.;MIDDELHOVEN, W.J. 2002. Occurrence of killer yeasts in leaf-cutting ant nests. **Folia Microbiol. (Praha)**. 47, 259–262 p.

CARREIRO, M.M., SINSABAUGH, R.L., REPERT, D.A., PARKHURST, D.F., 2000. Microbial enzyme shifts explain litter decay responses to simulated nitrogen deposition. **Ecology** 81, 2359–2365 p.

CHEN, I.-C. K., COFFEY, J. T., MUDGE, T. N. 1996. **Analysis of Branch Prediction Via Data Compression**. In *ASPLOS VII*, Cambridge, Massachusetts. 128-137 p.

CHEN-SHAN CHIN.; MANOJ PRATIM SAMANTA. 2003. Global snapshot of a protein interaction network -- a percolation based approach. **Bioinformatics**, 19, 2413-2419 p.

CHIN, J.W., CROPP, T.A., ANDERSON, J.C., MUKHERJI, M., ZHANG, Z., SCHULTZ, P.G. 2003. An expanded eukaryotic genetic code. **Science** 301: 964–967 p.

CHIN-A-WOENG, T.F.C.; BLOEMBERG, G.V.; LUGTENBERG, B.J.J. 2003. Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. **New Phytologist**, v.157, 503-523 p.

COOK, R.J.; K.F. BAKER. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. Amer. **Phytopathol. Soc. Press**, St. Paul, Minn.

CÔRTEZ, M.I.S. 2000. **Epidemiology of traumatic injuries to permanent teeth and the impact on the daily living of Brazilian schoolchildren**. Tese de Doutorado. Londres: Department of Epidemiology and Public Health, University College London. 247 p.

DARNELL, J., LODISH, H., BALTIMORE, D. 1990. Actm, myosin, and intermediate filaments: cell movements and cell shape. In: Darnell J, Lodish H, Baltimore D, eds. *Molecular Cell Biology*. 2nd ed. New York: **Scientific American Books**, 859-902 p.

DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M.E. DA; BORTOLÁS, E.P. 1992. Emprego do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* em iscas para o controle das formigas cortadeiras

*Acromyrmex* spp. em floresta implantada de *Eucaliptus grandis*. In: **Congresso Florestal Estadual**, 7, Nova Prata, RS. Anais. Nova Prata, 1139-50 p.

DUFFY, V.B., PETERSON, J.M., BARTOSHUK, L.M. 2004. Associations between taste genetics, oral sensation and alcohol intake. *Physiol Behav* 82:435– 445 p.

DUFFY, K. 2003. Failing Students: a Qualitative Study of Factors that Influence the Decisions Regarding Assessment of Students' Competence in Practice.

EL-TARABILY, K.A., HARDY, G.E., SIVASITHAMPARAM, K., HUSSEIN, A.M., KURTBOË KE, I.D. 1997. The potential for the biological control of cavity spot disease of carrots caused by *Pythium coloratum* by streptomycete and non-streptomycete actinomycetes in Western Australia. **New Phytologist**. 137, 495-507 p.

FAVARIN, J. L.; NETTO, J. A. F.; GALLO, L. A.; SALGADO, P. R.; BERNARDES, M. S.; FAVARIN, J. L.; CAMARGO, F. T. 2005. **Atividade diária da redutase do nitrato e glutamina sintetase em cafeeiro arábica.**

FAVARIN, J.L.; MARINI, J.P. 2000. **Importância dos micronutrientes para a produção de grãos.** In: SOCIEDADE NACIONAL DA AGRICULTURA.

FLANAGAN, N., TOBLER, A., DAVISON, A., PYBUS, O.G., KAPAN, D.D., PLANAS, S. 2004. The historical demography of Müllerian mimicry in the Neotropical *Heliconius* butterflies. **Proc Natl Acad Sci USA** 101: 9704–9709 p.

FREIGOUN, S.O., CROSSE, J.E., 1975. Host relations and distribution of a physiological and pathological variant of *Pseudomonas morsprunorum*. **Annals of Applied Biology** 81: 317- 330 p.

FREIGOUN, S.O., EL FAKI, H.I., GELIE, B., SCHIRMER, M., LEMATTRE, M. 1994. Phage sensitivity in relation to pathogenicity and virulence of the cotton bacterial blight pathogen of Sudan. **Plant Pathology (Oxford)** 43:493-499 p.

GODOY, H.; REICHART, P. A. 2003. Oral Manifestations of Paracoccidioidomycosis. Report of 21 Cases from Argentina. **Mycoses**. V 46, 412-417 p.

GOTO Y, NONAKA I, HORAI S. 1990. A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. **Nature**. 13;348 (6302):651-3 p.

GRATIA, A. 1925. C. R. Soc. Biol. (Paris), 93, 1040.

GROSS, D. C.; VIDAVER, A. K. 1979. Bacteriocins of phytopathogenic *Corynebacterium* species. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 25, p. 367-374 p.

GROSS, D. C.; VIDAVER, A. K.; KERALIS, M. B. 1979. Indigenous plasmids from phytopathogenic *Corynebacterium* species. **Journal of General Microbiology**, London, v. 115, 479-489 p.

HANADA, R. E.; T. DE JORGE SOUZA; POMELLA, A. W.; HEBBAR, K. P.; PEREIRA, J. O.; ISMAIEL, A.; SAMUELS, G. J. 2008. *Trichoderma martiale* sp. nov., a new endophyte from sapwood of *Theobroma cacao* with a potential for biological control. **Mycological Research** v. 112, 1335-1343 p.

HANADA, R. E.; POMELLA, A. W.V.; SOBERANIS, W.; LOGUERCIO, L. L.; PEREIRA, J. O. 2009. Biocontrol potential of *Trichoderma martiale* against the black-pod disease (*Phytophthora palmivora*) of cacao. **Biological Control**, v. 50, p. 143-149 p.

HARDER, J. W., FONTENLA, J. M. P. PILEWSKIE, E. RICHARD, C. WOODS, T. N. 2009. Trends in solar spectral irradiance variability in the visible and infrared, **Geophys.**

HANDELSMAN, J., STABB, E.V. 1996. Biocontrol of soil borne plant pathogens. **Plant Cell** 8: 1855–1869 p.

HARTLEY C. 1921. Damping – off in forest nurseries. **US Dept Agric Bull** 934, 1-99 p.

HENRY, D. C. 1931. **Proc. Roy. Soc. Ser. A.** 133:106.

HSIEH K, HELLER T, MILLER AB. 2001. Risk factors for injuries and falls among adults with developmental disabilities. **J Intellect Disabil Res** 45:76–82 p.

ISHMARU, C. A.; KLOS, E. J.; BRUBAKER, R. R. 1988. Multiple antibiotic production by *Erwinia herbicola*. **Phytopathology**, v. 78, 746-750 p.

JACOB, F., LWOFF, A., SIMINOVICH, A., WOLLMAN, E. 1953. Définition de quelques terms relatifs à La lysogénie. **Ann. Inst. Pasteur**, 84: 222-224 p.

JACK, R. W., TAGG, J. R., RAY, B. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Microbiological Reviews**, 171: 171-200 p.

KERMARREC, A.; FEBUAY, G.; DE CHARME, M. 1986. Protection of leaf-cutting ants from biohazards: is there future for microbiological control? In: LOFGREN, C.S. e VANDER MEER, R.K. Fire ants and leaf-cutting ants - biology e management. **Westview Press**, 339-56 p.

KEMPF, H.J.; WOLF, G. 1989. *Erwinia herbicola* as a biocontrol agent of *Fusarium culmorum* and *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* on wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v.79, p.990- 994 p.

KERR, A.R., 1979. Noise and loss in balanced and subharmonically pumped mixers: Part II — Application. *IEEE Trans. Microwave Theory Tech.*, **MTT-27**, 944-950 p.

KERR, A. 1980. Biological control of crown gall through production of Agrocin 84. **Plant Disease**, v.64, 24-30 p.

KERR, A., TATE, M. E. 1984. Agrocin and the biological control of crown gall. *Microbiol Sci*, 1 : 1-4 p.

KHAN, A. M., SAXENA, S. K., SIDDIQI, Z. A. 1971. Efficacy of *Tagetes erecta* in reducing root infesting nematodes of tomato and okra. **Indian Phytopathology** 24: 166-169 p.

KHAN, H. A., QAMAR, F. SAEED, M., KHAN, S. A. 1990. The nematicidal properties of compounds of plant origin with emphasis on polyphenols - a review. **Proceedings of Parasitology** 9(No. 1): 87-91 p.

KLOEPPER, J. W.;SCHORTH, M.N. 1981. Plant growth promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. **Phytopathology** 71:642-644 p.

KOST, M.A., D.A. ALBERT, J.G. COHEN, B.S. SLAUGHTER, R.K. SCHILLO, C.R. WEBER, CHAPMAN, K.A. 2007. Natural communities of Michigan: Classification and description. Michigan Natural Features Inventory, **Report Number**, Lansing, MI. 314 p.

KURYLOWICZ, W. 1981. *Antibióticos - Uma revisão crítica*, Editora Universitária – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 341 p.

LI, J., BARREDA, D.R. ZHANG, Y. BOSHRA, H. GELMAN, A.E. 2006. B-Lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytes abilities. **Nat. Immunol.**, 7: 1116-1124 p.

LIM, G., LIM, T. YAHAYA, H. 2002. The first report of the national cancer registry: Cancer incidence in Malaysia 2002. National Cancer Registry of Malaysia.

LIMA, A. M., MELO, J. L. S., MELO, H. N. S., CARVALHO, F. G. 2010. Avaliação do potencial fitorremediador da mamona (*Ricinus communis* L) utilizando efluente sintético contendo chumbo. *Holos*, Ano 26, Vol. 1 51 p.

LITTLE, A.E.F., CURRIE, C.R. 2007. Symbiont complexity: discovery of a fifth symbiont in the attine ant-microbe symbiosis. **Biology Letters** 3:501-504 p.

LITTLE, A.E.F CURRIE, C.R. 2008. Black yeast symbionts compromise the efficiency of antibiotic defenses in fungus-growing ants. **Ecology** 89:1216-1222 p.

LYVER, P., S. HAMILTON, M. MCKENZIE, I. DICKSON, M. DOOHER, T. BROAD, MOLLER, H. 1998. Construction and reliability of an infra-red camera for examining nests in burrows. **Conservation Advisory Science Notes** 209:1-21 p.

MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J. 2003. **Brock: Biology of Microorganisms**. Prentice Hall.

MADIGAN, et al. 2003. **Brock: Biología de los microorganismos**. (10<sup>a</sup> edición). Ed. Pearson-Prentice-Hall, Madrid. 66- 91 p.

MADIGAN, M. P. 2000. **Biology of Microorganisms**, 9th edition. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.

MAGLIANI, W., CONTI, S., GERLONI, M., BERTOLOTTI, D. POLONELLI, L. 1997. Yeast killer systems. **Clin Microbiol Rev** 10: 369-400 p.

MAGLIANI, W., CONTI, S., SALATI, A., ARSENI, S., RAVANETTI, L., FRAZZI, R. POLONELLI, L. 2004a. Engineered killer mimotopes: new synthetic peptides for antimicrobial therapy. **Curr Med Chem** 11: 1793-1800 p.

MAGLIANI, W., CONTI, S., SALATI, A., VACCARI, S., RAVANETTI, L., MAFFEI, D.L. POLONELLI, L. 2004. **Therapeutic potential of yeast killer toxin-like antibodies and mimotopes**. **FEMS Yeast Res** 5: 11-18 p.

MENDES, T. D. 2010. **Atividade antimicrobiana de actinobactérias isoladas de formigas Attini (Hymenoptera: Formicidae)**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) Instituto de Biociências, UNESP Rio Claro, 94 p.

MILLARD, W. A., TAYLOR, C. B. 1927. Antagonism of micro-organisms as the controlling factor in the inhibition of scab by green-manuring. **Ann. Appl. Biol.** 14, 202-216 p.

MUELLER, U.G.; REHNER, S.A.; SHULTZ, T.R. 1998. The evolution of agriculture in ants. **Science**, 281: 2034-2038 p.

NOBBE, F.; HILTNER, L. 1896. **Improvements relating to the inoculation of soil for the cultivation of leguminous plants.** British patent n. 11,460.

PIERSON, C.T., MCELROY, G.K., BLITVICH, J.D., SUBIC, A. BLANKSBY, B.A. 1998. A comparison of the swimming start using traditional and modified starting blocks. **Journal of Human Movement Studies**, 34, 49 – 66 p.

PEREIRA, J. O.; SOUZA, A. Q. L.; HANADA, R. E. 2007. Diversidade de Microrganismos Endofíticos de Plantas da Amazônia Brasileira. In: Coata-Maia, L; Malosso, E.; Yano-melo, A . M. (Org.), ed. Recife. (Org.). **Micologia: avanços no conhecimento.** 01 ed. Recife: Sociedade Brasileira de Micologia, v. 01, 141-148 p.

POPPE, K., GLINOER, D. TOURNATE, H. DEVEROEY, P. A. VAN STIERTEGHEM, L. K., VELKENIERS, B. 2003. Assisted reproduction and thyroid auto immunity: An unfortunate combination? **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 88: 4149-4152 p.

QUIROZ, L. J.V. 1996. Factores de mortalidad natural de reinas de *Atta mexicana* (Fr. Smith) en el Estado de Morelos, México. In: **Congreso Latinoamericano de Entomologia**, 6, Mérida, Yucatán, 1996. Memorias. Mérida: Sociedad Mexicana de Entomologia, 56 p.

RILEY, M. A. 1998. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. **Annual Review of Genetic**, 32: 255-278 p.

ROBIN E, TERRIS B, VALVERDE A, MOLAS G, BELGHITI J, BERNADES P, RUSZNIEWSKI P. 1997. Pancreatoblastoma in adults. **Gastroenterol Clin Biol**; 21:880-3 p.

RODRIGUEZ, J. S., ALEXOPOULOS, L.G. J. SAMAGA, E. R., LAUFFENBURGER, D. A., KLAMT, S., SORGER, P. K. 2009. **Molecular Systems Biology**, 5:331 p.

ROMEIRO, R. S.; GARCIA, F. A. O. 2003. O controle biológico de enfermidades de plantas incitadas por bactérias. **Revisão anual de patologia de plantas**, v.11, 195-228 p.

ROMEIRO, A. R. 2003. Economia ou economia política da sustentabilidade. In: MAY, P. H.; LUSTOSA, M. C.; VINHA, V. **Economia do meio ambiente.** Rio de Janeiro: Elsevier: 1-29 p.

ROMEIRO, R. da S.. 2005 **Bactérias fitopatogênicas.** 2.ed. Viçosa: UFV, 417p.

- ROMEIRO, R. da S. 2007a. **Controle biológico de doenças de plantas: fundamentos**. Viçosa: UFV, 269 p.
- ROMEIRO, R. da S. 2007b. **Controle biológico de doenças de plantas: procedimentos**. Viçosa: UFV, 172 p.
- RONIN, C.; FENOUILLET, E.; HOVSEPIAN, S.; FAYET, G.; FOURNET, B. 1986. Regulation of thyroglobulin glycosylation. A comparative study of the thyroglobulins from porcine thyroid glands and follicles in serum-free culture. **J Biol Chem** 261:7287– 7293 p.
- SALLES, J.F.; GITAHY, P.M.; SKOT, L.; BALDANI, J.I. 2000. Use of endophytic diazotrophic bacteria as a vector to express the cryA gene from *Bacillus thuringiensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, 31:155-161 p.
- SAMUELS, G.J. 2004. *Trichoderma ovalisporum*: A new endophytic species with potential to control frosty pod rot of cocoa; **Mycol. Prog.**
- SCHMIDT, C., VELLEMAN, M., ARBER, W. 1996. Three functions of bacteriophage P1 involved in cell lysis. **J Bacteriol** 178, 1099–1104 p.
- SCHNABEL, E. L., JONES, A. L. 2001. Isolation and characterization of five *Erwinia amylovora* bacteriophages and assessment of phage resistance in strains of *Erwinia amylovora*. **Appl Environ Microbiol** 67, 59–64 p.
- SCHROTH, M.N., BECKER, J.O. 1990. Concepts of ecological and physiological activities of rhizobacteria related to biologic control and plant growth promotion. In: HORNBY, D. (Ed.). **Biological control of soil-borne plant pathogens**. Wallingford: C.A.B. Internacional, 389-414 p.
- SEDIYAMA, C. S. 2010. Características agrônômicas de cultivares de mamona em função do local de cultivo e da época de semeadura no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v.40, n.3, Santa Maria. 501-506 p.
- SILVA, J. M. C; SOUZA, M. A.; BIEBER, A. G. D., CARLOS, C. J. 2003. Aves da Caatinga: status, uso do habitat e sensibilidade. In: Ecologia e Conservação da Caatinga. Organizado por Tabarelli, M.; Inara R. Leal & Silva, JMC. Recife: Editora Universitária.
- SILVA HHG, SILVA IG, SANTOS RMG, FILHO ER, ELIAS CN. 2004. Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 37: 396-399 p.

- SMIDT, M., VIDAVER, A.K. 1986. Population dynamics of *Clavibacter michiganense* subsp. *nebraskense* in field-grown dent corn and popcorn. *Plant Dis.* 70:1031-1036 p.
- SMITH, A. W. S., JACKSON, L. A. A. 1990. An Application of Coastal Management Tactics Gold Coast, Queensland, Australia. **Shore & Beach**, 58(3): 3-8 p.
- SIMMONDS, S., COID, J., JOSEPH, P. 2001. Community mental health team management in severe mental illness: a systematic review. **British Journal of Psychiatry**, 178, 497 -502 p.
- SOUZA, A.Q.L.; SOUZA, A.D.L.; ASTOLFI FILHO, S.; PINHEIRO, M.L.B.; SARQUIS, M.I.M.; PEREIRA, J.O. 2004. Atividade Antimicrobiana de Fungos Isolados de Plantas Tóxicas da Amazônia: *Palicourea Longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos Cogens* Bethan; **Acta Amazônica** 34(2): 185 -195 p.
- SOUZA, A.Q.L. 2006. Potencial Genético e Químico dos endófitos de *Murray paniculata* L. (Jack). **Tese de doutorado**, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil, 128 p.
- STANIER, R. Y., INGRAHAM, J. L., WHEELIS, M. L., PAINTER, P. R. 1986. **The Microbial World**. 5 ed., Prentice Hall, New Jersey. 689 p.
- STROBEL, G.; YANG, X.; SEARS, J.; KRAMER, R.; SIDHU, R.S.; HESS, W.M. 1996. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. **Microbiology** 142, 435 p.
- STROBEL, G.A. 2002. Microbial gifts from rain forests; **Can J Plant Pathol.** 24:14–20 p.
- STROBEL, G.; DAISY, B. 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products; **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 67: 491–502 p.
- SPARG, S.G., JAGER, A.K., VAN STADEN, J. 2000. Efficiency of traditionally used South African plants against *Bilharzia*. **Journal of Ethnopharmacology**. V.73. 209-214 p.
- SUTTON, J.C., PENG, G. 1993. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. **Phytopathology** 83, 615–621 p.
- SUTTON, J.C., LI, D.W., PENG, G., YU, H., ZHANG, P. 1997. *Gliocladium roseum*: a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. **Plant Disease** 81, 316–328 p.
- VIDAVER, A. K. 1983. Bacteriocins: the lure and the reality. **Plant Disease**, St. Paul, v. 67, n. 5, 471-475 p.

- WELLER, D.M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology** 26, 379–407 p.
- WRIGHT, S.F., UPADHYAYA, A., 1996. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Science** 161, 575–586 p.
- WHIPPS, J.M. 2001. Roots and their environment: microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v.52, 487-511p.
- WHIPPS, J.M.1990. **Carbon economy**. In: Lynch JM, ed. The rhizosphere. Chichester: Wiley, 59–97 p.
- WHIPPS, J.M., GREWAL, S.K., VAN DER GOES, P.1991. Interactions between *Coniothyrium minitans* and sclerotia. **Mycological Research** 95, 295–299 p.
- YI, Y. K., SON, J. S. 1993. Biological control effect of treating avirulent bacteriocin-producing strain of *Pseudomonas solanacearum* adapted to low temperature on tobacco bacterial wilt. **Journal of the Korean Society of Tobacco Science**, 15: 26-33 p.
- YIN, S . Y.; KENG, D. C.; YANG, K. Y.; CHEU, D. 1957. A further study on the biological control of verticillium wilt of cotton. **Acta Phytopathol. Sin.** 3:55-61 p.
- YIN, S . Y.; CHANG, J. K.; XUN, P. C. 1965. Studies in mechanisms of antagonistic fertilizer "5406." IV. The distribution of the antagonist in soil and its influence on the rhizosphere. **Acta Microbiol. Sin.** 11:259-288 p.
- ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. 2006. Biology and chemistry of endophytes. **Nat Prod Rep** 23, 753–771 p.
- ZINSER, E.R., KOLTER, R. 2004. Escherichia coli Evolution During Stationary Phase. **Res. Microbiol.** 155: 328-336 p.
- ZUCHI, J; BEVILAQUA, G. A. P.; ZANUNCIO, J. C.; PESKE, S. T.; SILVA, S. D. A.; SEDIYAMA, C. S. 2010. Características agronômicas de cultivares de mamona em função do local de cultivo e da época de semeadura no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v.40, n.3, 501-506 p.

#### **4- UM NOVO MÉTODO DE CONTROLE BIOLÓGICO PARA AS FORMIGAS CORTADEIRAS *Atta sexdens* A PARTIR DE LINHAGENS DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE PLANTAS DA AMAZÔNIA.**

##### **RESUMO**

As formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* são pragas agrícolas severas no Brasil. Distribuídas por todo o território nacional e com intensa atividade durante o ano, atacam várias culturas agrícolas, pastagens e, em particular, os reflorestamentos, atuando sobre muitas espécies vegetais. As colônias dessa tribo são dependentes dos fungos para sua alimentação e sua prole é criada em uma dieta exclusivamente a base de fungos. Por isso, essas formigas desenvolveram a capacidade de cultivar os fungos em câmaras subterrâneas, sobre substratos de cultivo que variam dependendo do gênero da formiga, podendo ser fragmentos de folhas e flores. Este trabalho teve como objetivo determinar uma nova proposta de controle para as formigas cortadeiras. Neste caso, o foco da pesquisa foi o uso de bactérias endofíticas de plantas medicinais da Amazônia para o combate do jardim de fungos simbiotes e conseqüentemente controlar as próprias formigas cortadeiras da espécie *Atta sexdens*. Para testar essa hipótese foram feitos ensaios com formigueiros completos montados em laboratório aos quais foram aplicados um “pool das bactérias endofíticas” previamente selecionadas e com potencial de inibição de microrganismos presentes nos ninhos de formigas. Os ensaios foram feitos utilizando-se diferentes estratégias: a) bactérias aplicadas em folhas de laranjeiras que eram entregues para a alimentação das formigas; b) foram oferecidas às formigas folhas de *Phyllanthus* sp, a planta hospedeira das bactérias endofíticas em estudo. Neste caso as folhas dessa planta foram tratadas com essência de folhas de laranjeiras para que houvesse aceitação por parte das formigas; c) aplicação do líquido metabólico do pool das bactérias em folhas de laranjeiras que eram entregues para a alimentação das formigas. Cada tratamento foi composto por 10 formigueiros completos, com todas as castas, montados em laboratório. Os ensaios foram avaliados diariamente, com medições do tamanho do fungo simbiote, e avaliação do comportamento das formigas cortadeiras (*A. sexdens*) durante 21 dias seguidos. Observou-se a mortalidade dos formigueiros e a mortalidade do jardim de fungos. Foram avaliados a TL<sub>50</sub> ou tempo letal mediano dos indivíduos e foi realizado o teste Tukey no nível de 95% de probabilidade. Por meio desses ensaios observou-se a mortalidade dos formigueiros tratados, principalmente com o pool das bactérias. O tratamento com o líquido metabólico das bactérias também

apresentou resultado positivo na mortalidade do fungo, mas em um tempo maior de exposição quando comparado com o *pool* das bactérias. O tratamento com folhas de *Phyllanthus* sp. com essência, também foi promissor, mas foi o mais lento de todos os tratamentos utilizados. Considerando-se todas as estratégias de estudo, uma provável explicação para o declínio do jardim de fungos simbiotes é o fato de as formigas interromperem o corte das folhas que serviam para a alimentação dos microrganismos associados ao ninho, reduzindo drasticamente o tamanho do jardim de fungos simbiotes e conseqüentemente levando a mortalidade do ninho. Tais ferramentas, para serem consideradas promissoras e para que se possa comprovar a ação direta das bactérias endofíticas no declínio do jardim de fungos, demandam novos ensaios. Prioritariamente será necessário comprovar a ocorrência de alguma forma de antagonismo microbiano in vivo.

#### 4. INTRODUÇÃO

Muitos aspectos da biologia dos insetos, incluindo o comportamento, a fisiologia e a ecologia, estão de uma ou outra maneira, inseridos dentro de um determinado contexto alimentar. Além da quantidade, a qualidade e a proporção de nutrientes presentes no alimento, a presença de compostos secundários ou não-nutricionais (aleloquímicos) causam impacto variável na biologia dos insetos, determinando a sua capacidade de contribuição reprodutiva para a geração seguinte (ALBUQUERQUE et al., 2001).

Os estudos relativos à bioecologia e à nutrição de insetos evoluíram nas últimas décadas, desde a definição das exigências nutricionais básicas para a sua sobrevivência e reprodução até a avaliação da sua influência no comportamento e na fisiologia dos insetos, com conseqüências ecológicas e evolucionárias. O estudo alimentar/nutricional foi chamado de ecologia nutricional de insetos e sua conceituação e desenvolvimento ocorreram nos últimos anos (SCRIBER; SLANSKY JUNIOR, 1981; SLANSKY JUNIOR, 1982; SLANSKY JUNIOR; SCRIBER, 1985; SLANSKY JUNIOR, RODRIGUEZ, 1987).

O alimento natural, isto é, aquele obtido na natureza, se apresenta nas mais diversas formas e possui qualidade nutricional variável. Desde que os insetos apareceram na terra, iniciou-se um processo de evolução adaptativa, com o aparecimento dos diferentes estilos de vida dos mais aptos, para explorar o alimento natural nas suas mais diversas formas. Se, por um lado, os insetos se adaptam para explorar as fontes nutricionais, por exemplo, organismos vegetais e animais, estes, por sua vez, mudam para evitarem serem consumidos, num processo coevolutivo contínuo. O fato de os insetos terem capacidade lendária de explorar os mais variados habitats em busca do alimento confere a eles sucesso adaptativo, que os tornam em únicos seres vivos que desafiam o homem na sua hegemonia total (BOURTZIS e MILLER, 2007).

Além da qualidade variável, o alimento natural apresenta sazonalidade, o que o torna ainda mais desafiante. O ambiente abiótico, incluindo a temperatura, a umidade e o fotoperíodo, faz com que o alimento natural não esteja disponível de forma permanente, o que força os insetos a se adaptarem para suportar os períodos de desfavorabilidade; essas adaptações variam desde trocas fisiológicas drásticas, como no caso dos insetos que entram em diapausa, até trocas fisiológicas menos drásticas, ou seja, os insetos entram em oligopausa ou quiescência. Em ambos os casos, ocorrem acúmulo de energia estocada na forma de lipídios, o que garante a sua sobrevivência. Outra estratégia é a migração em busca de

habitats mais favoráveis, o que também demanda energia estocada para suportar os vôos prolongados (COHEN, 2004).

O alimento natural apresenta variação na sua qualidade, e não raro, ocorre à presença de aleloquímicos ou produtos do metabolismo secundário, que podem ser tóxicos. A defesa física (por exemplo, a presença de pilosidade, espinho, textura grossa de tecidos, etc.) torna também o alimento natural, muitas vezes, inacessível ou indigerível. Assim, precisa-se sempre ter em mente que o alimento natural apresenta muitos desafios e que mesmo insetos monófagos, isto é, especializados em explorar uma única fonte nutricional, se deparam com problemas no momento de explorá-lo. Portanto, quando se estuda a biologia dos insetos em laboratório, a busca de dietas artificiais é muito importante, pois estas permitem que os insetos se desenvolvam sem que haja necessidade de suplantar os problemas apresentados pelo alimento natural (COUDRON et al., 2006).

## **4.1 REVISÃO BIBLIOGRAFICA**

### **4.1.1 Formigas – subfamília Myrmicinae – Tribo Attini**

Há 50-60 milhões de anos, as formigas cortadeiras da tribo Attini, encontrada na região Neártica e, principalmente, Neotropical, adquiriram a habilidade de cultivar fungos (BASS; CHERRETT, 1994).

Essa associação está presente desde o início da colônia quando as futuras rainhas partem da colônia-mãe e levam consigo em uma bolsa infrabucal um *pellet* do inoculo fúngico, que servirá de núcleo para um novo jardim (MULLER et al., 1998, 2001). Apesar de esse comportamento permitir uma propagação vertical e vegetativa do fungo, estudos genéticos não encontraram uma correlação estreita entre as espécies de formigas e seus respectivos fungos. Isso se deve ao fato de as formigas, ocasionalmente, substituírem seu fungo domesticado por fungos de vida livre e por outros fungos de outras colônias (MULLER et al., 1998; GREEN et al., 2002).

As colônias dessa tribo são dependentes dos fungos para sua alimentação e a prole é criada em uma dieta exclusivamente fúngica. Por isso, essas formigas desenvolveram a capacidade de cultivar os fungos em câmaras subterrâneas, sobre substratos de cultivo que variam dependendo do gênero da formiga, podendo ser fragmentos de folhas e flores. Os

gêneros *Atta* e *Acromyrmex* usam exclusivamente folhas e flores cortadas e transportadas para o ninho. Estudos recentes ampliaram consideravelmente a compreensão da evolução da simbiose entre as formigas Attini e seus fungos (CHAPELA et al., 1994; MULLER et al., 1998, 2001; CURRIE et al., 1999; GREEN et al., 2002).

Para proteger seus jardins de fungos parasitas do gênero *Escovopsis*, que causam redução da produtividade e crescimento do fungo simbiote, as formigas Attini usam antibióticos derivados de bactérias mantidas em regiões especializadas dos próprios corpos (CURRIE et al., 1999; CURRIE, 2001; POULSEN et al., 2003). Essas bactérias benéficas para as formigas pertencem ao gênero *Streptomyces*, um gênero de bactérias de solo que foi usado pela indústria farmacêutica para a descoberta de antibióticos modernos. Além disso, as operarias realizam a remoção mecânica de contaminantes e isolam áreas dos jardins que se apresentam contaminadas com outros fungos (BASS; CHERRETT, 1994).

#### **4.1.2 Controle alternativo de pragas**

A implantação de agroecossistemas leva sempre à alteração nos ambientes nativos ou originais, tais como um campo, uma mata ou uma floresta. Um dos problemas mais sérios da agricultura consiste na manutenção destes novos sistemas dado a sua simplicidade e fragilidade em relação a agentes físicos e biológicos. Dentre os problemas biológicos, o desequilíbrio de populações torna-se um aspecto importante quando tratado em nível de pragas e doenças (FERNANDES, 1987).

Ao tempo em que a agricultura era praticada em pequena escala, a importância das pragas e doenças era mais reduzida. Com o passar do tempo, o homem foi avançando as fronteiras agrícolas, invadindo o habitat de pragas em potencial. Essa invasão destruiu espécies vegetais que serviam de alimento ou abrigo tanto para as espécies que se tornariam pragas quanto para os seus competidores, responsáveis pelo controle e equilíbrio dos níveis populacionais. Assim, importantes pragas hoje existentes, foram muitas vezes manifestadas pela utilização inadequada de áreas em equilíbrio ecológico (GUERRA, 1985).

As primeiras medidas de controle surgidas foram simples. Baseavam-se na observação dos agricultores e no uso dos meios disponíveis na propriedade ou em casa, apesar de nem sempre redundarem em sucesso. Posteriormente, muitas destas medidas foram testadas de um modo empírico e transferidas como sugestões aos agricultores por estudiosos

do assunto. As sugestões foram fornecidas por cartas e mesmo em revistas e livros (MARANHÃO, 1986).

Com o advento dos agrotóxicos modernos (inseticidas, fungicidas, bactericidas etc.) iniciado na década de quarenta com a dedetização pareciam estar superados muitos problemas. A partir de 1940, 1945 foram introduzidos no Brasil os inseticidas organo-sintéticos, produtos esses que tiveram larga aceitação tanto no meio rural e urbano. Porém, ao lado dos benefícios que propiciaram, acarretaram uma série de efeitos paralelos e indesejáveis de modo que, hoje, seu uso é ponderável na sociedade, que questiona sempre tais produtos sintéticos. Os efeitos mencionados estenderam-se ao homem e ao ambiente de modo geral (REGO, 1943).

A literatura médica relaciona os agrotóxicos com problemas de esterilidade masculina, câncer, perturbações gástricas, lesões hepáticas, mutações, dentre outras (GUERRA, 1985).

Os procedimentos atuais de controle de pragas nas lavouras deixam muito a desejar (FERNANDES, 1987). Em primeiro lugar, a agricultura é exposta aos riscos climáticos e o custo adicional de praguicidas aliado à falta de estruturas e canais eficientes de comercialização, praticamente inviabilizam a execução frutuosa desse tipo de controle (FERNANDES, 1987).

Como decorrência dos aspectos apontados nos parágrafos anteriores, observa-se atualmente, como anseio social a necessidade de repensar e retornar práticas simples, que antes davam resultados favoráveis, em relação ao controle de pragas e doenças (MARANHÃO, 1986).

#### **4.1.3 O controle Biológico**

Estima-se que sejam conhecidas um milhão de espécies de insetos, de um total de mais de 2,5 milhões que, provavelmente, ocorrem sobre a Terra. Desse total, cerca de 10% podem ser consideradas pragas na agricultura ou pragas urbanas (ALVES, et al., 1998). Assim, se cada espécie de inseto for atacada por no mínimo um patógeno, pode-se inferir que a patologia de insetos e o controle microbiano terão no futuro, importância relevante no controle dos insetos-pragas e na cura de doenças dos insetos úteis.

A patologia de insetos é a ciência que estuda as doenças dos insetos, abrangendo a etiologia, a sintomatologia e a epizootiologia, visando utilizá-las para o controle de pragas ou com o objetivo de evitá-las quando ocorrem em populações de insetos úteis.

A doença pode ser entendida como uma entidade abstrata e não deve ser confundida com o inseto doente nem com o patógeno. Doença, segundo GAUMANN (1950), é um processo dinâmico no qual o hospedeiro e patógeno, em íntima relação com o meio, se influenciam mutuamente, resultando modificações morfológicas e fisiológicas.

A patologia de insetos é um ramo da patologia de invertebrados que vem se desenvolvendo como ciência interligada a um grande número de áreas. Assim, não existe isoladamente e fornece e/ou recebe subsídios de outras áreas do conhecimento, como: microbiologia, que fornece elementos básicos para a etiologia (agentes causais), taxonomia e diagnose; morfologia, anatomia e fisiologia, que dão subsídios para o estudo da sintomatologia e histopatologia; agrometeorologia, biologia, ecologia e fitotecnia, que fornecem elementos importantes ao estudo da epizootiologia; além da bioquímica, química, física, bioestatística, zootecnia, medicina (vacinas e vetores) e genética, que estão diretamente relacionadas ao controle microbiano (ALVES, et al., 1998).

O controle microbiano é a principal meta da patologia de insetos e representa um ramo do controle biológico de insetos. Este, por sua vez, trata da utilização racional dos patógenos visando à manutenção da população de pragas a níveis não-econômicos.

Atualmente, é grande o avanço científico da patologia de insetos, com a repercussão direta no campo do controle microbiano. Muitos patógenos vêm sendo relatados sobre insetos à medida que cresce o número de pesquisadores nesse campo. Já existe no mercado brasileiro e internacional um grande número de produtos à base de patógenos, visando o controle de insetos-pragas e vetores.

Apesar do avanço incontestável da patologia de insetos e do controle microbiano verificado nos últimos vinte anos, é importante mencionar que os microrganismos entomopatogênicos não devem ser considerados os únicos agentes de controle de insetos. Esse tipo de controle deverá fazer parte de um conjunto de medidas que, atuando em harmonia com o ambiente, seja capaz de reduzir a população dos insetos pragas a níveis não-econômicos (ALVES, et al., 1998).

#### **4.1.4 Bactérias endofíticas**

Como se sabe, cada vez mais, novas funções e atividades vem sendo atribuídas aos microrganismos endofíticos, conseqüentemente, vão surgindo novas possibilidades para o uso desses microrganismos em processos biotecnológicos. Fungos e bactérias endofíticos estão sendo utilizados no controle biológico como vetores para introdução de genes em plantas e como produtores de fármacos e outras muitas aplicações (HALLMANN et al., 1997;

M'PIGA et al., 1997; AZEVEDO et al. 2000; SALLES et al. 2000; BILLS et al. 2002; STROBEL 2002; STROBEL e DAISY 2003; SAMUELS 2004; SOUZA et al. 2004; ZHANZ et al. 2006; HANADA et al. 2009).

As bactérias endofíticas, da mesma forma que fitopatógenos, apresentam a capacidade de penetrar na planta e se disseminar de forma sistêmica no hospedeiro, habitando de forma ativa o apoplasto (MAHAFFEE et al., 1997; QUADT-HALLMANN et al., 1997b), vasos condutores (MAHAFFEE et al., 1997; HALLMANN et al., 1997) e, ocasionalmente, pode haver colonização intracelular (QUADT-HALLMANN e KLOEPPER, 1996; QUADT-HALLMANN et al., 1997).

Bactérias endofíticas colonizam um nicho ecológico semelhante aquele ocupado por fitopatógenos, favorecendo-as como agentes de controle biológico de doenças (HALLMANN et al., 1997; KUNOH, 2002; COOMBS et al., 2004). Este controle biológico pode ocorrer principalmente devido à atuação direta sobre o patógeno no interior da planta hospedeira (PAN et al., 1997), por produção de compostos antimicrobianos (PLEBAN et al., 1997; MARCON, 2002; KUNOH, 2002; TAECHOWISAN et al., 2003), indução de resistência sistêmica (KRISHNAMURTHY e GNANAMANICKAM, 1997; LODEWYCKX et al., 2002), competição por nutrientes (MARI et al., 1996) ou produzindo enzimas (quitinases ou celulases) que degradam a parede celular de fungos patogênicos (PLEBAN et al., 1997; DOWNING e THOMSON, 2000; EL-TARABILY, 2003).

O controle biológico de doenças e pragas de culturas de interesse, utilizando bactérias endofíticas, pode ser realizado de forma indireta. Neste caso, o endófito não atua diretamente sobre o patógeno, mas induz uma resposta na planta, ativando a resistência ao patógeno. O principal componente bacteriano sugerido como indutor deste processo é um lipopolissacarídeo (LPS), presente na parede celular de bactérias Gram-negativa. Além do LPS, outras moléculas como sideróforos e ácido salicílico produzidas por bactérias são também consideradas candidatas (VAN LOON et al., 1998). Em plantas de tabaco foi demonstrado que LPS da bactéria endofítica *Burkholderia cepacia* estimulou resposta sistêmica ao ataque do patógeno *Phytophthora nicotianae* (ARAÚJO et al., 2001).

Estudos têm demonstrado que a aplicação de rizobactérias (as quais também colonizam endofiticamente o hospedeiro) em sementes ou na raiz pode induzir resistência a múltiplos patógenos dos tecidos foliares como vírus, fungos e bactérias (KLOEPPER et al., 1999). Em outro caso, foram utilizadas rizobactérias, em combinação ou em aplicações simples de cada bactéria, e verificou-se que estas bactérias, além de promover o crescimento vegetal, induziram a resistência sistêmica do hospedeiro às bactérias *Pseudomonas syringae*

pv. *Lachrymans*, *Erwinia tracheiphila* e ao fungo *Colletotrichum orbiculare* (RAUPACH e KLOEPPER, 1998). Em tomate, a aplicação da rizobactéria promotora de crescimento *Pseudomonas* sp. (linhagem PsJN) induziu resistência sistêmica a *Verticilium dahliae*. Os resultados deste estudo mostraram que a colonização endofítica da planta pela rizobactéria foi necessária para a indução de resposta contra o patógeno (SHARMA e NOWAK, 1998).

Os fatores que levam à indução de resistência sistêmica contra patógenos ainda não estão bem estabelecidos. Sabe-se que ela está associada a alterações bioquímicas e estruturais na planta hospedeira, as quais afetam adversamente o crescimento e desenvolvimento do patógeno (DUIJFF et al., 1997; M'PIGA et al., 1997; SHARMA e NOWAK, 1998). A penetração ativa de *Pseudomonas* sp. (linhagem PsJN), com hidrólise de celulose sugere que alguns endófitos podem causar reação de hipersensibilidade, ativando a resistência sistêmica contra patógenos (QUADT-HALMANN et al., 1997a). Tem sido observado que esta resistência induzida em tomate está relacionada à colonização dos tecidos internos do hospedeiro e à presença de um lipopolissacarídeo da membrana externa (Cadeia O-antigênica) da bactéria endofítica (DUIJFF et al., 1997).

A comunidade endofítica é muito dinâmica, havendo interações entre as espécies bacterianas e entre estas com hospedeiro. ARAÚJO et al., (2001) isolaram inúmeras bactérias endofíticas de porta-enxertos de citros, entre elas *Alcaligenes* sp., *Bacillus megaterium*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. cepacia* e *P. agglomerans*. Foram realizados testes *in vitro* de interação entre tais bactérias e *Guignardia citricarpa*, a qual pode influenciar a composição da população endofítica nas folhas deste hospedeiro. Neste estudo foi verificado que o fungo *G. citricarpa*, isolado endofiticamente de folhas, inibiu inúmeras bactérias do gênero *Bacillus*, e estimulou o crescimento de *Erwinia herbicola* (sin. *P. agglomerans*) (ARAÚJO et al., 2001; AZEVEDO et al., 2000). De acordo com os autores, este resultado aliado aos estudos com marcadores moleculares do tipo RAPD, mostrou que *E. herbicola* deve ser um endófito plenamente adaptado ao hospedeiro e a outros endófitos como *G. citricarpa*, enquanto que *B. pumilus* e *B. subtilis* devem ser bactérias que eventualmente, na ausência de competição com *G. Citricarpa* colonizam a planta endofiticamente.

A utilização prática destas bactérias endofíticas no controle biológico de patógenos depende de inúmeros fatores relacionados à interação patógenos – bactérias endofíticas – planta, pois a competição existente entre os microrganismos neste habitat pode reduzir a eficiência do controle, inviabilizando a sua utilização. Segundo RAUPACH e KLOEPPER (1998), na maioria dos casos, o controle biológico que ocorre naturalmente é devido a uma

mistura de microrganismos antagônicos sendo, portanto, muito importante avaliar a interação de diferentes bactérias para o controle de patógenos.

#### **4.1.5 A planta quebra-pedra: *Phyllanthus* sp.**

A família Euphorbiaceae a quem pertence o quebra-pedra, possui cerca de 317 gêneros e 8.000 espécies agrupadas em 49 tribos e 5 subfamílias (WEBSTER, 1994). As Euphorbiaceae são predominantemente tropicais e subtropicais e constitui uma das maiores famílias dentre as dicotiledôneas. O gênero *Phyllanthus*, com cerca de 750 espécies, é o maior e o mais diversificado gênero desta família.

O nome *Phyllanthus* vem do grego *Phyllon* (folha) e *anthos* (flor), em referência às flores produzidas em ramos que se assemelham às folhas compostas. A maior parte do gênero é de origem paleotropical, com cerca de 200 espécies distribuídas pelas Américas, principalmente no Brasil. Cerca de onze espécies atingem latitudes temperadas, mas não são encontradas na Europa e na costa pacífica do continente americano (WEBSTER, 1994). No Brasil, as espécies mais conhecidas e chamadas popularmente de quebra-pedra, arrebenta-pedra ou erva-pombinha são as *Phyllanthus ninuri* L., *Phyllanthus amarus* Schum & Thonn e *Phyllanthus tenellus* Roxb. Müll. Arg., reconhecidas popularmente por suas propriedades diuréticas, antiinflamatórias, analgésicas, antimicrobiana, antitumoral; são utilizadas na forma de infusão das folhas, caules e raízes. Existem relatos científicos descrevendo em várias espécies do gênero atividade anti-viral, com possíveis aplicações no tratamento de Hepatite B e câncer (LORENZI e MATOS, 2002).

Botanicamente o gênero *Phyllanthus* é constituído de ervas, arbustos ou árvores monóicos ou mais raramente, dióicos. Folhas simples, inteiras, alternas, estipuladas. Às vezes presentes apenas nas plantas jovens, então os ramos modificados em cladódios; pecíolos menores que as lâminas. Inflorescências cimosas, axilares, paucifloras, às vezes reduzidas a uma única flor; flores estaminadas monoclamídeas, sépalas 4-6; disco nectarífero usualmente segmentado; estames (2)-3-5(-15); filetes livres ou unidos; anteras livres ou unidas, rimosas, rimas horizontais a verticais; grãos de pólen prolatos a esféricos, colporados a porados; flores pistiladas monoclamídeas, sépalas 4-6; disco nectarífero inteiro, frequentemente pateliforme a cupuliforme, raramente segmentado; ovário 3-locular; óvulos 2 por lóculo; estiletos 3, livres ou unidos na base, geralmente divididos. Fruto capsula septicida, separando-se na maturidade

em mericarpos, raramente baga ou drupa; sementes geralmente 2 por lóculo, angulosas, triangulares em seção transversal (TORRES et al., 2003).

O gênero *Phyllanthus* se trata de um gênero bastante complexo, cuja identificação das espécies é por vezes difícil e confusa. Como se trata de uma planta com fins medicinais quaisquer equívocos na identificação poderão comprometer seriamente os resultados de trabalhos e também por ser frequentemente coletadas e utilizadas pela população leiga, é importante reconhecer caracteres que permitam distinguir as espécies.

Frequentemente há dificuldades na identificação das espécies, assim cabe ressaltar, que *Phyllanthus amarus* e o *Phyllanthus ninuri*, são espécies constantemente confundidas.

A *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn., consiste de uma erva, 30-40 cm de altura, glabra, com ramificação filantóide, ramos cilíndricos a levemente achatados, não modificados em cladódios. Estípulas oval-lanceoladas a lanceoladas, acuminadas, 2 mm comprimento. Folhas subsésseis, membranáceas, oblongas, 8-10x3-4 mm, ápice arredondado, base obtusa, margem inteira, pecíolo com 1 mm de comprimento. Flores em címulas bissexuais, com uma flor pistilada e uma flor estaminada; brácteas lanceoladas, acuminadas; flores estaminadas cerca de 2 mm comprimento, pecíolo cerca de 1 mm comprimento, sépalas 5, obovadas a elípticas, acuminadas, obtusas, inteiras, translúcidas nas margens, esverdeadas; disco com 5 glandulas pateliformes; estames 2, raramente 3, filetes totalmente unidos, tecas convergentes, rimas horizontais a oblíquas; flores pistiladas cerca de 2 mm comprimento; pedicelo 1,5 mm comprimento, chegando a 2 mm no fruto; sépalas 5, oboval-oblongas, apiculadas a agudas, côncavas, inteiras, translúcidas nas margens, esverdeadas. Disco anula com 5 apículos; ovário globoso, verde; estiletos levemente 2 partidos, patentes. Fruto capsula 3 mm comprimento. Sementes 1 mm comprimento, castanho claras, estriadas. A *Phyllanthus amarus* não é facilmente distinguível das outras espécies, porém as inflorescências bissexuais com duas flores e os estamens completamente unidos identificam a espécie (TORRES et al., 2003).

A espécie *Phyllanthus ninuri* é uma erva com aproximadamente 30 cm altura, glabra, com ramificação filantóide, ramos cilíndricos a levemente achatados não modificados em cladódios. Estípulas linear-lanceoladas, 2-3 mm comprimento, longamente acuminadas. Folhas membranáceas, subsésseis, oblongas a elípticas, 8-13 x 3-4 mm, ápice arredondado, base cordada assimétrica, margem inteira; pecíolo 0,5-1 mm comprimento. Flores em címulas unissexuais, as estaminadas proximais com 3-7 flores, as pistiladas distais com uma única flor; brácteas linear-lanceoladas cerca de 1-1,8 mm comprimento; flores estaminadas 2 mm

comprimento., pedicelo 1 mm comprimento, sépalas 5, largamente obovais, côncavas, inteiras, verde-claras; disco com 5 glândulas cuneadas, papilosas; estames 3, filetes livres a totalmente unidos; teças convergentes, rimas horizontais a oblíquas; flores pistiladas cerca de 2,5 mm comprimento, pedicelo 3-4 mm comprimento, sépalas 5, largamente obovais a elípticas, inteiras, verde-claras, disco anular, ovário globoso, verde; estiletes livres, 2-partidos, eretos, capitados. Fruto capsula, 2 mm comprimento. Sementes 1,5 mm comprimento, castanho escuras, verruculosas. A *P. ninuri* é espécie ruderal, encontrada florida e com frutos durante todo o ano (MAGALHÃES, 1997).

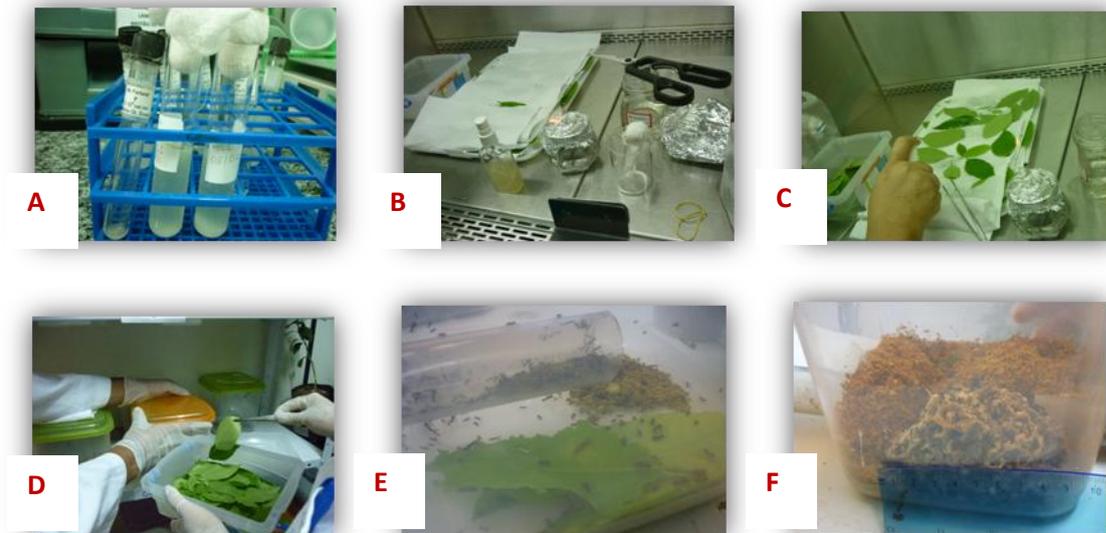
O *P. ninuri* diferencia-se pelas folhas assimétricas, inflorescências unissexuais e estiletes capitados e *P. amarus* por possuir folhas simétricas, inflorescências bissexuais e estiletes agudos.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Atividade Antagonista *in vivo* para o controle das formigas cortadeiras (*Atta sexdens*)

Após comprovar em laboratório as atividades antagonistas de algumas bactérias endofíticas isoladas de *Phyllanthus* sp. contra microrganismos simbioss de formigas cortadeiras, foram montados ensaios biológicos *in vivo*, figura 11. O primeiro constou de um ensaio, com 10 formigueiros completos montados em laboratório no qual foi aplicado um “pool das bactérias” previamente selecionadas como antagonistas. As bactérias foram aplicadas em folhas de laranja que eram entregues para a alimentação das formigas. Como controle, outros 05 formigueiros serviram como tratamento controle, nos quais as folhas de laranja foram pulverizadas com água destilada. Em um segundo ensaio, 40 formigueiros montados em laboratório, figura 12, que receberam outros tratamentos: a) folhas de laranjeiras pulverizadas com um “pool” das bactérias antagonistas foram disponibilizadas às formigas; b) folhas de *Phyllanthus* sp. (planta hospedeira das bactérias endofíticas em estudo) tratadas com essência de folhas de laranjeiras foram disponibilizadas às formigas; c) folhas de laranjeiras tratadas com o líquido metabólico do pool de bactérias foram disponibilizadas às formigas; d) controle onde as folhas disponibilizadas às formigas recebiam somente água destilada. Cada tratamento constando de 10 formigueiros completos com todas as castas Os experimentos foram avaliados diariamente, com medições do tamanho do fungo simbiote e

avaliação do comportamento das formigas cortadeiras (*Atta sexdens*) durante 21 dias seguidos. Foi avaliada: a mortalidade dos formigueiros por meio da mortalidade do jardim de fungo, no qual foi realizado o teste Tukey no nível de 5% de significância e a  $TL_{50}$  ou tempo letal mediano dos indivíduos.



**Figura 11** – Teste *in vivo* de mortalidade das formigas cortadeiras. A – “*pool*” das bactérias endofíticas de plantas da Amazônia; B – materiais utilizados na aplicação do “*pool*” das bactérias; C – aplicação do “*pool*” das bactérias em folhas de laranja; D – colocação das folhas com o “*pool*” das bactérias utilizadas como alimento para as formigas cortadeiras; E – Formigas *A. sexdens* cortando as folhas contaminadas; F – medidas diárias realizadas para verificação da redução do tamanho do fungo. Fonte: Gonzaga, 2011.



**Figura 12** – Ninhos de *A. sexdens* montados em laboratório para o teste de mortalidade *in vivo*. Fonte Gonzaga, 2011.

As formigas cortadeiras estudadas no decorrer dos experimentos foram identificadas em nível de espécie e depositadas no Laboratório de Ecologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, campus II - V8.

Foram avaliados também a ação de corte das folhas pelas formigas e o seu comportamento nos formigueiros submetidos aos diferentes tratamentos. Para a ação de corte determinaram-se dois parâmetros seguidos por números (1) Ação de cortar a folha e alimentar o jardim de fungo e (2) Inexistência da ação de corte de folhas e conseqüente não alimentação do jardim de fungos figura 13 e 14.



**Figura 13** – Jardim de Fungos simbiotes das formigas cortadeiras *Atta sexdens*. Fonte: Gonzaga, 2009.



**Figura 14** – Estrutura de um ninho montado em laboratório. A – “panela” do lixo; B – “panela” do fungo; C – “panela” da alimentação. Fonte: Gonzaga, 2009.

Para o comportamento das formigas também foram estabelecidos dois parâmetros: (1) Quando as formigas nidificavam normalmente e (2) Quando não nidificavam e ocorria a mortalidade das formigas.

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

As bactérias que apresentaram resultados positivos nos testes *in vitro* com os fungos associados às formigas cortadeiras (*Atta sexdens*) foram identificadas como (*Pseudomonas putida*; *Bacillus amyloliquefaciens* e *Serratia grimesii*).

No mês de fevereiro de 2011 foram realizados os primeiros ensaios *in vivo* com as mesmas bactérias que haviam sido isoladas da planta medicinal quebra-pedra (*Phyllanthus* sp.).

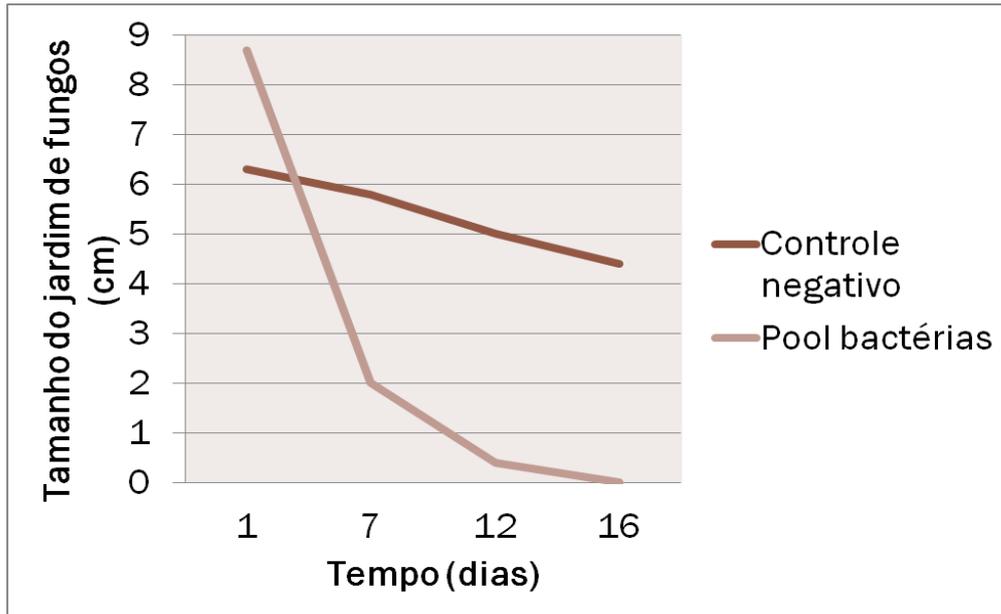
Na (Tabela 10) encontram-se os dados de mortalidade do fungo das formigas saúvas ou cortadeiras *Atta sexdens*. Observa-se que todos os tratamentos diferiram desde o primeiro dia até o décimo sexto dia de observação, figura 15. No primeiro dia, em ambos os tratamentos a área do jardim de fungos era relativamente grande e a partir do sétimo dia essa área foi reduzida tanto no tratamento 1 (controle ) como no tratamento 2, sendo que neste (tratamento com o “*Pool*” das bactérias) ocorreu mortalidade e maior redução da área do fungo, com diferença significativa de 5% entre os tratamentos. A partir do décimo segundo dia intensificou-se a mortalidade do jardim de fungos nos formigueiros que receberam o “*Pool*” das bactérias. O jardim de fungos foi extinto no décimo sexto dia no tratamento 2.

**Tabela 9** - Médias da taxa de mortalidade do jardim de fungo das formigas saúvas *Atta sexdens*.

Taxa de Mortalidade				
Tratamentos	Dia 1	Dia 7	Dia 12	Dia 16
T1	6.3 a	5.8 a	5.0 a	4.4 a
T2	8.7 b	2.0 b	0.4 b	0.0 b

Teste Tukey a nível de 5% de significância.

**Legenda:** T1 - tratamento somente com água destilada; T2 - tratamento com um “*pool*” de bactérias endofíticas antagonistas.



**Figura 15** – Taxa de mortalidade do jardim de fungos no primeiro ensaio *in vivo*.

A redução da área do fungo tanto no tratamento controle com água destilada como no tratamento com as bactérias antagonistas pode ser explicado pelo fato de as formigas terem diminuído, em ambos os tratamentos, sua atividade de alimentação do fungo simbiote. Por outro lado, observou-se maior intensidade da mortalidade no tratamento com as bactérias antagonistas partir do sétimo dia. Aparentemente as antagonistas agiram na área do fungo levando-os à mortalidade.

O ato de cortar as folhas pelas formigas pode ser analisado nos dados expostos na Tabela 11. Ao analisar esses dados observa-se que não houve diferença estatística significativa de corte das folhas no primeiro dia, mas a partir do sétimo dia o corte no tratamento T2 começa a se diferenciar, pois as formigas param de cortar as folhas, ficando assim até o décimo sexto dia de observação. Esses resultados estão de acordo com os dados da Tabela 12 onde são apresentadas as medidas das áreas foliares cortadas. As áreas foliares cortadas reduzem em ambos os tratamentos em todos os dias de observação, mas com maior intensidade no tratamento 2 onde as folhas receberam as bactérias endofíticas antagonistas. A partir décimo segundo dia a área de folhas cortada, no tratamento experimental é praticamente zero.

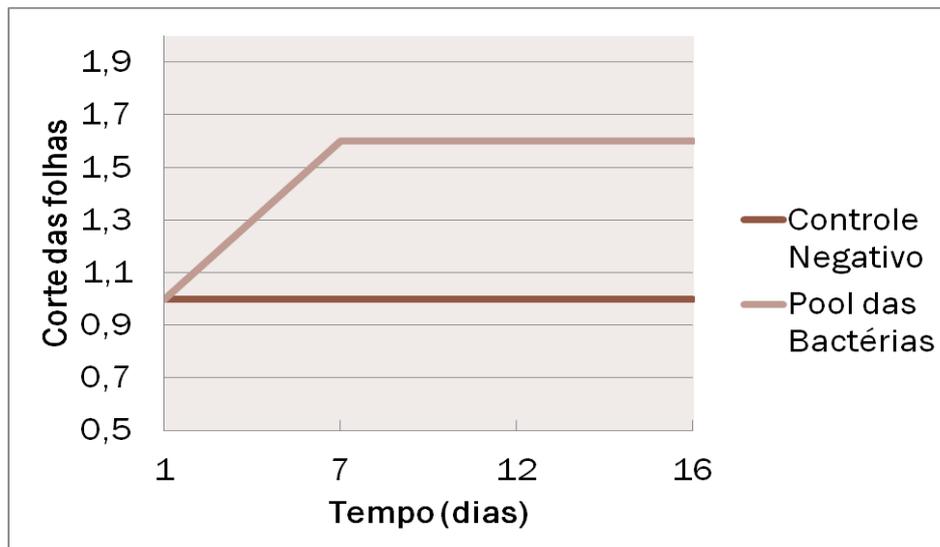
HERTZ et al., (2008) ofereceram folhas de três vegetais submergidas previamente em fungicida, de modo que as operarias de *Acromyrmex lundii* não percebam a presença do fungicida. O comportamento de rejeição às folhas ocorreu 10 horas após o forrageamento. Esses autores concluíram que as cortadeiras são capazes de não apenas distinguir a qualidade das folhas no local do corte, mas também de associar características particulares com reações específicas de seu fungo simbionte após o contato deste com o substrato. Essas reações específicas são, na verdade, reações de rejeição, aprendidas pelas forrageadoras e mediadas pelo fungo. Os valores próximos a um significa que as formigas cortaram as folhas, os próximos a dois significa que elas pararam de cortar figura 16.

**Tabela 10** – Valores médios da atividade de corte por *Atta sexdens* em folhas de laranja (*C. sinensis*) pulverizadas com o “Pool” das bactérias endofíticas de quebra-pedra (*Phyllanthus* sp.).

<b>Corte das Folhas</b>				
<b>Tratamentos</b>	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 7</b>	<b>Dia 12</b>	<b>Dia 16</b>
<b>T1</b>	1.0 a	1.0 a	1.0 a	1.0 a
<b>T2</b>	1.0 a	1.6 b	1.6 b	1.6 b

Teste Tukey a nível de 5% de significância.

**Legenda:** T1 - tratamento somente com água destilada; T2 - tratamento com um “pool” de bactérias endofíticas antagonistas.



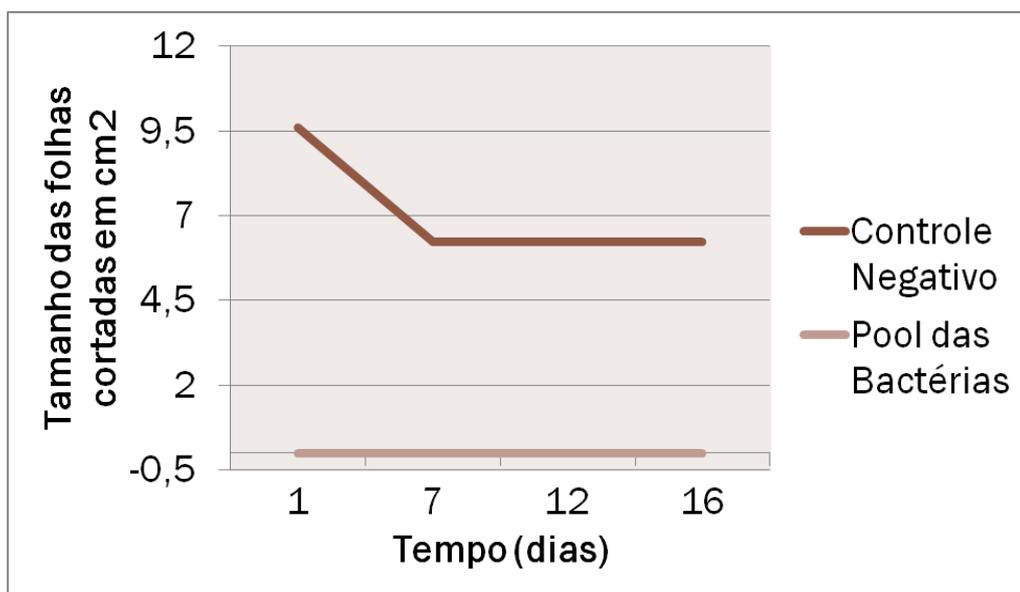
**Figura 16** – Corte das folhas pelas formigas no primeiro ensaio *in vivo*.

**Tabela 11** - Médias das áreas das folhas de laranja cortadas (*C. sinensis*) pelas formigas cortadeiras *Atta sexdens*.

Tamanho das Folhas cortadas em cm <sup>2</sup>				
Tratamentos	Dia 1	Dia 7	Dia 12	Dia 16
<b>T1</b>	9.60 a	6.22 a	6.22 a	6.22 a
<b>T2</b>	4.88 b	3.24 a	0.60 b	0.00 b

Teste Tukey a nível de 5% de significância.

**Legenda:** T1 - tratamento somente com água destilada; T2 - tratamento com um “pool” de bactérias endofíticas antagonistas.



**Figura 17** – Comparação do tamanho das folhas cortadas no primeiro ensaio *in vivo*.

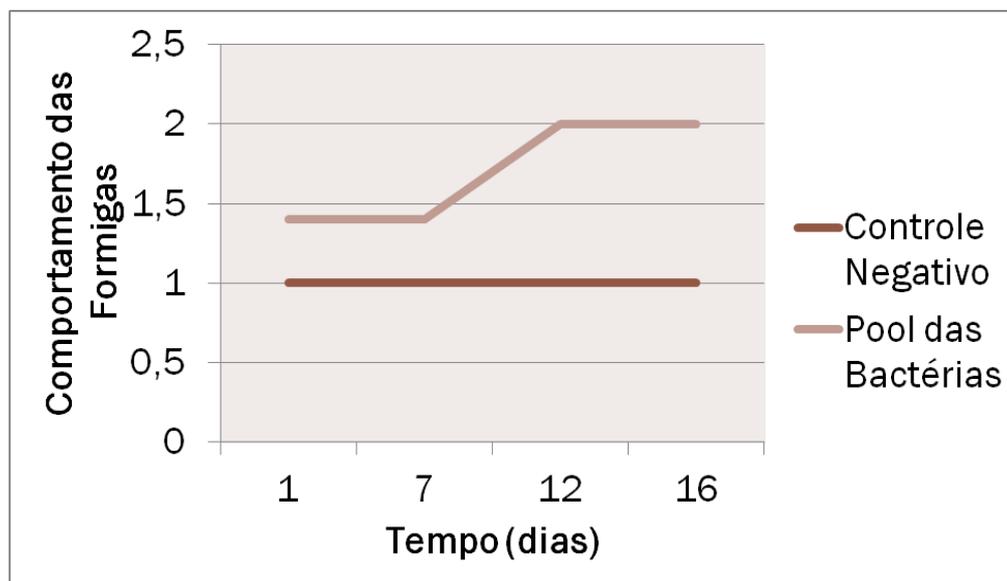
O comportamento das formigas cortadeiras *Atta sexdens* (Tabela 13, figura 18), diferiu entre os tratamentos depois do sétimo dia. Enquanto demonstravam comportamento calmo no tratamento controle, no experimental mostravam-se agitadas. Este pode ser explicado devido à mortalidade do fungo, em decorrência da parada do corte das folhas e alimentação desses simbiontes. Sem crescimento e renovação do jardim de fungos observou-se a conseqüentemente mortalidade das formigas saúvas.

**Tabela 12** - Médias da análise do comportamento das formigas cortadeiras *Atta sexdens*.

Comportamento das Formigas				
Tratamentos	Dia 1	Dia 7	Dia 12	Dia 16
T1	1.0 a	1.0 a	1.0 a	1.0 a
T2	1.4 a	1.4 a	2.0 b	2.0 b

Teste Tukey a nível de 5% de significância.

**Legenda:** T1 - tratamento somente com água destilada; T2 - tratamento com um “pool” de bactérias endofíticas antagonistas.



**Figura 18** – Comportamento das formigas cortadeiras no primeiro ensaio *in vivo*.

Trabalhos desenvolvidos com plantas da família Burseraceae conhecidas por seus exsudatos e resinas ricos em compostos aromáticos são utilizados como perfumaria, vernizes, entre outras utilidades (LE COINTE, 1934). Resultados do efeito dos extratos de *Protium heptaphyllum* sobre o desenvolvimento do fungo simbionte mostraram que somente os extratos brutos hexânico e diclorometânico do galho inibiam cerca de 60% do fungo simbionte. Os mesmos resultados foram observados com frações do extrato diclorometânico e do extrato hexânico. Os componentes dessas frações indicaram a presença de triterpenos na resina desta espécie (SUSUNAGA et al., 2001).

Na tentativa de confirmar os resultados obtidos no ensaio *in vivo* com as bactérias endofíticas antagonistas, foi realizado o segundo teste com formigueiros completos montados no laboratório.

## Teste II *in vivo*

No mês de abril de 2011 foi realizado o segundo ensaio *in vivo* com as bactérias endofíticas *Pseudomonas putida*; *Bacillus amyloliquefaciens* e *Serratia grimesii* isoladas da planta medicinal quebra-pedra (*Phyllanthus* sp.), com o objetivo de avaliá-las frente ao jardim de fungos das formigas cortadeiras *Atta sexdens*.

Para a realização do segundo teste, foram programados quatro tratamentos; T1 também chamado de controle ou testemunha no qual as folhas de laranja (*C. sinensis*) foram pulverizadas com água destilada e colocadas na panela de alimentação das formigas; T2 em que foram utilizadas as folhas de quebra-pedra tratadas com essência de laranja; T3 onde folhas de laranjeiras foram pulverizadas com uma solução de bactérias antagonistas e a seguir colocadas na panela de alimentação das formigas cortadeiras; T4 onde folhas de laranjeiras receberam pulverização com o líquido metabólico das bactérias endofíticas antes de serem colocadas na panela de alimentação das formigas cortadeiras. Para este tratamento o caldo de cultivo onde as bactérias foram cultivadas foi submetido à filtração em membrana milipore e somente a parte líquida identificada como líquido metabólico foi utilizado. Todos os tratamentos realizados em 5 repetições com observações diárias durante 21 dias seguidos

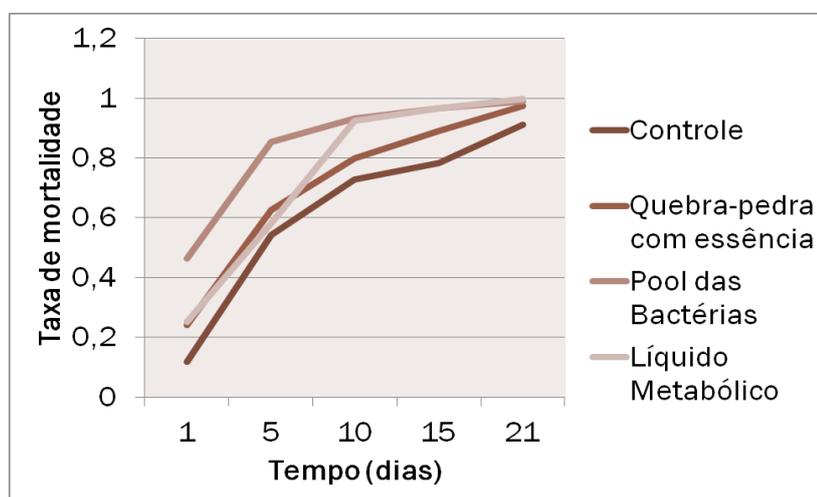
Os resultados da taxa de mortalidade do fungo das formigas saúvas ou cortadeiras *Atta sexdens* podem ser observados na (Tabela 14, figura 19). O tratamento T3 diferiu estatisticamente, já no primeiro dia, dos demais tratamentos. No quinto dia o tratamento T3 diferiu estatisticamente do controle T1, evidenciando alta mortalidade do fungo. No décimo dia observou-se mortalidade do fungo simbionte nos tratamentos T3 e T4. O tratamento controle foi o que apresentou menor mortalidade do fungo quando comparado com o T3 e o T4. A partir do décimo quinto dia até o vigésimo primeiro dia observou-se declínio do jardim de fungos em todos os tratamentos.

**Tabela 13** - Quadro de médias da taxa de mortalidade do jardim de fungo das formigas saúvas.

<b>Taxa de Mortalidade</b>					
<b>Tratamentos</b>	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 5</b>	<b>Dia 10</b>	<b>Dia 15</b>	<b>Dia 21</b>
<b>T1</b>	0.1176 a	0.5414 a	0.7278 a	0.7842 ns	0.9104 ns
<b>T2</b>	0.2423 a	0.6271 ab	0.7984 ab	0.8903 ns	0.9733 ns
<b>T3</b>	0.4648 b	0.8548 b	0.9327 b	0.9674 ns	0.9889 ns
<b>T4</b>	0.2516 a	0.5826 ab	0.9230 b	0.9667 ns	0.9964 ns

Teste Tukey a nível de 5% de significância.

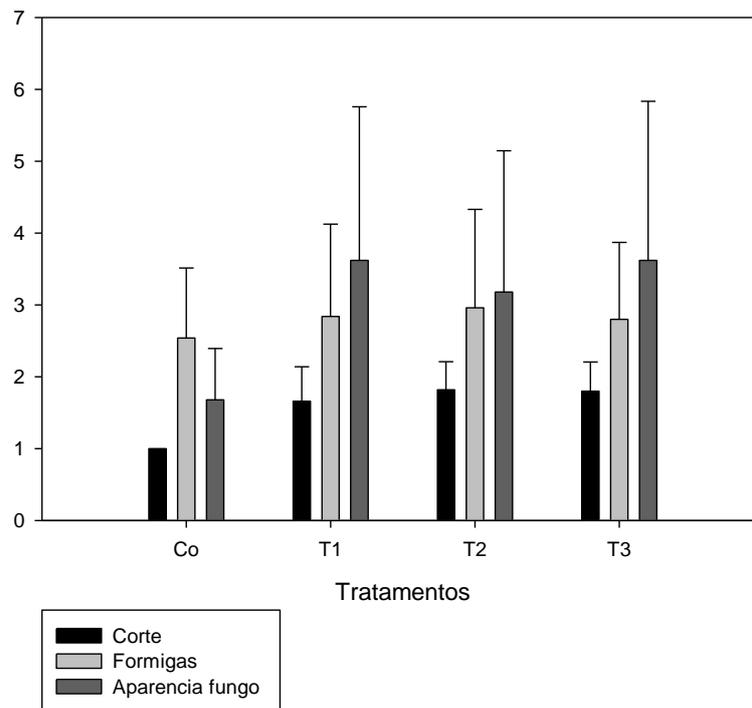
**Legenda:** T1 - tratamento somente com água destilada; T2 - tratamento com folhas de quebra pedra com essência de laranja; T3 – tratamento com o “*pool*” de bactérias endofíticas antagonistas; T4 – tratamento com o líquido metabólico das bactérias endofíticas antagonistas, ns – diferença não significativa.



**Figura 19** – Taxa de mortalidade dos tratamentos do segundo ensaio *in vivo*.

Os resultados obtidos, em relação à mortalidade são semelhantes ao experimento piloto com apenas dois tratamento e constatou-se resultado positivo e rápido para a mortalidade do fungo simbionte no tratamento T3. O tratamento T4, com o líquido

metabólico, também foi positivo para mortalidade do fungo, mas em um tempo maior de exposição quando comparado com a aplicação direta das bactérias. O tratamento T2 quebra-pedra com essência, também foi promissor, mas foi o mais lento de todos os tratamentos utilizados, figura 20.



**Figura 20** - Características dos formigueiros no teste de antagonismo *in vivo*. Valores baixos indicam comportamentos desejáveis. Valores mais altos indicam a desestabilização do formigueiro e dos jardins de fungos associados.

Na natureza é difícil observar formigas saúvas cortarem plantas de quebra-pedra, por isso, a estratégia de utilizar a essência de citros facilitou o processo de corte das folhas de *Phyllanthus* sp., por estas formigas.

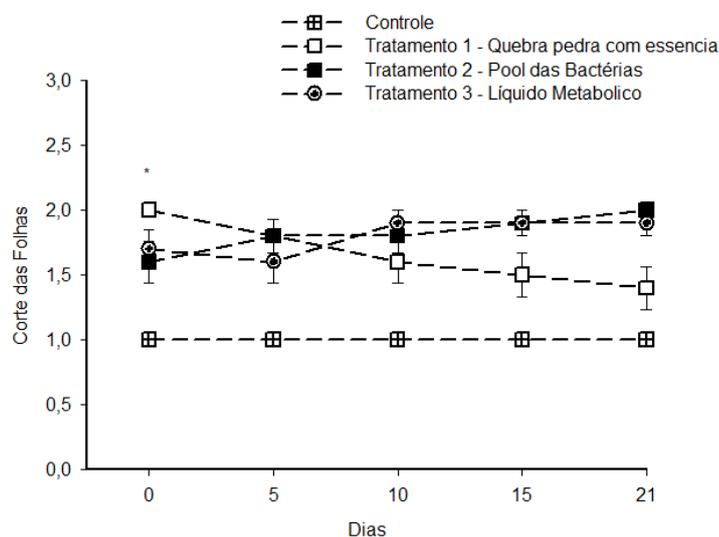
O comportamento de corte das folhas pelas formigas (Tabela 15, figura 21), não diferiu estatisticamente entre os tratamentos, mostrando que as formigas não cortaram muitas folhas, fato este que pode ter influenciado na mortalidade do fungo.

**Tabela 14** – Média do comportamento de corte das folhas de alimentação do fungo simbiote das formigas cortadeiras *Atta sexdens*.

Folhas cortadas em cm <sup>2</sup>					
Tratamentos	Dia 1	Dia 5	Dia 10	Dia 15	Dia 21
T1	2.0 a	1.6 a	1.8 a	1.6 a	1.6 a
T2	1.6 a	2.0 a	1.4 a	1.4 a	1.4 a
T3	1.6 a	1.8 a	1.6 a	1.8 a	2.0 a
T4	2.0 a	1.5 a	2.0 a	2.0 a	2.0 a

Teste Tukey a nível de 5% de significância.

**Legenda:** T1 - tratamento somente com água destilada; T2 - tratamento com folhas de quebra pedra com essência de laranja; T3 – tratamento com o “pool” de bactérias endofíticas antagonistas; T4 – tratamento com o líquido metabólico das bactérias endofíticas antagonistas.



**Figura 21** - Corte das folhas das formigas cortadeiras no ensaio *in vivo*. Quanto menores os valores, mais próxima à normalidade a nidificação das formigas.

Foi avaliado também o comportamento das formigas cortadeiras, sendo as médias próximas a 2,0 apresentando formigas calmas nidificano normalmente, e 3,0 formigas agitadas levando a morte das mesmas, ocorreu uma mudança no decorrer do experimento. No tratamento 3 foi observado o início da mortalidade das formigas no 5º dia, enquanto o tratamento T2 registrou a mortalidade das formigas a partir do 10º dia (Tabela 16, figura 22). A partir do 15º ao 21º dia não ocorreu diferença estatística entre os tratamentos, mostrando que no decorrer do tempo, ocorreu a mortalidade das formigas em todos os tratamentos.

**Tabela 15** – Médias do comportamento das formigas cortadeiras *Atta sexdens*.

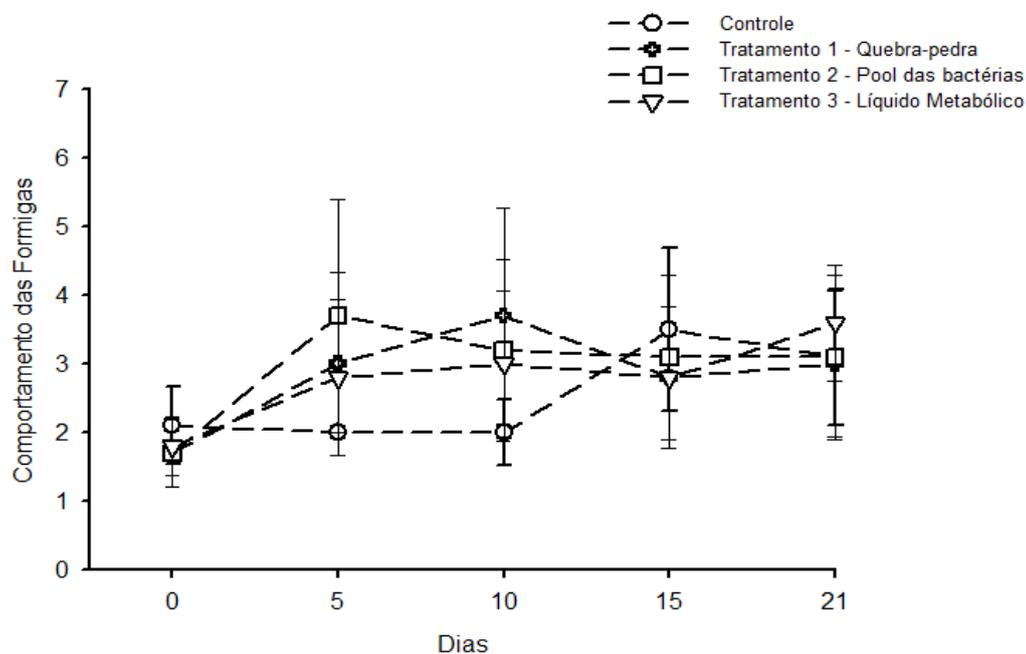
<b>Análise do comportamento das Formigas</b>					
<b>Tratamentos</b>	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 5</b>	<b>Dia 10</b>	<b>Dia 15</b>	<b>Dia 21</b>
<b>T1</b>	1.8 a	2.0 a	2.0 a	3.2 a	3.2 a
<b>T2</b>	3.7 a	2.4 ab	4.4 b	3.2 a	2.8 a
<b>T3</b>	2.6 a	3.8 b	3.2 ab	3.2 a	3.2 a
<b>T4</b>	3.2 a	2.2 ab	2.8 ab	2.4 a	4.0 a

Teste Tukey a nível de 5% de significância.

**Legenda:** T1 - tratamento somente com água destilada; T2 - tratamento com folhas de quebra pedra com essência de laranja; T3 – tratamento com o “pool” de bactérias endofíticas antagonistas; T4 – tratamento com o líquido metabólico das bactérias endofíticas antagonistas.

Quando à aparência do fungo das formigas cortadeiras *Atta sexdens* (Tabela 17, figura 23), observou-se que no primeiro dia todos os tratamentos mostravam um jardim de fungos íntegro e com vitalidade. A partir do quinto dia, os tratamentos T1 e T4 apresentavam-se semelhantes à aparência do jardim no primeiro dia, porém os tratamentos T2 e T3 já evidenciavam início de um processo de decadência. O aspecto do jardim de fungos começou a diferir estatisticamente do controle no décimo quinto dia, evidenciando diminuição do seu

tamanho e mostrando evidentes sinais de degeneração, fato este que corrobora com os dados obtidos *in vitro* e listados na Tabela 5.



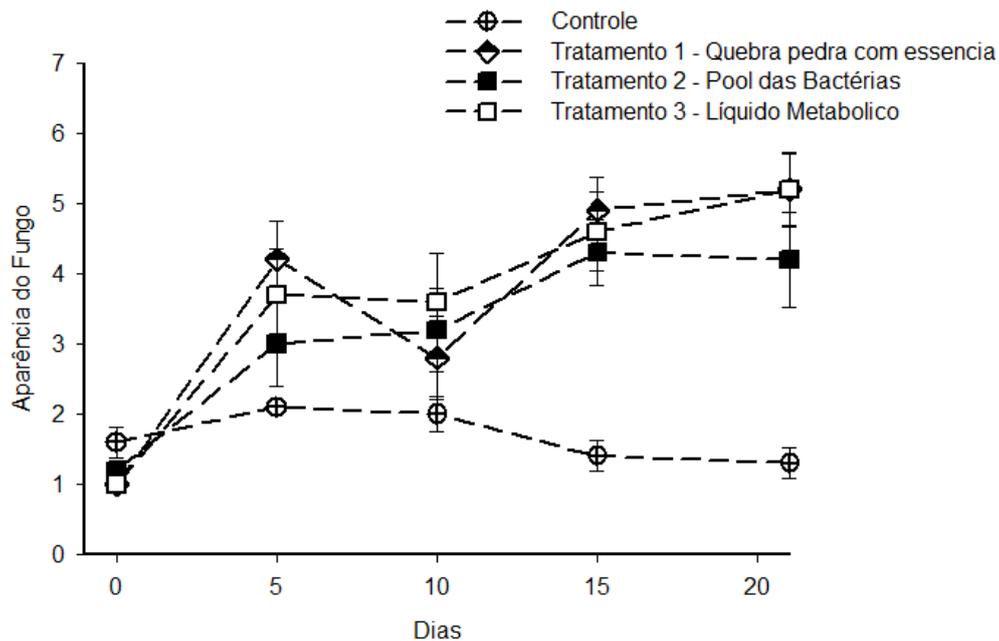
**Figura 22** - Comportamento das formigas cortadeiras no ensaio *in vivo*. Quanto menores os valores, mais próxima à normalidade a nidificação das formigas.

**Tabela 16** – Médias do comportamento do fungo das formigas cortadeiras *Atta sexdens*.

Análise do comportamento do Fungo					
Tratamentos	Dia 1	Dia 5	Dia 10	Dia 15	Dia 21
<b>T1</b>	2.6 a	2.0 a	2.0 a	1.0 a	1.0 a
<b>T2</b>	2.8 a	4.0 a	1.6 a	4.4 b	4.6 b
<b>T3</b>	3.4 a	4.2 a	4.2 a	4.6 b	4.8 b
<b>T4</b>	2.6 a	2.4 a	3.0 a	5.0 b	6.0 b

Teste Tukey a nível de 5% de significância.

**Legenda:** T1 - tratamento somente com água destilada; T2 - tratamento com folhas de quebra pedra com essência de laranja; T3 – tratamento com o “pool” de bactérias endofíticas antagonistas; T4 – tratamento com o líquido metabólico das bactérias endofíticas antagonistas, ns – diferença não significativa.



**Figura 23** - Aparência do fungo das formigas cortadeiras no ensaio *in vivo*. Quanto menores os valores, mais próxima à normalidade a nidificação das formigas.

São diversas as estratégias e adaptações dessas formigas para impedir ou diminuir o desenvolvimento de qualquer microrganismo que possa competir com o fungo mutualista, dentre as quais se destacam: 1) a apurada limpeza do substrato coletado, com a conseqüente retirada mecânica de esporos fúngicos e de microrganismos das superfícies das folhas ou dos jardins de fungos (CURRIE e STUART, 2001; VAN BAEL et al., 2009); 2) a semeadura maciça de micélio fungico nos fragmentos foliares coletados (WEBER, 1972); 3) o uso de secreções glandulares contendo compostos antissépticos (MARSARO-JÚNIOR et al., 2001; FERNÁNDEZ-MARÍN et al., 2006; RODRIGUES et al., 2008); 4) a remoção de partes do jardim de fungos uma vez detectado o crescimento de um microrganismo invasor (CURRIE e STUART, 2001); 5) antagonismo do próprio fungo simbiote perante outros microrganismos (POULSEN e BOOMSMA, 2005; VAN BAEL et al., 2009) e 6) interações com microrganismos que podem oferecer proteção aos ninhos.

#### 4.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, H.A. et al. 2001a. Enraizamento de estacas de erva-cidreira quimiotipo III (carvona-limoneno). **Horticultura Brasileira**, v.19, n.2, 245 p.
- ALBUQUERQUE, H.A. et al. 2001b. Estaquia de erva-cidreira quimiotipo II (citrálimoneno). **Horticultura Brasileira**, v.19, n.2, 245 p.
- ALVES, S.B. 1998. Patologia e controle microbiano: Vantagens e desvantagens, p.21-37. In S.B. Alves (ed.), **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba, FEALQ, 1163 p.
- ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; BARROSO, P.A.V.; SARIDAKIS, H.O.; AZEVEDO, J.L. 2001. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, 229-236 p.
- AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; PEREIRA, J.; ARAÚJO, W.L. 2000. Endophytic microorganisms: A review on insect control and recent advantages on tropical plants. **Environmental Biotechnology**. v3 n1, 31 p.
- BASS, M.; CHERRETT, J.M. 1994. The role of leaf-cutting ant workers (Hymenoptera: Formicidae) in fungus garden maintenance. **Ecological Entomology**, Oxford v.19, n.3 215-220 p.
- BENT, E.; CHANWAY, C.P. 1998. The growth-promoting effects of a bacterial endophyte on lodgepole pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**. v.44, 980-988 p.
- BILL, M.; MILLER, L. G.; GOLDSTEIN, A. H. 2002a. Carbon isotope fractionation of methyl bromide during agricultural soil fumigations, **Biogeochemistry**, 60, 181–190 p.
- BILL, M.; RHEW, R. C.; WEISS, R. F.; GOLDSTEIN, A. H. 2002b. Carbon isotope ratios of methyl bromide and methyl chloride emitted from a coastal salt marsh, **Geophys. Res. Lett.**, 29, doi:10.1029/2001GL012946.
- BOURTZIS, K.; MILLER, T.A. 2007. **Insect symbiosis**. Boca Raton: CRC, 347 p.
- CHAPELA, I. H.; REHNER, S. A.; SCHULTZ, T. R.; MÜELLER, U. G. 1994. Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. **Science**, 266: 1691-1694 p.

COHEN, R. 1994. **Fronteiras da Identidade: os britânicos e os outros**, London: Longman, e New York: Addison Wesley.

COOMBS, E.; CLARK, J.K.; PIPER, G.L.; COFRANCESCO, A.F. 2004. **Biological control of invasive plants in the United States**. Oregon State University Press, Corvallis, OR, USA.

COUDRON, P.; HANSON, N.D.; CLIMO, M.W. 2006. Occurrence of Extended-Spectrum and AmpC Beta-Lactamases in Bloodstream Isolates of *Klebsiella pneumoniae*: Isolates Harbor Plasmid-Mediated FOX-5 and ACT-1 AmpC Beta-Lactamases. **Clinical microbiology**.

CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. 1999a. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 96: 7998-8002 p.

CURRIE, C. R.; SCOTT, J. A.; SUMMERBELL, R. C.; MALLOCH, D. 1999b. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, 398: 701-704 p.

CURRIE, C. R.; STUART, A. E. 2001. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**.

DOWNING, K. J.; THOMSON, J. A. 2000. Introduction of the *Serratia marcescens* *chiA* gene into an endophytic *Pseudomonas fluorescens* for the biocontrol of phytopathogenic fungi. **Can. J. Microbiol.** 46:1-7 p.

DUIJFF, B.; GIANINIZZI-PEARSON, V.; LEMANCEAU, P. 1997. Involvement of the outer membrane lipopoly saccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. **New Phytology**, Oxford, v. 135, 325-334 p.

EL-TARABILY, K. A. 2003. Na endophytic chitinase producing isolate of *Actinoplanes missouriensis* with potencial for biological control of root rot of lupin caused by *Plectosporium tabacinum*, Aust, **J. Bot**, 51: 257-266 p.

FERNÁNDEZ-MARÍN, H., ZIMMERMAN, J. K., REHNER, S. A.; WCISLO, W. T. 2006. Active use of metapleural glands by ants in controlling fungal infection. **Proc. R. Soc. B** 273, 1689-1695 p.

FERNANDES, G.W. 1987. Insetos formando Gall: A sua importância econômica e controle. **Rev. Bras. Entomol.** V31. 379-398 p.

GÄUMANN, E. 1950. Principles of Plant Infection. Crosby Lockwood & Sons, London.

- GREEN, R.B., HATINI, V., JOHANSEN, K.A., LIU, X.J., LENGYEL, J.A. 2002. Drumstick is a zinc finger protein that antagonizes Lines to control patterning and morphogenesis of the *Drosophila* hindgut. **Development** **129(15)**: 3645—3656 p.
- GUERRA, M.S. 1985. **Receituário caseiro: alternativas para o controle de pragas e doenças de plantas cultivadas e de seus produtos**. Brasília: Embrater, 166p.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, 895-914 p.
- HANADA, R. E.; POMELLA, A. W. V.; RAMIREZ, W.S.; LOGUERCIO, L. L.; PEREIRA, J. O. 2009. Biocontrol potential of *Trichoderma martiale* against black-pod disease (*Phytophthora palmivora*) of cacao. **Biological Control (Print)**, v. 50, 143-149 p.
- HERTZ, H.; HÖLLDOBLER, B.; ROCES, F. 2008. Delayed rejection in a leaf-cutting ant after foraging on plants unsuitable for the symbiotic fungus. **Behavioral Ecology**, Oxford, v.19, n.1 575-582 p.
- KLOEPPER, J. W., TUZUN, S.; KUC, J. A. 1992. Proposed definitions related to induced disease resistance. *Biocontrol Sci. Technol.*, 2: 349-351 p.
- KLOEPPER, J. W., RODRÍGUEZ-KÁBANA, R., ZEHNDER, G.W., MURPHY, J.F., SIKORA, E., FERNÁNDEZ, C. 1999. Plant root-bacterial associations in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. **Australasian Plant Pathology** 28:21-26 p.
- KRISHNAMURTHY, K.; GNANAMANICKAM, S. S. 1997. Biological control of sheath blight of rice: induction of systemic resistance in rice by plant-associated *Pseudomonas* spp. *Curr Sci* 72: 331–334 p.
- LE COINTE, P. 1934. **Árvores e plantas úteis (indígenas e aclimatadas)**. Série: A Amazônia Brasileira, nº 3. Livraria Clássica, Belém.
- LODEWYCKX, C., VANGRONVELD, J., PORTEOUS, F., MOORE, E.R.B., TAGHAVI, S., MEZGEAY, M., VAN DER LELIE, D., 2002. Endophytic bacteria and their potential applications. **Crit. Rev. Plant Sci.** 21, 583–606 p.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. DE A. 2002. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, Instituto Plantarum.

LORENZO, D.; PAZ, D.; DELLACASSA, E.; DAVIES, P.; VILA, R.; CANIGUERAL, S. 2002. Essencial óleos de Menha pulegium *Mentha rotundifolia* e do Uruguai. **Bras. Arch. Biol. Technol**, 45: 519-524 p.

MAGALHÃES, I. 2000. **Eu e Tu: A Constituição do Sujeito no Discurso Médico**. Brasília, DF: Thesaurus.

MAGALHÃES, P. M. 1997. **O Caminho Medicinal das Plantas: Aspectos sobre o cultivo**. Edição Fotolitos, Campinas, SP-Brasil, CQBA-UNICAMP, agrotecnologia, 11-120 p.

MAHAFFEE, W. F.; BAUSKE, E.M.; VAN VUURDE, J.W.; VAN DER WOLF, J.M; VAN DEN BRINK, M.; KLOPPER, J.W. 1997. Comparative analysis of antibiotic resistance, immunofluorescent colony staining and a transgenic marker (bioluminescence) for monitoring the environmental fate of *rhizobacterium*. **Applied and environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63 1617-1622 p.

MARANHÃO, J. L. S. 1986. **O que é morte**. 2 ed. São Paulo/; Brasiliense.

MARCON, R. 2002. **O Custo do Capital Próprio das Empresas Brasileiras: o caso dos American Depositary Receipts (ADRs)**. Tese de Doutorado – Universidade Federal de Santa Catarina, SC.

MARI, M.; GUIZZARDI, M.; BRUNELLI, M.; FOLCHI, A. 1996. Postharvest biological control of grey mould (*Botrytis cinerea* Pers.: Fr.) on fresh-market tomatoes with *Bacillus amyloliquefaciens*. **Crop Protection**, v.15, 699-705 p.

MARSARO, A.L.JR.; DELLA LUCIA, T.M.C.; BARBOSA, L.C.A.; MAFFIA, L.A.; MORANDI, M.A.B. 2001. Efeito de secreções da glândula mandibular de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) sobre a germinação de conídios de *Botrytis cinerea*. **Pres. Fr. Neotr. Entomol.**, 30 (3), 403-406 p.

M'PIGA, P.; BÉLANGER, R.R.; PAULITZ, T.C.; BENHAMOU, N. 1997. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicislycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.50, 301-320 p.

MULLER, A.K.; WESTERGAARD, K.; CHRISTENSEN, S.; SORENSEN, S.J. 2001. The effect of long-term mercury pollution on the soil microbial community. **FEMS Microbiol. Ecol.** 36, 11 –19 p.

MULLER, A.K.; WESTERGAARD, K.; CHRISTENSEN, S.; SORENSEN, S.J. 2002. The diversity and function of soil microbial communities exposed to different disturbances. **Microb. Ecol.** 44, 49– 58 p.

MUELLER, U. G. 2002 Ant versus fungus versus mutualism: ant–cultivar conflict and the deconstruction of the attine ant–fungus symbiosis. **Am. Nat.** 160, 67–98 p.

MUELLER, U. G.; WCISLO, W. T. 1998 Nesting biology of the fungus-growing ant *Cyphomyrmex longiscapus weber* (Attini Formicidae). **Insect. Soc.** 45, 181–189 p.

PAN, X. R.; LI, G. W.; HU, Y. H.; WANG, J. X.; YANG, W. Y.; AN, Z. X.; HU, Z. X.; LIN, J.; XIAO, J. Z.; CAO, H. B. C.; LIU, P. A.; JIANG, X. G.; WANG, J. P.; ZHENG, H.; ZHANG, H.; BENNETT, P. H.; HOWARD, B. V., 1997. Effect of diet and exercise in preventing NIDDM in people with impaired glucose tolerance. **Diabetes Care**, 20:537-544 p.

PLEBAN, S.; CHERNIN, L.; CHET, I. 1997. Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 25, n. 4, 284-288 p.

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

POULSEN, M.; BOT, A. N. M.; BOOMSMA, J.J. 2003 b. The effect of metapleural gland on the growth of a mutualistic bacterium on the cuticle of leafcutting ants. **Naturwissenschaften**, v.90, n.9, 406-409 p.

POULSEN, M.; BOOMSMA, J. 2005. Mutualistic fungi control crop diversity in fungus-growing ants. **Science**, Washington, v. 307, n.5710,741-744 p.

QUADT-HALLMANN, A.; KLOEPPER, J.W. 1996. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae*, strain JM22 in different plant species. **Can. J. Microbiol.** 42: 1144-1154 p.

QUADT-HALLMANN, A.; HALLMANN, J.; KLOEPPER, J.W. 1997 a. Bacterial endophytes in cotton: localization and interaction with other plant-associated bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, 254-259 p.

QUADT-HALLMANN, A.; BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J.W. 1997 b. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, 577-582 p.

RAUPACH, G. S.; KLOEPPER, J. W. 1998. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. **Phytopathology**, v.88, 1158-1164 p.

REGO, J. L. 1943. **Fogo morto**. Rio de Janeiro: José Olympio.

RODRIGUES, G. H.; *et al.* 2008. Polpa cítrica em rações para cordeiros em confinamento: características da carcaça e qualidade da carne. **Revista Brasileira Zootecnia**. vol.37, n.10.

SALLES, L. A. B. 2000. Biologia e ciclo de vida de *Anastrepha fraterculus* (Wied.), p. 81-86. In: A. MALAVASI & R. A. ZUCCHI (edit.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto, Holos Editora, 327 p.

SAMUELS, D. 2004. From Socialism to Social Democracy? Party Organization and the Transformation of the Workers' Party in Brazil. **Comparative Political Studies**, vol.37, nº9, 999-1024 p.

SCRIBER, J.M.; SLANSKY JÚNIOR, F. 1981. The Nutritional Ecology of Immature Insects. **Annual Review of Entomology**. v. 26 183-211 p.

SHARMA, A.H.; NOWAK, J. 1998. Enhancement of *Verticillium* wilt resistance in tomato transplant by in vitro co-culture of seedlings with a plant growth promoting rhizobacterium (*Pseudomonas* sp. Strain PsJN). **Can. J. Microbiol.**, 44: 528-536 p.

SLANSKY JR., F.; SCRIBER, J.M. 1985. Food consumption and utilization. In: SLANSKY JR., F.; RODRIGUEZ, J.G. (Eds.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry, and pharmacology**. New York: Pergamon Press, 87-163 p.

SLANSKY JUNIOR., F. 1982. Insect nutrition: an adaptationist's perspective. **Florida Entomologist**. v. 65, 45-71 p.

SLANSKY JUNIOR, F.; RODRIGUEZ, J.G. (Ed.). 1987. **Nutritional Ecology of insects, mites, spiders, and related invertebrates**. New York: J. Wiley & Sons, 955 p.

SOUZA, A.Q.L.; SOUZA, A.D.L.; ASTOLFI FILHO, S.; PINHEIRO, M.L.B.; SARQUIS, M.I.M.; PEREIRA, J.O. 2004. Atividade Antimicrobiana de Fungos Isolados de Plantas Tóxicas da Amazônia: *Palicourea Longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos Cogens* Bethan; **Acta Amazônica** 34(2): 185 -195 p.

SOUZA, A.Q.L. 2006. **Potencial Genético e Químico dos endófitos de *Murray paniculata* L. (Jack)**. Tese de doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil, 128 p.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. 2004. Natural products from endophytic microorganisms. **J. Nat. Prod.**, 67: 257-268 p.

STROBEL, G.A., 2003. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes Infect.**, 5: 535-544 p.

STROBEL, G.; FORD, E.; WORAPONG, J.; GRANT, D.M. FUNG, P.C. *et al.*, 2002. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. **Phytochemistry**, 60: 179-183 p.

STROBEL, G.A. 2002. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.22, n.4, 315-333 p.

STROBEL, G.A.; DIRKSIE, E.; SEARS, J. MARKWORTH, C. 2001. Volatile antimicrobials from a novel endophytic fungus. **Microbiology**, 147: 2943-2950 p.

SUSUNAGA, G.S.; SIANE, A.C.; PIZZOLATTI, M.G.; YUNES, R.A.; MONAACHE, F.D. 2001. Triterpenes from the resin of *Protium heptaphyllum*. **Fitoterapia** 72: 709-711 p.

TAECHOWISAN, T.; LU, C.; SHEN, Y.; LUMYONG, S. 2003. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. **Microbiology**.

TORRES, D.Z., IGLESIAS, M.C.R., BORRERO, E.T., ZULUETA, N.F. 2003. Patrones de alimentación y evaluación nutricional en niños deshabilitados. **Rev Cuba Salud Pública**, 29:111-16 p.

VAN BAEL, S. A., VALENCIA, M., ROJAS, E. I., GÓMEZ, N., WINDSOR, D. M., HERRE, E. A. 2009. Effects of foliar endophytic fungi on the preference and performance of a leaf beetle, *Chelymorpha alternans* Boheman (Chrysomelidae: Cassidinae). **Biotropica** 41, 221–225 p.

VAN LOON, L. C., BAKKER, P. A. H. M., PIETERSE, C. M. J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, 36: 453-483 p.

WEBER, N. A. 1972. Gardening ants: the attines. **Mem. Am. Philos. Soc.** 92, 1–146 p.

WEBSTER, G.L. 1994. Synopsis of the genera and suprageneric *taxa* of Euphorbiaceae. *Annals of Missouri Botanical Garden* 81:33-144 p.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. 2006. Biology and chemistry of endophytes. **Nat Prod Rep** 23, 753–771 p.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As formigas cortadeiras são conhecidas por manterem uma associação mutualística com fungos. Estima-se que por volta de 50 milhões de anos atrás o ancestral da tribo desenvolveu a capacidade de cultivar fungos como alimento. Por muitos anos, acreditou-se que o mutualismo estivesse restrito a interação formiga-fungo. Entretanto, nos últimos 11 anos outros microrganismos foram descritos como integrantes dos ninhos, alguns deles com papel biológico conhecido. Dentre novas perspectivas para o controle destas formigas está o uso de bactérias endofíticas como o encontrado na planta medicinal quebra-pedra *Phyllanthus* sp., que se mostraram promissoras e merecedoras de novos estudos sobre suas interações de antagonismos com os microrganismos do jardim de fungos simbiotes das formigas cortadeiras *Atta sexdens*.

Considerando-se a complexidade do ambiente em estudo, seria imprudente tirar conclusões precipitadas sobre a eficiência, *in vivo*, da ação das bactérias endofíticas antagonistas contra o jardim de fungos das formigas cortadeiras. Diante das estratégias utilizadas neste estudo, uma provável explicação para o declínio do jardim de fungos simbiotes é o fato de as formigas interromperem o corte das folhas que serviam para a alimentação dos microrganismos associados ao ninho, reduzindo drasticamente, com esse comportamento, o tamanho do jardim de fungos simbiotes e conseqüentemente levando a mortalidade dos ninhos. Para serem consideradas promissoras e para que se possa comprovar a ação direta das bactérias endofíticas no declínio do jardim de fungos, novos ensaios serão necessários. Prioritariamente será necessário comprovar a ocorrência de alguma forma de antagonismo microbiano *in vivo*, do mesmo modo como foram demonstrados *in vitro*.

## **ANEXOS 01**

**Anexo 01** – Teste estatístico Anova – Tukey nivel 5% significancia – Dias/ Tratamento/ Corte das folhas.

**Normality Test:** Failed ( $P < 0,050$ )

**Equal Variance Test:** Failed ( $P < 0,050$ )

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Dias	4	0,0200	0,00500	0,0398	0,997
Tratamento	3	22,420	7,473	59,522	<0,001
Dias x Tratamento	12	3,980	0,332	2,642	0,003
Residual	180	22,600	0,126		
Total	199	49,020	0,246		

Main effects cannot be properly interpreted if significant interaction is determined. This is because the size of a factor's effect depends upon the level of the other factor.

The effect of different levels of Dias depends on what level of Tratamento is present. There is a statistically significant interaction between Dias and Tratamento. ( $P = 0,003$ )

Power of performed test with  $\alpha = 0,0500$ : for Dias : 0,0500

Power of performed test with  $\alpha = 0,0500$ : for Tratamento : 1,000

Power of performed test with  $\alpha = 0,0500$ : for Dias x Tratamento : 0,836

Least square means for Dias :

**Group Mean**

T0d 1,575

T5d 1,550

T10d 1,575

T15d 1,575

T21d 1,575

Std Err of LS Mean = 0,0560

Least square means for Tratamento :

**Group Mean**

Co 1,000

T1 1,660

T2 1,820

T3 1,800

Std Err of LS Mean = 0,0501

Least square means for Dias x Tratamento :

**Group Mean**

T0d x Co 1,000

T0d x T1 2,000

T0d x T2 1,600

T0d x T3 1,700

T5d x Co 1,000

T5d x T1 1,800

T5d x T2 1,800

T5d x T3 1,600

T10d x Co 1,000

T10d x T1 1,600

T10d x T2 1,800

T10d x T3 1,900

T15d x Co 1,000

T15d x T1 1,500

T15d x T2 1,900

T15d x T3 1,900

T21d x Co 1,000

T21d x T1 1,400

T21d x T2 2,000

T21d x T3 1,900

Std Err of LS Mean = 0,112

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: **Dias**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0,050</b>
T10d vs. T5d	0,0250	5	0,446	0,998	No
T10d vs. T0d	2,220E-016	5	3,963E-015	1,000	Do Not Test
T10d vs. T21d	0,000	5	0,000	1,000	Do Not Test

T10d vs. T15d	0,000	5	0,000	1,000	Do Not Test
T15d vs. T5d	0,0250	5	0,446	0,998	Do Not Test
T15d vs. T0d	2,220E-016	5	3,963E-015	1,000	Do Not Test
T15d vs. T21d	0,000	5	0,000	1,000	Do Not Test
T21d vs. T5d	0,0250	5	0,446	0,998	Do Not Test
T21d vs. T0d	2,220E-016	5	3,963E-015	1,000	Do Not Test
T0d vs. T5d	0,0250	5	0,446	0,998	Do Not Test

Comparisons for factor: **Tratamento**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
T2 vs. Co	0,820	4	16,364	<0,001	Yes
T2 vs. T1	0,160	4	3,193	0,108	No
T2 vs. T3	0,0200	4	0,399	0,992	Do Not Test
T3 vs. Co	0,800	4	15,965	<0,001	Yes
T3 vs. T1	0,140	4	2,794	0,197	Do Not Test
T1 vs. Co	0,660	4	13,171	<0,001	Yes

Comparisons for factor: **Tratamento within T0d**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,05
T1 vs. Co	1,000	4	8,924	<0,001	Yes
T1 vs. T2	0,400	4	3,570	0,056	No
T1 vs. T3	0,300	4	2,677	0,231	Do Not Test
T3 vs. Co	0,700	4	6,247	<0,001	Yes
T3 vs. T2	0,1000	4	0,892	0,922	Do Not Test
T2 vs. Co	0,600	4	5,355	<0,001	Yes

Comparisons for factor: **Tratamento within T5d**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,05
T1 vs. Co	0,800	4	7,140	<0,001	Yes
T1 vs. T3	0,200	4	1,785	0,587	No
T1 vs. T2	0,000	4	0,000	1,000	Do Not Test
T2 vs. Co	0,800	4	7,140	<0,001	Yes
T2 vs. T3	0,200	4	1,785	0,587	Do Not Test
T3 vs. Co	0,600	4	5,355	<0,001	Yes

Comparisons for factor: **Tratamento within T10d**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0,05</b>
T3 vs. Co	0,900	4	8,032	<0,001	Yes
T3 vs. T1	0,300	4	2,677	0,231	No
T3 vs. T2	0,1000	4	0,892	0,922	Do Not Test
T2 vs. Co	0,800	4	7,140	<0,001	Yes
T2 vs. T1	0,200	4	1,785	0,587	Do Not Test
T1 vs. Co	0,600	4	5,355	<0,001	Yes

Comparisons for factor: **Tratamento within T15d**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0,05</b>
T2 vs. Co	0,900	4	8,032	<0,001	Yes
T2 vs. T1	0,400	4	3,570	0,056	No
T2 vs. T3	0,000	4	0,000	1,000	Do Not Test
T3 vs. Co	0,900	4	8,032	<0,001	Yes
T3 vs. T1	0,400	4	3,570	0,056	Do Not Test
T1 vs. Co	0,500	4	4,462	0,009	Yes

Comparisons for factor: **Tratamento within T21d**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0,05</b>
T2 vs. Co	1,000	4	8,924	<0,001	Yes
T2 vs. T1	0,600	4	5,355	<0,001	Yes
T2 vs. T3	0,100	4	0,892	0,922	No
T3 vs. Co	0,900	4	8,032	<0,001	Yes
T3 vs. T1	0,500	4	4,462	0,009	Yes
T1 vs. Co	0,400	4	3,570	0,056	No

Comparisons for factor: **Dias within Co**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0,05</b>
T0d vs. T21d	0,000	5	0,000	1,000	No
T0d vs. T15d	0,000	5	0,000	1,000	Do Not Test
T0d vs. T10d	0,000	5	0,000	1,000	Do Not Test

T0d vs. T5d	0,000	5	0,000	1,000	Do Not Test
T5d vs. T21d	0,000	5	0,000	1,000	Do Not Test
T5d vs. T15d	0,000	5	0,000	1,000	Do Not Test
T5d vs. T10d	0,000	5	0,000	1,000	Do Not Test
T10d vs. T21d	0,000	5	0,000	1,000	Do Not Test
T10d vs. T15d	0,000	5	0,000	1,000	Do Not Test
T15d vs. T21d	0,000	5	0,000	1,000	Do Not Test

Comparisons for factor: **Dias within T1**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0,05</b>
T0d vs. T21d	0,600	5	5,355	0,001	Yes
T0d vs. T15d	0,500	5	4,462	0,014	Yes
T0d vs. T10d	0,400	5	3,570	0,085	No
T0d vs. T5d	0,200	5	1,785	0,715	Do Not Test
T5d vs. T21d	0,400	5	3,570	0,085	No
T5d vs. T15d	0,300	5	2,677	0,321	Do Not Test
T5d vs. T10d	0,200	5	1,785	0,715	Do Not Test
T10d vs. T21d	0,200	5	1,785	0,715	Do Not Test
T10d vs. T15d	0,100	5	0,892	0,970	Do Not Test
T15d vs. T21d	0,100	5	0,892	0,970	Do Not Test

Comparisons for factor: **Dias within T2**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0,05</b>
T21d vs. T0d	0,400	5	3,570	0,085	No
T21d vs. T10d	0,200	5	1,785	0,715	Do Not Test
T21d vs. T5d	0,200	5	1,785	0,715	Do Not Test
T21d vs. T15d	0,100	5	0,892	0,970	Do Not Test
T15d vs. T0d	0,300	5	2,677	0,321	Do Not Test
T15d vs. T10d	0,1000	5	0,892	0,970	Do Not Test
T15d vs. T5d	0,1000	5	0,892	0,970	Do Not Test
T5d vs. T0d	0,200	5	1,785	0,715	Do Not Test
T5d vs. T10d	0,000	5	0,000	1,000	Do Not Test
T10d vs. T0d	0,200	5	1,785	0,715	Do Not Test

Comparisons for factor: **Dias within T3**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0,05</b>
T10d vs. T5d	0,300	5	2,677	0,321	No
T10d vs. T0d	0,200	5	1,785	0,715	Do Not Test
T10d vs. T21d	0,000	5	0,000	1,000	Do Not Test
T10d vs. T15d	0,000	5	0,000	1,000	Do Not Test
T15d vs. T5d	0,300	5	2,677	0,321	Do Not Test
T15d vs. T0d	0,200	5	1,785	0,715	Do Not Test
T15d vs. T21d	0,000	5	0,000	1,000	Do Not Test
T21d vs. T5d	0,300	5	2,677	0,321	Do Not Test
T21d vs. T0d	0,200	5	1,785	0,715	Do Not Test
T0d vs. T5d	0,1000	5	0,892	0,970	Do Not Test

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.

**Anexo 02** - Teste estatístico Anova – Tukey nível 5% significancia – Dias/ Tratamento/ Formigas.

Dependent Variable: Formigas

**Normality Test:** Failed ( $P < 0,050$ )

**Equal Variance Test:** Failed ( $P < 0,050$ )

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Dias	4	48,330	12,083	11,159	<0,001
Tratamento	3	4,695	1,565	1,445	0,231
Dias x Tratamento	12	31,830	2,652	2,450	0,006
Residual	180	194,900	1,083		
Total	199	279,755	1,406		

Main effects cannot be properly interpreted if significant interaction is determined. This is because the size of a factor's effect depends upon the level of the other factor.

The effect of different levels of Dias depends on what level of Tratamento is present. There is a statistically significant interaction between Dias and Tratamento. ( $P = 0,006$ )

Power of performed test with  $\alpha = 0,0500$ : for Dias : 1,000

Power of performed test with  $\alpha = 0,0500$ : for Tratamento : 0,134

Power of performed test with  $\alpha = 0,0500$ : for Dias x Tratamento : 0,773

Least square means for Dias :

**Group Mean**

T0d 1,825

T5d 2,875

T10d 2,975

T15d 3,050

T21d 3,200

Std Err of LS Mean = 0,165

Least square means for Tratamento :

**Group Mean**

Co 2,540

T1 2,840

T2 2,960

T3 2,800

Std Err of LS Mean = 0,147

Least square means for Dias x Tratamento :

**Group Mean**

T0d x Co 2,100

T0d x T1 1,700

T0d x T2 1,700

T0d x T3 1,800

T5d x Co 2,000

T5d x T1 3,000

T5d x T2 3,700

T5d x T3 2,800

T10d x Co 2,000

T10d x T1 3,700

T10d x T2 3,200

T10d x T3 3,000

T15d x Co 3,500

T15d x T1 2,800

T15d x T2 3,100

T15d x T3 2,800

T21d x Co 3,100

T21d x T1 3,000

T21d x T2 3,100

T21d x T3 3,600

Std Err of LS Mean = 0,329

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: **Dias**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0,050</b>
T21d vs. T0d	1,375	5	8,357	<0,001	Yes
T21d vs. T5d	0,325	5	1,975	0,630	No
T21d vs. T10d	0,225	5	1,368	0,870	Do Not Test
T21d vs. T15d	0,150	5	0,912	0,968	Do Not Test
T15d vs. T0d	1,225	5	7,446	<0,001	Yes
T15d vs. T5d	0,175	5	1,064	0,944	Do Not Test
T15d vs. T10d	0,0750	5	0,456	0,998	Do Not Test
T10d vs. T0d	1,150	5	6,990	<0,001	Yes
T10d vs. T5d	0,100	5	0,608	0,993	Do Not Test
T5d vs. T0d	1,050	5	6,382	<0,001	Yes

Comparisons for factor: **Tratamento**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0,050</b>
T2 vs. Co	0,420	4	2,854	0,181	No
T2 vs. T3	0,160	4	1,087	0,869	Do Not Test
T2 vs. T1	0,120	4	0,815	0,939	Do Not Test
T1 vs. Co	0,300	4	2,039	0,473	Do Not Test
T1 vs. T3	0,0400	4	0,272	0,997	Do Not Test
T3 vs. Co	0,260	4	1,767	0,595	Do Not Test

Comparisons for factor: **Tratamento within T0d**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0,05</b>
Co vs. T2	0,400	4	1,216	0,826	No
Co vs. T1	0,400	4	1,216	0,826	Do Not Test
Co vs. T3	0,300	4	0,912	0,917	Do Not Test
T3 vs. T2	0,100	4	0,304	0,996	Do Not Test
T3 vs. T1	0,100	4	0,304	0,996	Do Not Test
T1 vs. T2	0,000	4	0,000	1,000	Do Not Test

Comparisons for factor: **Tratamento within T5d**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0,05</b>
T2 vs. Co	1,700	4	5,166	0,001	Yes
T2 vs. T3	0,900	4	2,735	0,214	No
T2 vs. T1	0,700	4	2,127	0,435	Do Not Test
T1 vs. Co	1,000	4	3,039	0,138	No
T1 vs. T3	0,200	4	0,608	0,973	Do Not Test
T3 vs. Co	0,800	4	2,431	0,314	Do Not Test

Comparisons for factor: **Tratamento within T10d**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0,05</b>
T1 vs. Co	1,700	4	5,166	0,001	Yes
T1 vs. T3	0,700	4	2,127	0,435	No
T1 vs. T2	0,500	4	1,519	0,705	Do Not Test
T2 vs. Co	1,200	4	3,647	0,049	Yes
T2 vs. T3	0,200	4	0,608	0,973	Do Not Test
T3 vs. Co	1,000	4	3,039	0,138	No

Comparisons for factor: **Tratamento within T15d**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0,05</b>
Co vs. T3	0,700	4	2,127	0,435	No
Co vs. T1	0,700	4	2,127	0,435	Do Not Test
Co vs. T2	0,400	4	1,216	0,826	Do Not Test
T2 vs. T3	0,300	4	0,912	0,917	Do Not Test
T2 vs. T1	0,300	4	0,912	0,917	Do Not Test
T1 vs. T3	0,000	4	0,000	1,000	Do Not Test

Comparisons for factor: **Tratamento within T21d**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0,05</b>
T3 vs. T1	0,600	4	1,823	0,570	No
T3 vs. T2	0,500	4	1,519	0,705	Do Not Test
T3 vs. Co	0,500	4	1,519	0,705	Do Not Test
Co vs. T1	0,100	4	0,304	0,996	Do Not Test
Co vs. T2	0,000	4	0,000	1,000	Do Not Test
T2 vs. T1	0,100	4	0,304	0,996	Do Not Test

Comparisons for factor: **Dias within Co**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0,05</b>
T15d vs. T10d	1,500	5	4,558	0,011	Yes
T15d vs. T5d	1,500	5	4,558	0,011	Yes
T15d vs. T0d	1,400	5	4,255	0,022	Yes
T15d vs. T21d	0,400	5	1,216	0,912	No
T21d vs. T10d	1,100	5	3,343	0,125	No
T21d vs. T5d	1,100	5	3,343	0,125	Do Not Test
T21d vs. T0d	1,000	5	3,039	0,200	Do Not Test
T0d vs. T10d	0,100	5	0,304	1,000	Do Not Test
T0d vs. T5d	0,100	5	0,304	1,000	Do Not Test
T5d vs. T10d	0,000	5	0,000	1,000	Do Not Test

Comparisons for factor: **Dias within T1**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0,05</b>
T10d vs. T0d	2,000	5	6,078	<0,001	Yes
T10d vs. T15d	0,900	5	2,735	0,299	No
T10d vs. T21d	0,700	5	2,127	0,560	Do Not Test
T10d vs. T5d	0,700	5	2,127	0,560	Do Not Test
T5d vs. T0d	1,300	5	3,951	0,042	Yes
T5d vs. T15d	0,200	5	0,608	0,993	Do Not Test
T5d vs. T21d	0,000	5	0,000	1,000	Do Not Test
T21d vs. T0d	1,300	5	3,951	0,042	Yes
T21d vs. T15d	0,200	5	0,608	0,993	Do Not Test
T15d vs. T0d	1,100	5	3,343	0,125	No

Comparisons for factor: **Dias within T2**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0,05</b>
T5d vs. T0d	2,000	5	6,078	<0,001	Yes
T5d vs. T21d	0,600	5	1,823	0,698	No

T5d vs. T15d	0,600	5	1,823	0,698	Do Not Test
T5d vs. T10d	0,500	5	1,519	0,820	Do Not Test
T10d vs. T0d	1,500	5	4,558	0,011	Yes
T10d vs. T21d	0,100	5	0,304	1,000	Do Not Test
T10d vs. T15d	0,100	5	0,304	1,000	Do Not Test
T15d vs. T0d	1,400	5	4,255	0,022	Yes
T15d vs. T21d	0,000	5	0,000	1,000	Do Not Test
T21d vs. T0d	1,400	5	4,255	0,022	Yes

Comparisons for factor: **Dias within T3**

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,05
T21d vs. T0d	1,800	5	5,470	0,001	Yes
T21d vs. T15d	0,800	5	2,431	0,422	No
T21d vs. T5d	0,800	5	2,431	0,422	Do Not Test
T21d vs. T10d	0,600	5	1,823	0,698	Do Not Test
T10d vs. T0d	1,200	5	3,647	0,074	No
T10d vs. T15d	0,200	5	0,608	0,993	Do Not Test
T10d vs. T5d	0,200	5	0,608	0,993	Do Not Test
T5d vs. T0d	1,000	5	3,039	0,200	Do Not Test
T5d vs. T15d	0,000	5	0,000	1,000	Do Not Test
T15d vs. T0d	1,000	5	3,039	0,200	Do Not Test

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.

**Anexo 03** - Teste estatístico Anova – Tukey nível 5% significância – Dias/ Tratamento/ Aparência do fungo.

Dependent Variable: Aparência fungo

**Normality Test:** Failed (P < 0,050)

**Equal Variance Test:** Failed ( $P < 0,050$ )

<b>Source of Variation</b>	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>P</b>
Dias	4	196,000	49,000	22,797	<0,001
Tratamento	3	127,055	42,352	19,704	<0,001
Dias x Tratamento	12	94,920	7,910	3,680	<0,001
Residual	180	386,900	2,149		
Total	199	804,875	4,045		

Main effects cannot be properly interpreted if significant interaction is determined. This is because the size of a factor's effect depends upon the level of the other factor.

The effect of different levels of Dias depends on what level of Tratamento is present. There is a statistically significant interaction between Dias and Tratamento. ( $P = <0,001$ )

Power of performed test with  $\alpha = 0,0500$ : for Dias : 1,000

Power of performed test with  $\alpha = 0,0500$ : for Tratamento : 1,000

Power of performed test with  $\alpha = 0,0500$ : for Dias x Tratamento : 0,982

Least square means for Dias :

**Group Mean**

T0d 1,200

T5d 3,250

T10d 2,900

T15d 3,800

T21d 3,975

Std Err of LS Mean = 0,232

Least square means for Tratamento :

**Group Mean**

Co 1,680

T1 3,620

T2 3,180

T3 3,620

Std Err of LS Mean = 0,207

Least square means for Dias x Tratamento :

**Group Mean**

T0d x Co 1,600

T0d x T1 1,000

T0d x T2 1,200

T0d x T3 1,000

T5d x Co 2,100

T5d x T1 4,200

T5d x T2 3,000

T5d x T3 3,700

T10d x Co 2,000

T10d x T1 2,800

T10d x T2 3,200

T10d x T3 3,600

T15d x Co 1,400

T15d x T1 4,900

T15d x T2 4,300

T15d x T3 4,600

T21d x Co 1,300

T21d x T1 5,200

T21d x T2 4,200

T21d x T3 5,200

Std Err of LS Mean = 0,464

II Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: **Tratamento within T0d**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0,05</b>
Co vs. T3	0,600	4	1,294	0,797	No
Co vs. T1	0,600	4	1,294	0,797	Do Not Test
Co vs. T2	0,400	4	0,863	0,929	Do Not Test

T2 vs. T3	0,200	4	0,431	0,990	Do Not Test
T2 vs. T1	0,200	4	0,431	0,990	Do Not Test
T1 vs. T3	0,000	4	0,000	1,000	Do Not Test

Comparisons for factor: **Tratamento within T5d**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0,05</b>
T1 vs. Co	2,100	4	4,530	0,007	Yes
T1 vs. T2	1,200	4	2,588	0,259	No
T1 vs. T3	0,500	4	1,078	0,871	Do Not Test
T3 vs. Co	1,600	4	3,451	0,070	No
T3 vs. T2	0,700	4	1,510	0,709	Do Not Test
T2 vs. Co	0,900	4	1,941	0,517	Do Not Test

Comparisons for factor: **Tratamento within T10d**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0,05</b>
T3 vs. Co	1,600	4	3,451	0,070	No
T3 vs. T1	0,800	4	1,726	0,614	Do Not Test
T3 vs. T2	0,400	4	0,863	0,929	Do Not Test
T2 vs. Co	1,200	4	2,588	0,259	Do Not Test
T2 vs. T1	0,400	4	0,863	0,929	Do Not Test
T1 vs. Co	0,800	4	1,726	0,614	Do Not Test

Comparisons for factor: **Tratamento within T15d**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0,05</b>
T1 vs. Co	3,500	4	7,549	<0,001	Yes
T1 vs. T2	0,600	4	1,294	0,797	No
T1 vs. T3	0,300	4	0,647	0,968	Do Not Test
T3 vs. Co	3,200	4	6,902	<0,001	Yes
T3 vs. T2	0,300	4	0,647	0,968	Do Not Test
T2 vs. Co	2,900	4	6,255	<0,001	Yes

Comparisons for factor: **Tratamento within T21d**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0,05</b>
T1 vs. Co	3,900	4	8,412	<0,001	Yes

T1 vs. T2	1,000	4	2,157	0,422	No
T1 vs. T3	0,000	4	0,000	1,000	Do Not Test
T3 vs. Co	3,900	4	8,412	<0,001	Yes
T3 vs. T2	1,000	4	2,157	0,422	Do Not Test
T2 vs. Co	2,900	4	6,255	<0,001	Yes

Comparisons for factor: **Dias within Co**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0,05</b>
T5d vs. T21d	0,800	5	1,726	0,740	No
T5d vs. T15d	0,700	5	1,510	0,823	Do Not Test
T5d vs. T0d	0,500	5	1,078	0,941	Do Not Test
T5d vs. T10d	0,100	5	0,216	1,000	Do Not Test
T10d vs. T21d	0,700	5	1,510	0,823	Do Not Test
T10d vs. T15d	0,600	5	1,294	0,891	Do Not Test
T10d vs. T0d	0,400	5	0,863	0,974	Do Not Test
T0d vs. T21d	0,300	5	0,647	0,991	Do Not Test
T0d vs. T15d	0,200	5	0,431	0,998	Do Not Test
T15d vs. T21d	0,1000	5	0,216	1,000	Do Not Test

Comparisons for factor: **Dias within T1**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0,05</b>
T21d vs. T0d	4,200	5	9,059	<0,001	Yes
T21d vs. T10d	2,400	5	5,177	0,002	Yes
T21d vs. T5d	1,000	5	2,157	0,546	No
T21d vs. T15d	0,300	5	0,647	0,991	Do Not Test
T15d vs. T0d	3,900	5	8,412	<0,001	Yes
T15d vs. T10d	2,100	5	4,530	0,012	Yes
T15d vs. T5d	0,700	5	1,510	0,823	Do Not Test
T5d vs. T0d	3,200	5	6,902	<0,001	Yes
T5d vs. T10d	1,400	5	3,020	0,205	No
T10d vs. T0d	1,800	5	3,882	0,048	Yes

Comparisons for factor: **Dias within T2**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0,05</b>
T15d vs. T0d	3,100	5	6,686	<0,001	Yes
T15d vs. T5d	1,300	5	2,804	0,274	No
T15d vs. T10d	1,100	5	2,373	0,448	Do Not Test
T15d vs. T21d	0,1000	5	0,216	1,000	Do Not Test
T21d vs. T0d	3,000	5	6,471	<0,001	Yes
T21d vs. T5d	1,200	5	2,588	0,356	Do Not Test
T21d vs. T10d	1,000	5	2,157	0,546	Do Not Test
T10d vs. T0d	2,000	5	4,314	0,019	Yes
T10d vs. T5d	0,200	5	0,431	0,998	Do Not Test
T5d vs. T0d	1,800	5	3,882	0,048	Yes

Comparisons for factor: **Dias within T3**

<b>Comparison</b>	<b>Diff of Means</b>	<b>p</b>	<b>q</b>	<b>P</b>	<b>P&lt;0,05</b>
T21d vs. T0d	4,200	5	9,059	<0,001	Yes
T21d vs. T10d	1,600	5	3,451	0,105	No
T21d vs. T5d	1,500	5	3,235	0,149	Do Not Test
T21d vs. T15d	0,600	5	1,294	0,891	Do Not Test
T15d vs. T0d	3,600	5	7,765	<0,001	Yes
T15d vs. T10d	1,000	5	2,157	0,546	Do Not Test
T15d vs. T5d	0,900	5	1,941	0,645	Do Not Test
T5d vs. T0d	2,700	5	5,824	<0,001	Yes
T5d vs. T10d	0,100	5	0,216	1,000	Do Not Test
T10d vs. T0d	2,600	5	5,608	<0,001	Yes

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.