



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE ENGENHARIA FLORESTAL
Programa de Pós Graduação em Ciências Florestais e Ambientais

**EXTRATOS VEGETAIS – EFEITOS SOBRE O
DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DO FUNGO SIMBIONTE E
NA LONGEVIDADE DE OPERÁRIAS DE *Atta sexdens*
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**

MARCELO DIAS DE SOUZA

CUIABÁ-MT
2012

MARCELO DIAS DE SOUZA

**EXTRATOS VEGETAIS – EFEITOS SOBRE O
DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DO FUNGO SIMBIONTE E
NA LONGEVIDADE DE OPERÁRIAS DE *Atta sexdens*
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**

Orientador: Prof. Dr. Otávio Peres Filho

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Mato Grosso, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Ciências Florestais e Ambientais para obtenção do título de mestre.

CUIABÁ-MT
2012

FICHA CATALOGRÁFICA

S729e

Souza, Marcelo Dias de.

Extratos vegetais: efeitos sobre o desenvolvimento *in vitro* do fungo simbiote e na longevidade de operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera : Formicidae) / Marcelo Dias de Souza. – 2012.
x, 56 f. : il. color.

Orientador: Prof. Dr. Otávio Peres Filho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Engenharia Florestal, Pós-Graduação em Ciências Florestais e Ambientais, 2012.

Bibliografia: f. 47-56.

1. Extratos vegetais – Insetos. 2. Formigas cortadeiras – Extratos vegetais. 3. Fungo simbiote – Extratos vegetais. 4. Formigas – Dieta artificial. 5. Espécies florestais – Insetos pragas. I. Título.

CDU – 630*45:632.796

Ficha elaborada por: Rosângela Aparecida Vicente Söhn – CRB-1/931

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE ENGENHARIA FLORESTAL
Programa de Pós Graduação em Ciências Florestais e Ambientais

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Extratos vegetais – efeitos sobre o desenvolvimento *in vitro* do fungo simbiote e na longevidade de operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae).

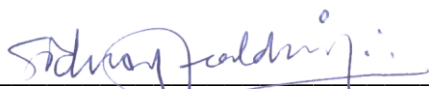
Autor: Marcelo Dias de Souza

Orientador: Otávio Peres Filho

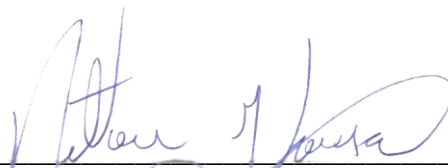
Co-orientador: Sidney Fernando Caldeira

APROVADA EM: 24 de fevereiro de 2012

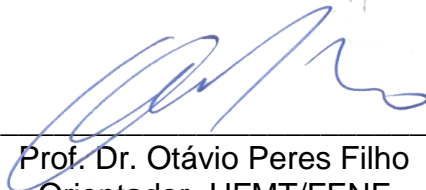
Comissão examinadora:



Prof. Dr. Sidney Fernando Caldeira
UFMT/FENF



Prof. Dr. Nilton José Sousa
UFPR/FUPEF



Prof. Dr. Otávio Peres Filho
Orientador- UFMT/FENF

CUIABÁ-MT
2012

DEDICO

Primeiramente a Deus, que me concedeu cada dia de minha vida, a minha família, meus pais **Angela Batista de Souza e Piuilson Carlos Dias de Souza**, que me educaram e me deram forças para seguir meus objetivos e completá-los com muita responsabilidade, também a minha irmã **Patrícia Batista Dias de Souza** por estar sempre ao meu lado. Aos meus avós e tios, pelo apoio, incentivo e motivação nas dificuldades dos meus estudos.

A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização desta etapa importante na minha vida, em especial, os colegas e amigos da 5^o turma de mestrado em Ciências Florestais e Ambientais - UFMT, pela amizade e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Mato Grosso, a Faculdade de Engenharia Florestal, pela oportunidade e apoio para a conclusão do curso de Mestrado em Ciências Florestais e Ambientais.

Ao professor Dr. Otávio Peres Filho, pela orientação nesse trabalho, pelo companheirismo e afeto que demonstrou nos decorrer dos anos de Graduação e Pós Graduação.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

Ao professor Dr. Sidney Fernando Caldeira pela Co-orientação e pela devida atenção dada a este trabalho sempre que requisitado.

Ao professor Dr. Alberto Dorval pela força, participação no trabalho e ajuda sempre que necessitei e sempre com total disposição.

Ao Prof. Dr. Zenésio Finger pela identificação das espécies florestais utilizadas neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Nilton José Sousa, por se disponibilizar na correção e auxiliar na confecção dessa dissertação, participando da defesa.

Aos Técnicos de laboratório, Sr. Manoel Lauro da Silva e Marcio Antônio Leão Pereira pela ajuda no transcorrer deste trabalho e pelo companheirismo dado no decorrer dos anos.

Ao professor Dr. Marcio do Nascimento Ferreira, pela ajuda e confiança que me deu, desde quando me aceitou como monitor de sua disciplina até os dias de hoje e pelo incentivo dado todos esses anos na Graduação e Pós Graduação.

Ao Companheiro Pedro Paulo Celestino Câmara pela a ajuda concedida nas execuções dos experimentos.

Aos meus amigos de Pós Graduação Rener Ribeiro Fernandes, Allan Libanio Pelissari, Joílson Onofre Junior, Luiz Thiago Castilho Cruz, Luciano Rodrigo Lanssanova pelo companheirismo nos momentos de alegria, descontração e de preocupação no decorrer dos anos do curso de Graduação e Pós Graduação.

SUMÁRIO

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. IMPORTÂNCIA DAS FORMIGAS CORTADEIRAS PARA AS FLORESTAS PLANTADAS	3
2.2. IMPORTÂNCIA DAS FOLHAS DAS ÁRVORES PARA AS FORMIGAS CORTADEIRAS E SEU FUNGO SIMBIONTE	4
2.3. FORRAGEAMENTO E PREFERÊNCIA DAS FORMIGAS CORTADEIRAS POR ESPÉCIES FLORESTAIS	6
2.4. MÉTODOS DE CONTROLE DE FORMIGAS CORTADEIRAS	8
2.5. EFICIÊNCIA DOS EXTRATOS VEGETAIS NO CONTROLE DE ALGUNS INSETOS	9
2.6. CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. COLETA DO FUNGO SIMBIONTE	15
3.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	16
3.3. INSTALAÇÃO DOS ENSAIOS	17
3.3.1. Experimento 1: Extratos Vegetais no Desenvolvimento <i>in vitro</i> do Fungo Simbionte	17
3.3.2. Experimento 2: Extratos Vegetais em Diferentes Proporções no Desenvolvimento <i>in vitro</i> do Fungo Simbionte	18
3.3.3. Experimento 3: Extratos Vegetais na sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens</i> através de ingestão	19
3.4. COLETA DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
3.4.1. Extratos Vegetais no Desenvolvimento <i>in vitro</i> do Fungo Simbionte e Extratos Vegetais em Diferentes Proporções no Desenvolvimento <i>in vitro</i> do Fungo Simbionte	20
3.4.1.1. Análise multivariada de agrupamento de dados	21
3.4.1.2. Análise de regressão	22
3.4.2. Extratos Vegetais na Sobrevivência de Operárias de <i>Atta sexdens</i> Através de Ingestão	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1. ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO DO FUNGO	24
4.2. EFEITO DOS EXTRATOS VEGETAIS NO DESENVOLVIMENTO <i>IN VITRO</i> DO FUNGO SIMBIONTE	26
4.2.1. Análise Multivariada de Agrupamento de Dados	30
4.2.2. Análise de Regressão	31
4.3. EFEITO DOS EXTRATOS VEGETAIS EM DIFERENTES PROPORÇÕES NO DESENVOLVIMENTO <i>IN VITRO</i> DO FUNGO SIMBIONTE	34
4.4. EFEITO DOS EXTRATOS VEGETAIS NA SOBREVIVÊNCIA DE OPERÁRIAS DE <i>Atta sexdens</i> ATRAVÉS DE INGESTÃO	41
5. CONCLUSÕES	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

Lista de Tabelas

TABELA 1	ESPÉCIES VEGETAIS USADAS NA OBTENÇÃO DE EXTRATO FOLIAR AQUOSO	16
TABELA 2	VALORES DE pH DO MEIO BDA, DO EXTRATO VEGETAL, DA MISTURA DO BDA COM O EXTRATO APÓS A CORREÇÃO, DA MISTURA APÓS A AUTOCLAVAGEM E SUA VARIAÇÃO EM RELAÇÃO AO BDA ANTES DA AUTOCLAVAGEM, UTILIZADO COMO SUBSTRATO PARA O CRESCIMENTO DO FUNGO <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	26
TABELA 3	CRESCIMENTO MÉDIO (mm), DO FUNGO <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> CULTIVADO EM MEIO DE CULTURA COM DIFERENTES EXTRATOS VEGETAIS, EM SEIS PERÍODOS DE AVALIAÇÃO	28
TABELA 4	COEFICIENTES E ESTATÍSTICAS DO MODELO DE CHAPMAN-RICHARDS PARA A ESTIMATIVA DO CRESCIMENTO <i>IN VITRO</i> DO FUNGO <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> NOS DIFERENTES EXTRATOS VEGETAIS	31
TABELA 5	VALORES DE pH DO MEIO BDA, DA MISTURA DO BDA COM O EXTRATO (E) APÓS A CORREÇÃO E APÓS A AUTOCLAVAGEM E A RESPECTIVA VARIAÇÃO NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS DAS ESPÉCIES UTILIZADAS NO DESENVOLVIMENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	35
TABELA 6	CRESCIMENTO MÉDIO (mm) DE <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> EM SEIS PERÍODOS DE INCUBAÇÃO, CULTIVADO EM TRÊS PROPORÇÕES DE EXTRATOS VEGETAIS	38
TABELA 7	CRESCIMENTO MÉDIO (mm), DE <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> APÓS 42 DIAS DE INCUBAÇÃO EM MEIO DE CULTURA COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE EXTRATOS VEGETAIS	40
TABELA 8	PERCENTUAL DE MORTALIDADE E M_{50} DAS FORMIGAS CORTADEIRAS FORNECIDA DIARIAMENTE COM DIETA À BASE DE EXTRATOS VEGETAIS	44

Lista de Figuras

FIGURA 1	FOTOMICROGRAFIAS DE LUZ DO JARDIM DE FUNGO DE <i>Atta sexdens rubropilosa</i> . (A) REGIÃO RICA EM ESTÁFILAS (SETAS). (B) DETALHE DA REGIÃO DE ESTÁFILAS (SETAS). (C) DETALHE DO EXSUDATO DAS HIFAS (SETA). (D) DETALHE DA ESTÁFILA REVELANDO OS GONGILÍDEOS CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO FUNGO SIMBIONTE (SETAS)	12
FIGURA 2	DEMONSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM MODELO DE SAUVEIRO ARTIFICIAL, PARA MANUTENÇÃO DAS FORMIGAS CORTADEIRAS E DO FUNGO SIMBIONTE	15
FIGURA 3	PLACA DE PETRI UTILIZADA PARA RETIRADA DOS DISCOS DE MICÉLIO COM UM VAZADOR DE 5mm PARA AS OPERAÇÕES DE INOCULAÇÃO E DE REPICAGEM DO FUNGO SIMBIONTE	18
FIGURA 4	PLACA DE PETRI TRAÇADA COM DUAS RETAS PERPENDICULARES COM O MICÉLIO DO FUNGO EM DESENVOLVIMENTO	21
FIGURA 5	(A) FUNGOS E BACTÉRIAS CONSIDERADOS COMO CONTAMINANTES, CRESCENDO NO MEIO DE CULTURA E (B) MEIO DESIDRATADO APRESENTANDO RACHADURAS	24
FIGURA 6	GONGILÍDEOS E HIFAS DO FUNGO SIMBIONTE DE <i>Atta sexdens</i> ISOLADO NO LABORATÓRIO (AUMENTO DE 400 X)	25
FIGURA 7	DENDROGRAMA DA ANÁLISE DE AGRUPAMENTO PELO MÉTODO DA LIGAÇÃO MÉDIA NOS DIFERENTES EXTRATOS FLORESTAIS	30
FIGURA 8	CURVAS DE CRESCIMENTO DO FUNGO <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> EM DIFERENTES EXTRATOS FLORESTAIS ESTIMADOS PELO MODELO DE CHAPMAN-RICHARDS	32
FIGURA 9	MICÉLIO DE <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> AOS 42 DIAS DE INCUBAÇÃO EM MEIO DE CULTURA ACRESCIDO COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE EXTRATOS VEGETAIS DE (A) SERINGUEIRA E DE (B) MOGNO	37
FIGURA 10	MORTALIDADE DE OPERÁRIAS DE <i>Atta sexdens rubropilosa</i> ALIMENTADAS COM DIETA ARTIFICIAL À BASE DE DIFERENTES EXTRATOS VEGETAIS	42
FIGURA 11	DIETA ARTIFICIAL RECOLHIDA DAS PLACAS APOS 24H, (A) DIETA CONTENDO EXTRATO DE CEDRO E (B) DIETA NAS CONDIÇÕES DE CONTROLE	43

RESUMO

SOUZA, M. D. **Extratos vegetais – efeitos sobre o desenvolvimento *in vitro* do fungo simbiote e na longevidade de operárias de *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae)**. 2012. Dissertação - Programa de Pós Graduação em Ciências Florestais e Ambientais - Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá – MT. Orientador: Prof. Dr. Otávio Peres Filho.

O presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos de diferentes extratos vegetais em operárias de *Atta sexdens*, através de alimentação fornecida em dietas e no desenvolvimento *in vitro* do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* em diferentes proporções. O experimento foi realizado no Laboratório de Patologia Florestal da Faculdade de Engenharia Florestal (FENF) da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT). O fungo e as formigas foram coletados em formigueiros presentes no campus de Cuiabá. O fungo foi inoculado no meio BDA acrescidos com os extratos vegetais em diferentes proporções, em placas de Petri. As placas foram mantidas em câmaras climatizadas do tipo BOD em temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ no escuro, por um período de 42 dias. O crescimento do fungo foi avaliado semanalmente através do diâmetro da colônia. As formigas foram colocadas em placas de Petri (100mm x 15mm) e mantidas em sala climatizada a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, sendo as placas forradas com papel filtro, contendo dez formigas/placa na qual as formigas foram mantidas com dietas artificiais contendo extratos vegetais e a cada 24h era verificado o número de formigas mortas por placa. O fungo simbiote apresenta um crescimento diferenciado em relação aos extratos fornecido nas placas, sendo que os meios acrescidos com os extratos à base de *Physocalymma scaberrimum* (aricá), *Amburana acreana* (cerejeira), *Cedrela fissilis* (cedro), *Magonia pubescens* (timbó), *Leucaena leucocephala* (leucena) e *Swietenia macrophylla* (mogno) prejudicam o desenvolvimento do fungo, mesmo em baixas concentrações. As formigas cortadeiras podem sobreviver por até nove dias sem presença de água ou alimento, e o seu fornecimento aumenta para 18 dias o período de sobrevivência, entretanto a adição dos extratos vegetais nas dietas diminui significativamente a sobrevivência, sendo a maior mortalidade obtida nas dietas acrescidas com extratos à base de timbó.

Palavras-chave: Dieta artificial, formigas cortadeiras, simbiose, *Leucoagaricus gongylophorus*.

ABSTRACT

SOUZA, M. D. **Effect of plant extracts in workers of *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) *in vitro* and in the development of symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* Möller (Singer) 2012.** Dissertation - (master's program Forest and Environmental Sciences) Federal University of Mato Grosso, Cuiabá – MT.

The objective this study was analyze the effects of different plant extracts on workers of *Atta sexdens* by powering supplied in diet and in the *in vitro* development of symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* in different concentrations. The experiment was conducted in the Pathology Forest Laboratory of college of Forestry (FENF) Federal University of Mato Grosso (UFMT). The fungus and the ants were collected from nests presents in the campus of Cuiabá. The fungus was inoculated in the media PDA added with the plant extracts in different proportions, in dishes Petri. The dishes were kept in climatic chambers of type BOD at temperature of 25 ± 1 °C in the dark, for a period of 42 days. The fungal growth was measured weekly by the diameter of the colony. The ants were placed in Petri dishes (100mm x 15mm) and maintained in a climatic room at 26 ± 1 °C, being the dishes lined with filter paper, containing ten ants/dishes in which the ants were maintained with artificial diets containing plant extracts and, which was checked every 24 hours the number of dead ants per dishes. The symbiotic fungus has a differently growth in relation to the extracts provided in the dishes, being the media added with the extracts of *Physocalymma scaberrimum*, *Amburana acreana*, *Cedrela fissilis*, *Magonia pubescens*, *Leucaena leucocephala* and *Swietenia macrophylla* inhibit the fungal growth, even at low concentrations. The leaf-cutter ants may survive for up to nine days without the presence of water or diet, and with its supply increases for 18 days the survival period, however the added of plant extracts in the diets decreases significantly the survival, being the highest mortality obtained in the diets increased with extracts of *M. pubescens*.

Key-words: Artificial diet, leaf-cutter ants, *Leucoagaricus gongylophorus*, symbiosis.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a atividade florestal é de grande importância, não só pela extensa cobertura de florestas existente no País, mas também pela capacidade de geração de emprego e renda do setor. A cobertura florestal do território brasileiro, associada às excelentes condições edafoclimáticas (solo e clima) para a silvicultura, confere ao País grandes vantagens para o setor agrícola e florestal, o que acarreta no aumento da produção de produtos nesses setores. A crescente demanda por produtos de origem florestal tem levado à conversão de áreas nativas para florestas cultivadas, como florestas plantadas com eucalipto, pinus e teca, entre outras espécies florestais, o que favorece o surgimento de insetos praga, em razão da redução da biodiversidade do local reflorestado.

Entre os insetos pragas associados a essas plantações, as formigas cortadeiras destacam-se pelo potencial de danos, causando sucessivos desfolhamento e mortalidade de mudas e árvores adultas. O ataque realizado pelas formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* é comum em áreas reflorestadas, podendo ocorrer danos em qualquer fase de desenvolvimento do vegetal. Esses danos são ocasionados por cortes de folhas, brotos, ramos finos e flores, que são carregados para o interior de ninhos subterrâneos e usados como substrato para manutenção do fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, (Möller) Singer, 1986. Um motivo que pode explicar a seletividade no corte das espécies vegetais pode estar relacionado com a exigência nutricional do fungo simbiote.

A associação entre as formigas cortadeiras e o fungo simbiote é obrigatória, de tal forma que nenhum dos simbiossões poderiam sobreviver isoladamente, pois as formigas inoculam o fungo sobre o material vegetal e previnem o crescimento de microorganismos contaminantes, que podem comprometer seu desenvolvimento (HOLLDOBLER e WILSON, 1990). Para que o formigueiro esteja sempre em atividade e garanta a sobrevivência dos seus indivíduos, as formigas

necessitam constantemente cortar os vegetais, ocasionando grandes prejuízos às plantações agrícolas e florestais.

Devido à importância que as formigas exercem ao causar danos aos vegetais e pela complexa simbiose com o fungo *L. gongylophorus*, alguns autores têm realizado trabalhos visando fornecer subsídios sobre toxicidade ou benefícios no desenvolvimento do fungo simbiote. O cultivo *in vitro* é um método utilizado para conhecer melhor o desenvolvimento do fungo simbiote, porém o comportamento desse fungo é complexo e de difícil entendimento, já que apresenta um crescimento diferente e lento em condições de laboratório, quando comparados às condições naturais encontradas em formigueiros.

Como as formigas utilizam substratos vegetais para a manutenção do fungo simbiote, alguns autores têm adicionado extratos vegetais em meios de cultura com o objetivo de conseguir uma inibição ou um rápido crescimento no desenvolvimento *in vitro*. De acordo com Siqueira et al. (1998), o fungo simbiote dessas formigas cresce eficientemente em componentes encontrados nas folhas das árvores, como amido e xilana, sendo esses polissacarídeos, quando metabolizados pelo fungo, são importantes fontes de carbono para a dieta das formigas, porém podem também ser afetado pela ação das substâncias secundárias encontrados nos vegetais, que podem ser tóxicas.

É possível a obtenção de novas formas de produtos com ação inseticida partindo da extração de compostos originados dos metabólitos secundários presentes em algumas plantas, pois estes podem ser prejudiciais às formigas cortadeiras e/ou ao seu fungo simbiote. Nesse contexto o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes extratos vegetais no desenvolvimento *in vitro* do fungo simbiote *L. gongylophorus* e na sobrevivência de operárias de *Atta sexdens* fornecidos em dietas artificiais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. IMPORTÂNCIA DAS FORMIGAS CORTADEIRAS PARA AS FLORESTAS PLANTADAS

As formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* são consideradas pragas de grande importância nas regiões tropicais das Américas. A capacidade de colonização e forrageamento dessas formigas aliada, principalmente, ao ambiente que sofreu desequilíbrio ecológico provocado pelo desmatamento e implantação de monoculturas, propiciam condições ideais para o estabelecimento e a proliferação das colônias, favorecendo também o aumento da densidade populacional (CHERRETT, 1986; DELLA LUCIA e FOWLER, 1993). Estes insetos necessitam do material de origem vegetal, pois servem de substrato para o crescimento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* (Möller) Singer (Agaricales: Agaricaceae) que é uma de suas principais fontes de alimento (QUINLAN e CHERRETT, 1979).

Desta forma, embora sejam primariamente fungívoras, as formigas exercem um papel ecológico de herbívoros polifágicos. Garcia et al. (2003) reportaram que *Atta sexdens* cortam folhas de várias espécies de plantas, contudo possuem clara preferência por algumas espécies. Assim as formigas cortadeiras, de uma maneira geral são consideradas pragas na agricultura por atacarem muitas plantas cultivadas (CARLOS, 2008). Para Zanetti et al. (2002), o ataque realizado por formigas cortadeiras é intensivo e constante, podendo ocorrer danos em qualquer fase do desenvolvimento da planta, ocasionados por cortes de folhas, brotos, ramos finos e flores, os quais são carregados para o interior de ninhos subterrâneos.

Em Teca, *Tectona grandis*, as formigas cortadeiras atacam, preferencialmente, folhas jovens, deixando as mais velhas sem danos. Nos plantios novos os ponteiros também são cortados e transportados, promovendo o surgimento de brotação lateral que acarreta na deformação do fuste, dando-lhe um aspecto falciforme. Em outros casos, com a morte da parte distal, a planta emite uma série de brotações entouceiradas, comprometendo a forma e o desenvolvimento da planta.

Nas árvores adultas, somente os ápices das plantas são atacados (PERES FILHO et al., 2006).

Em florestas plantadas de *Pinus* sp. e de *Eucalyptus* sp., as formigas cortadeiras destacam-se como as principais pragas, especialmente nas fases de pré-corte (áreas de reforma ou condução da floresta) e imediatamente após o plantio ou no início da condução de brotação. Pela ocorrência praticamente generalizada se destacam as espécies *Atta laevigata*, *A. sexdens rubropilosa*, *Acromyrmex disciger*, *Acromyrmex niger* e *Acromyrmex crassispinus*, dentre outras (BOARETTO e FORTI, 1997).

Os prejuízos causados pela ação dos desfolhamentos causados por *A. sexdens*, numa densidade de quatro colônias.ha⁻¹ foram calculados em 14% em áreas reflorestadas com eucalipto e 14,5% em áreas de pinos (AMANTE, 1972). Anjos et al. (1998) relataram que o desfolhamento provocado pelas formigas causam prejuízos de 13% da colheita e em ecossistemas tropicais, as formigas cortadeiras consomem cerca de 15% da produção florestal. Além desses prejuízos diretos causados pelas formigas cortadeiras, existem os problemas de forma indireta, como é o caso da grande quantidade de agrotóxicos aplicados no controle desses insetos, afetando a saúde do homem e de outros seres vivos (DELLA LUCIA e FOWLER, 1993).

2.2. IMPORTÂNCIA DAS FOLHAS DAS ÁRVORES PARA AS FORMIGAS CORTADEIRAS E O FUNGO SIMBIONTE

A associação mutualística entre a formiga cortadeira e o fungo *L. gongylophorus* é muito forte e existe uma total dependência entre ambos, nesta interação as formigas usam vegetais frescos para o desenvolvimento do fungo e para sua própria alimentação (DELLA LUCIA e FOWLER, 1993; FERNANDES et al., 2002). O fungo cresce sobre o material vegetal, produzindo hifas e gongilídeos que são considerados a principal fonte de nutrientes para as formigas, especialmente para as larvas. O fungo constitui a única fonte de alimento para estas larvas e

fornece cerca de 9% da energia necessária para as operárias das formigas (QUINLAN e CHERRETT, 1979).

As formigas cortadeiras são capazes de manipular o fungo sobre o substrato vegetal, transplantando-o de jardins velhos para os novos, especialmente preparados para acolhê-lo, onde aperfeiçoam seu crescimento através da aplicação regular de suas fezes, limpeza dos esporos contaminantes e extirpação dos micélios infestados (MARTIN, 1987). O papel destes fungos está associado à dieta das formigas cortadeiras. As dos gêneros *Atta* (saúva) e *Acromyrmex* (quenquém) que utilizam a cultura do fungo como a mais importante fonte de alimento, pois assim evitam a ingestão de componentes químicos tóxicos presentes nos vegetais (TEREZAN et al., 2003).

A relação simbiótica entre o fungo e as formigas proporciona benefícios a ambos (SCHUTZ et al., 2005), pois as formigas se beneficiam do fungo através da quebra das enzimas possibilitando a desoxidação de compostos secundários (aleloquímicos) oriundos dos vegetais, que poderiam agir como inseticidas naturais às formigas (NORTH et al., 1999), já o fungo se beneficia, entre outras razões, pela manutenção do ambiente livre de competidores (antagonista ou entomopatogênicos) através da aplicação de compostos antibióticos produzidos pelas formigas, onde o fungo não poderia sobreviver sem a presença das formigas (CURRIE et al., 1999).

O fungo simbiote é a principal fonte de alimento para a colônia de formigas cortadeiras, entretanto não se constitui como a única fonte, pois as operárias adultas ingerem seiva diretamente das plantas no momento de corte e recorte do material vegetal e o ato de lamber é frequente e realizado simultaneamente, pois através das bordas das folhas ocorre seiva extravasada. As operárias também raspam a superfície da folha removendo a camada de cera epicuticular (QUINLAN e CHERRETT, 1979; FORTI e ANDRADE, 1999). Além de seiva, consomem lipídios presentes em várias estruturas das plantas, entre elas os corpos de alimentação e os elaiossomos das sementes (BUENO et al., 2008).

2.3. FORRAGEAMENTO E PREFERÊNCIA DAS FORMIGAS CORTADEIRAS POR ESPÉCIES VEGETAIS

As formigas cortadeiras podem ser consideradas espécies monófagas, do ponto de vista alimentar, pois cultivam um único tipo de fungo que será a base da alimentação, principalmente das larvas e da rainha (WETTERER, 1994), mas também, podem ser chamadas de polífagas, pois cortam folhas e partes vegetais de alguma determinada planta, na qual servirá de base para a micocultura, ou seja, alimentar o fungo simbiote (PINTERA, 1983).

As operárias de *A. sexdens* cortam material vegetal a uma distância de até 100 metros de seu saúveiro. As primeiras saúvas deixam uma trilha de feromônios após descobrir uma fonte vegetal, que são identificadas pelas demais operárias até a localização da fonte vegetal. Além disso, os primeiros indivíduos emissores do feromônios limpam o caminho, formando uma trilha, permitindo que as formigas caminhem rapidamente (HÖLLDOBLER e WILSON, 1990).

A procura de folhas ideais para a colônia é um mecanismo complexo, envolvendo elementos individual e social que interagem para determinar o carregamento de substratos para a colônia, visando um alto rendimento produtivo (ROCES e HÖLLDOBLER, 1994). A coleta do material vegetal pelas formigas cortadeiras inclui a seleção do material a ser cortado e a condução deste ao interior dos formigueiros. Segundo Wetterer (1989), para *Atta cephalotes* estas atividades acontecem com alternância estacional: no verão, a maior intensidade de corte ocorre nos horários noturnos e, no inverno, durante o dia. Os desfolhamentos dos vegetais se desenvolvem em condições ótimas de umidade e temperatura, as quais são bastante variáveis dependendo da espécie e do ambiente (ZAYAS, 1981).

Schindwein e Fowler (1999) apontaram que operárias de *A. sexdens*, quando encontram recursos apetecíveis ao seu desenvolvimento, realizam trilhas de corte que, conjuntamente com a liberação de feromônios, permitem a agregação em massa das operárias, onde são conhecidos como trilha de forrageio. Assim, estas formigas

fazem uma exploração e corte de forma intensiva, organizada e sincrônica que, às vezes, resulta no desfolhamento total da planta.

A preferência para o corte das espécies vegetais está relacionada com a exigência nutricional do fungo mutualista, onde em um ecossistema natural, as formigas mostram preferência por algumas espécies vegetais, as quais são constantemente desfolhadas, enquanto outras não são atacadas, embora sejam abundantes e localizadas próximas aos ninhos (BORBA et al., 2006). As saúvas e quenquéns cortam as mais variadas espécies de plantas, para servirem de substrato para o fungo do qual se alimentam. Existem espécies de formigas que cortam preferencialmente monocotiledôneas e outras que preferem as dicotiledôneas, assim como também há espécies que cortam tanto monocotiledôneas como dicotiledôneas (PERES FILHO, 2002).

Aparentemente, na seleção do hospedeiro para o corte, as formigas cortadeiras são influenciadas pelos repelentes químicos presentes nas plantas, por mudanças físicas nas folhas, associadas às flutuações de temperatura e pela exigência nutricional do seu fungo simbiote (BORBA et al., 2006). A capacidade de diferentes substratos na promoção do crescimento de fungos depende da sua composição química, que é diferente entre as espécies de plantas, sendo influenciada pelas condições culturais, fatores climáticos e estágio de desenvolvimento da planta. Estas diferenças afetam as preferências das formigas e são extremamente difíceis de serem medidas com precisão, mas são detectáveis por seu efeito sobre a taxa de crescimento do fungo simbiote (MUDD e BATEMAN, 1979).

Peres Filho et al. (2002), visando fornecer subsídios ao manejo da espécie *A. sexdens rubropilosa* (saúva limão), observaram algumas preferências dessa espécie por diferentes espécies florestais, em condições de laboratório. Entre as espécies estudadas, as menos preferidas foram: *Caryocar brasiliensis* (pequi), *Cariniana strellensis* (jequitibá), *Cedrela fissilis* (cedro), *Dipteryx alata* (cumbaru), *Eucalyptus grandis* (eucalipto), *Genipa americana* (jenipapo), *Hevea brasiliensis* (seringueira) e *Magonia pubescens* (timbó).

2.4. MÉTODOS DE CONTROLE DE FORMIGAS CORTADEIRAS

Entre os métodos de controle de formigas mais utilizados estão a termonebulização, pós-secos e iscas granuladas (ZANUNCIO et al., 2002; ZANETTI et al., 2003), mas nem todos são totalmente eficazes. Para Hebling et al. (1994), o controle de insetos sociais considerados pragas é particularmente complexo, devido às características de polimorfismo (indivíduos que se diferenciam morfológicamente) e polietismo (de acordo com as funções que desempenham) nas colônias, no caso das formigas cortadeiras, essa complexidade é ainda maior, devido à delicada interação planta, formiga e o fungo simbiote.

Para a eliminação total de um formigueiro é necessário que a rainha seja eliminada e uma boa alternativa para isto é eliminando as operárias menores denominadas de jardineiras e “babás”, que são encarregadas de cuidar dos fungos (hifas), da trituração final das folhas para servir de substrato ao fungo e do cuidado com a prole (PERES FILHO, 2002).

As pesquisas voltadas para o controle desses insetos devem levar em consideração todos os fatores presentes nos formigueiros, procurando conhecer o alvo primário de ação e os aspectos mais complexos da interação planta, formiga e fungo (HEBLING et al., 1994). Existem alguns métodos de controle que agem nesta interação e o mais conhecido é o que usa iscas granuladas.

Segundo Boaretto e Forti (1997), as iscas granuladas compreendem um substrato atrativo oriundo de plantas, em mistura com um ingrediente ativo tóxico, podendo ser os metabólitos secundários presentes em algumas plantas, em pellets. Estas iscas são transportadas para o formigueiro pelas próprias formigas e agem em contato direto com o fungo simbiote, participando assim na interação.

Em consequência dos aspectos desfavoráveis (deterioração do ambiente, eliminação de inimigos naturais e o aumento de indivíduos resistentes) apresentados pelas iscas granuladas, têm gerado linhas de estudos na busca de produtos mais específicos e de menor impacto ambiental (HEBLING et al., 2000).

2.5. EFICIÊNCIA DOS EXTRATOS VEGETAIS NO CONTROLE DE ALGUNS INSETOS

Muitas espécies vegetais produzem substâncias que têm atividades biológicas e que foram desenvolvidas pelas plantas ao longo de sua existência, tendo sido útil para garantir sua sobrevivência. Essas substâncias são os metabólitos secundários e apresentam ações medicinais, inseticidas, repelentes, antimicrobianas, entre outras (SAITO, 2004). Devido à necessidade de se dispor de novos compostos para o uso no controle de pragas sem problemas de contaminação ambiental, resíduos nos alimentos, efeitos prejudiciais sobre organismos benéficos e aparecimento de insetos resistentes, surgiram estudos com inseticidas oriundos de espécies vegetais (VENDRAMIM e CASTIGLIONI, 2000).

A utilização de extratos vegetais, no controle de insetos, requer plantas que tenham metabólitos secundários com ações inseticidas. Alguns extratos de plantas ou suas combinações ativas isoladas possuem ação inseticida aguda ou crônica como reguladores de crescimento ou redutores da alimentação de espécies de insetos (SHAPIRO et al., 1994). Os inseticidas botânicos são produtos derivados de plantas que apresentam metabólitos secundários de ação inseticida, ou parte delas, podendo ser o próprio material vegetal, normalmente moído até ser reduzido a pó, ou seus produtos derivados por extração aquosa ou solventes orgânicos (WIESBROOK, 2004).

Segundo Dequech et al. (2008), a utilização de extratos aquosos de plantas inseticidas no controle de insetos-praga é uma alternativa prática e menos agressiva ao ambiente e ao homem. Além disso, os extratos podem ser produzidos facilmente pelos agricultores familiares e podem ser aplicado em pequenas áreas de cultivo, caso das estufas com filmes plásticos.

As espécies botânicas mais utilizadas como plantas inseticidas pertencem às famílias Meliaceae, Rutaceae, Asteraceae, Annonaceae, Labiateae e Canellaceae, com destaque para as meliáceas, na qual estão *Melia azedarach* (cinamomo), *Azadirachta indica* (nim) e *Trichilia*

pallida (catiguá-amarelo) (MORDUE e BLACKWELL, 1993; RODRIGUEZ e VENDRAMIM, 1996). De acordo com Isman (2000), óleos essenciais, principalmente das espécies pertencentes às famílias Lamiaceae e Myrtaceae estão entre as plantas inseticidas com resultados notáveis.

Um dos destaques da família Meliaceae é a espécie *A. indica*, pois, além de ser a espécie mais estudada, já tem seu efeito comprovado sobre aproximadamente 400 espécies de insetos (MARTINEZ, 2002). Essa comprovação deve-se a presença de um limonóide denominado azadiractina, cuja atividade sobre alguns insetos é comparável à dos melhores inseticidas sintéticos encontrados no mercado (SCHMUTTERER, 1990).

Mordue e Blackwell (1993) afirmaram que insetos tratados ou alimentados com azadiractina apresentam inibição do crescimento, morte de larvas durante o processo de ecdise, alongamento da fase larval, deformações de pupas e adultos, redução na longevidade, fecundidade e fertilidade dos adultos, e até a morte dos insetos horas após o tratamento.

As formigas apresentam algum grau de seletividade nos vegetais dos quais os cortam. Característica física dos vegetais tais como as adaptações morfológicas, tem sido identificada como fatores de redução de danos causados pelas formigas cortadeiras. Além disso, um baixo teor de água na folha é um fator que influencia na inibição do ataque, ou seja, repelente (Cherrett, 1972). Cherrett et al. (1989) sugerem que o mecanismo por trás da escolha de material vegetal adequado para o fungo é simplesmente o bom ou mal gosto de uma determinada planta no momento do corte. Cherrett e Seaford (1970) relatam que a qualidade nutricional, determina a preferência das formigas, em relação ao tipo de vegetal.

Uma alternativa que vem despertando o interesse de muitos pesquisadores é o retorno aos estudos de compostos naturais presentes nos vegetais, principalmente os que fazem parte do metabolismo secundário, que constituem novas fontes para o controle de insetos praga (OLIVEIRA, 2006). De acordo com Fernandes et al. (2008), algumas plantas podem causar a morte do fungo simbiote e das

formigas cortadeiras, por apresentarem metabólitos secundários tóxicos às formigas e/ou ao fungo. Conforme Della Lucia et al. (2008), a obtenção de moléculas extraídas de extratos de plantas tóxicas é uma das áreas de maiores perspectivas para o manejo de formigas cortadeiras, onde é necessário estudar as plantas que apresentam resistência ao ataque de formigas cortadeiras no campo, para uma possível descoberta de plantas tóxicas as formigas ou o fungo simbiote.

Segundo Roel (2001) o emprego de plantas inseticidas tem inúmeras vantagens quando comparada ao emprego de produtos sintéticos, uma vez que são obtidos de recursos naturais renováveis, não persistem no ambiente, não deixam resíduos em alimentos e possuem baixo custo financeiro. As principais plantas que originaram as substâncias puras com atividade inseticida pertencem aos gêneros: *Derris*, *Lonchocarpus*, *Tephrosia* e *Mundulea* (Leguminosae), produtoras de rotenóides; *Chrysanthemum* (Asteraceae), produtoras de piretrinas; *Nicotiana* (Solanaceae), produtoras de nicotina e nornicotina (Alcalóides); *Azadirachta* (Meliaceae), *Quassia* (Simaroubaceae) produtoras de azadiractina, limonóides, quassinóides e terpenóides, furanocumarinas e cromenos são tipicamente encontradas em plantas das famílias Rutaceae e Apiaceae (FERNANDES et al., 2008).

Bueno et al. (1995; 2004) observaram que ninhos iniciais cuidados em laboratório e tratados exclusivamente com folhas de *Sesamum indicum* (gergelim) foram drasticamente afetados e que os compostos tóxicos para formigas estariam concentrados no extrato metabólico desta planta. Segundo Hebling et al. (1996), ninhos de laboratório de *Atta sexdens rubropilosa* alimentados diariamente com folhas de *Ricinus communis* (mamona) mostraram gradual decréscimo no volume do jardim de fungo e aumento da velocidade de morte de formigas, com extinção total dos ninhos após seis semanas de tratamento.

Ribeiro et al. (1998) relataram que extratos de gergelim, adicionados em meio de cultura, podem causar até 60% de inibição no desenvolvimento *in vitro* do fungo simbiote. Peres filho e Dorval (2003) avaliaram o nível de controle do gergelim formulado em iscas à base de

folhas e de sementes em diferentes concentrações para formigueiros de *A. sexdens rubropilosa*, onde concluíram que a isca granulada à base de farinha de folhas de gergelim (a 15%) apresenta-se como uma alternativa no controle de formigas cortadeiras.

2.6. CULTIVO *IN VITRO* DE *Leucoagaricus gongylophorus*

O fungo simbiote produz estruturas especializadas para a alimentação das larvas, denominadas de gongilídeos. Essas estruturas estão espalhadas por todo o jardim de fungo e, quando observadas no microscópio, revelam as extremidades das hifas infladas, de forma arredondada e ocorrem em agrupamentos chamados de estáfilas, sendo esta parte rica em gongilídeos (Figura 1). Elas constituem o principal alimento das larvas, que, apesar de estarem em contato constante com o fungo, não são capazes de se alimentar sozinhas, sendo desta forma totalmente dependentes das operárias (BUENO et al., 2008).

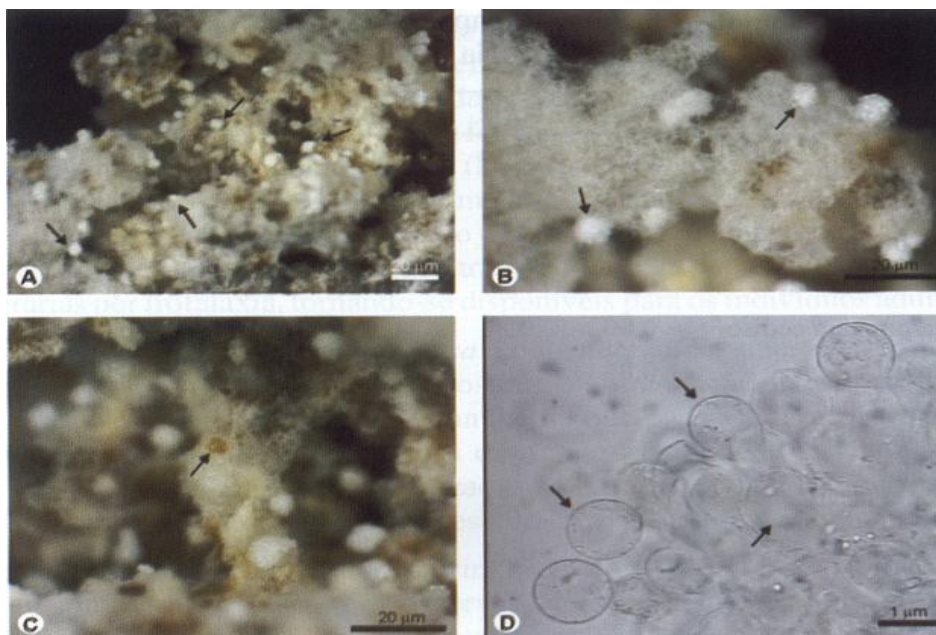


FIGURA 1 - FOTOMICROGRAFIAS DE LUZ DO JARDIM DE FUNGO DE *Atta sexdens rubropilosa*. (A) REGIÃO RICA EM ESTÁFILAS (SETAS). (B) DETALHE DA REGIÃO DE ESTÁFILAS (SETAS). (C) DETALHE DO EXSUDATO DAS HIFAS (SETA). (D) DETALHE DA ESTÁFILA REVELANDO OS GONGILÍDEOS CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO FUNGO SIMBIONTE (SETAS).

Fonte: (SCHNEIDER, 2003).

De acordo com Schneider (2003), a alimentação de uma larva por uma operária pode ser de duas formas: é coletado pela operária uma estáfila ou tufo de hifas que é colocado diretamente entre as peças bucais das larvas, ou então a operária coleta a estáfila, a manipula com as mandíbulas, lábios e pernas anteriores, sempre tocando com as antenas até que se obtenha uma consistência umedecida, e só então deposita entre as peças bucais da larva. Durante a manipulação, que é bastante frequente, a operária pode ingerir o líquido extravasado e mesmo pequenas porções do fungo simbiote.

As estáfilas permitem o isolamento *in vitro* do fungo em laboratório, entretanto o isolamento é de muita dificuldade, uma vez que no ambiente em que o fungo cresce naturalmente, há outros microrganismos (fungos, bactérias e leveduras) (CRAVEN et al., 1970), o que pode levar ao surgimento de contaminações, crescendo nas placas fungos e bactérias consideradas como contaminantes. Alguns autores enfatizam vários tipos de testes para isolamento, onde em muitas tentativas ocorreram contaminações e em outras pode ser observado o isolamento do fungo simbiote livre de contaminações (CASTELLANI et al., 2007; 2009; MIYASHIRA, 2007).

Miyashira et al. (2010) só obtiveram sucesso no isolamento, a partir do momento que as saúvas foram coletadas juntamente com o fungo, sendo transportadas ao laboratório e, apenas durante o processo de inoculação, realizada em câmara de fluxo laminar, que o fungo foi separado das saúvas e transferido para o meio de cultura. A coleta do fungo com as saúvas possibilita um isolamento mais eficiente, devido ao fato das saúvas realizarem um constante processo de limpeza do fungo, afastando e até eliminando outros microrganismos.

Outro detalhe sobre o fungo simbiote de formigas cortadeiras é que apresenta crescimento lento em laboratório, fazendo com que depois de semanas de incubação, paralisa seu desenvolvimento sem atingir as bordas das placas. De acordo com Souza et al. (2011a), o fungo simbiote em condições de laboratório, se caracteriza por uma fase de crescimento maior em determinado intervalo, que com o passar

do tempo vai se atenuando até que o processo tenda a se estabilizar ou parar, sendo esse processo de avaliação determinado pelo fator tempo em intervalos iguais para cada leitura de crescimento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Patologia Florestal do Departamento de Engenharia Florestal, da Faculdade de Engenharia Florestal, da Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT, sob temperatura média de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $70 \pm 10\%$.

3.1. COLETA DO FUNGO SIMBIONTE

O fungo simbiote e as formigas cortadeiras foram coletados de formigueiros de *Atta sexdens rubropilosa* (saúva-limão) presentes no campus da Universidade Federal de Mato Grosso, em Cuiabá. Partes dos fragmentos do fungo dos sauveiros, juntamente com algumas saúvas, foram retirados das panelas de fungo e armazenados em um recipiente colocado na parte central, contendo fungo e formigas, o qual era interligado com mais dois recipientes, de igual volume, ligados entre si por um tubo plástico (Figura 2), possibilitando assim que as formigas transportadas para o laboratório continuassem suas atividades normalmente, garantindo a sobrevivência e manutenção do fungo, evitando futuras contaminações (MIYASHIRA et al., 2010). Esses potes permaneceram no laboratório, sob temperatura média de $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ em escotofase (escuro) até sua utilização.

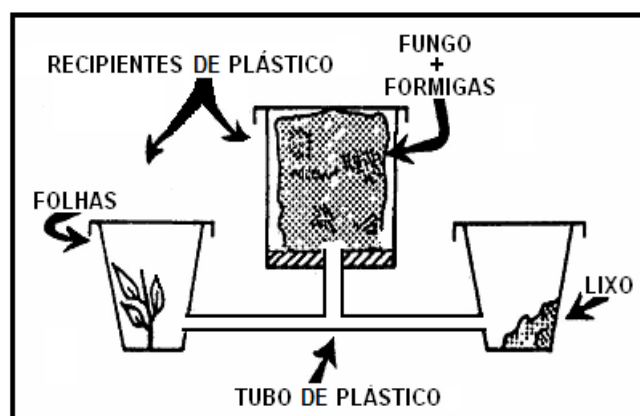


FIGURA 2 – DEMONSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM MODELO DE SAUVEIRO ARTIFICIAL, PARA MANUTENÇÃO DAS FORMIGAS CORTADEIRAS E DO FUNGO SIMBIONTE. CUIABÁ, MT, 2010.

3.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS

Para obtenção dos extratos vegetais foram coletadas folhas de 24 espécies vegetais (Tabela 1), as quais foram secas em estufa a 40°C durante 48h e, após esse processo, foi feita a trituração do material em liquidificador. Os extratos foram obtidos através do processamento da massa seca das folhas com água destilada, na proporção de 1:6 (peso:volume), sendo posteriormente filtrados através de tecido fino (voil) (SOUZA e VENDRAMIM, 2001), e transferidos imediatamente uma porção do extrato para o meio de cultura, de acordo com cada ensaio.

TABELA 1 – ESPÉCIES VEGETAIS USADAS NA OBTENÇÃO DE EXTRATO FOLIAR AQUOSO. CUIABÁ, MT, 2010.

Nome vulgar	Espécie	Família
Almécega	<i>Protium heptaphyllum</i> March	Burseraceae
Angico branco	<i>Albizia polycephala</i> (Benth.) Killip1.	Fabaceae
Aricá	<i>Physocalymma scaberrimum</i>	Lythraceae
Aroeira	<i>Astronium urundeuva</i> Pohl.	Anacardiaceae
Caixeta	<i>Simarouba versicolor</i> St. Hil.	Simaroubaceae
Cambará	<i>Vochysia divergens</i> Pohl.	Vochysiaceae
Carvãozinho	<i>Callisthene fasciculata</i> Mart.	Vochysiaceae
Cedro	<i>Cedrela fissilis</i> Vell.	Meliaceae
Cerejeira	<i>Amburana acreana</i> (Ducke) A. C. Sm.	Leguminosae
Copaiba	<i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.	Caesalpinaceae
Cumbaru	<i>Dipteryx alata</i> Vog.	Leguminosae
Jenipapo	<i>Genipa americana</i> L.	Rubiaceae
Gonçaleiro	<i>Astronium fraxinifolium</i> Schott	Anacardiaceae
Ingá	<i>Inga edulis</i> Mart.	Fabaceae
Ipê-amarelo	<i>Tabebuia aurea</i> (Manso) Benth. & Hook	Bignoniaceae
Jatobá	<i>Hymenaea courbaril</i> L.	Leguminosae
Jequitibá	<i>Cariniana estrellensis</i> (Raddi) Kuntze	Lecythidaceae
Leucena	<i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit	Leguminosae
Mogno	<i>Swietenia macrophylla</i> King	Meliaceae
Mutamba	<i>Guazuma tomentosa</i> Kunth.	Sterculiaceae
Pau-terra	<i>Qualea grandiflora</i> Mart.	Voquistaceae
Pequi	<i>Caryocar brasiliensis</i> Camb.	Caryocaraceae
Seringueira	<i>Hevea brasiliensis</i> M. Arg.	Euphorbiaceae
Timbó	<i>Magonia pubescens</i> St. Hil.	Sapindaceae

3.3. INSTALAÇÃO DOS ENSAIOS

O meio de cultura utilizado para isolamento do fungo foi Sabouraud Ágar preparado com 10g peptona bacteriológica; 40g de dextrose e 15g de ágar para 1000 ml de água destilada. Os frascos contendo o meio de cultura e as placas de Petri de 90mm x 15mm foram autoclavados a 120°C e 1,1 atm de pressão, durante 15 minutos. Em uma câmara asséptica de fluxo laminar foi transferido 15 ml de meio para cada placa, onde permaneceram até a completa solidificação. Pequenos fragmentos do fungo foram transferidos para placas de Petri com o BDA e em seguida incubadas em câmaras climatizadas do tipo B.O.D (Demanda Bioquímica de Oxigênio) à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ em escotofase. O fungo foi replicado para novas placas, sempre que necessário, para condução dos ensaios.

3.3.1. Experimento 1: Extratos Vegetais no Desenvolvimento *in vitro* do Fungo Simbionte

Foram adicionados 20 ml de extrato para 100 ml de meio de cultura (2:10 v/v) (BORBA et al., 2006; CASTELLANI et al., 2007). O meio de cultura utilizado foi o BDA, preparado com 200g de batata, 20g de dextrose e 15g de ágar para 1000 ml de água destilada, pois de acordo com Souza et al., (2010), o fungo simbionte apresenta melhor crescimento em meio BDA do que o Sabouraud Ágar. Os valores de pH dos meios foram ajustados para 5,5 utilizando-se soluções de HCl ou NaOH 1mol.L^{-1} . Os frascos contendo o meio de cultura com adição dos extratos foram esterilizados da mesma forma descrita no item 3.3.

Preparados os tratamentos, discos de meio de cultura contendo micélio do fungo foram transferidos para as placas de Petri contendo os meios de cultura: BDA (testemunha) e outros com BDA + extratos, com um vazador de 5mm de diâmetro (Figura 3), sendo as placas de Petri seladas com filme de polietileno e em seguida incubadas em câmaras climatizadas do tipo B.O.D à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ em escotofase (escuro).



FIGURA 3 – PLACA DE PETRI UTILIZADA PARA RETIRADA DOS DISCOS DE MICÉLIO COM UM VAZADOR DE 5mm PARA AS OPERAÇÕES DE INOCULAÇÃO E DE REPICAGEM DO FUNGO SIMBIONTE. LABORATÓRIO DE PATOLOGIA FLORESTAL, FENF/UFMT. CUIABÁ, MT, 2010.

3.3.2. Experimento 2: Extratos Vegetais em Diferentes Proporções no Desenvolvimento *in vitro* do Fungo Simbionte

Com os resultados obtidos no primeiro experimento, foram selecionados os extratos das seis espécies vegetais que causaram as maiores inibições crescimento micelial do fungo, juntamente com uma espécie que propiciou boas condições de desenvolvimento, sendo transferidos 15 ml, 10 ml e 5 ml de extrato dessas espécies imediatamente para cada 100 ml de meio de cultura, respectivamente correspondendo às diluições de 1,5:10, 1:10 e 0,5:10 v/v (CASTELLANI et al., 2009). Foi utilizado o meio de cultura BDA, preparado com 200g de batata, 20g de dextrose e 15g de ágar para 1000 ml de água destilada. Os valores de pH dos meios foram ajustados para 5,5 utilizando-se soluções de HCl ou NaOH 1mol.L⁻¹. Os frascos contendo o meio de cultura com adição dos extratos foram esterilizados de acordo com a metodologia escrita no item 3.3.

Após a distribuição e solidificação de 15 ml de meio de cultura: BDA (testemunha) e outros com BDA + Extratos, para cada placa de Petri, discos de micélio do fungo, obtidos com um vazador de 5mm de

diâmetro, foram transferidos para as placas de Petri que foram seladas com filme de polietileno e em seguida incubadas em câmaras climatizadas do tipo B.O.D à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ em escotofase (escuro).

3.3.3. Experimento 3: Extratos Vegetais na Sobrevivência de Operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Através de Ingestão

Operárias de *A. sexdens rubropilosa*, com peso entre 15 a 25 mg foram coletadas de formigueiros presentes no campus da Universidade Federal de Mato Grosso, em Cuiabá. Os formigueiros aparentemente estavam cortando folhas de *Gmelina arborea*, sendo possível constatar os danos presente nas folhas dessa espécie próximo ao local de ocorrência do formigueiro. As formigas foram colocadas em placas de Petri (100mm x 15mm) e mantidas em sala climatizada a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ com 35% de umidade relativa no local de teste. Para cada tratamento foram utilizadas seis placas de Petri forradas com papel filtro, contendo dez formigas/placa (PEÑAFLORES et al., 2009; TEREZAN et al., 2010).

Durante o ensaio as formigas foram mantidas com uma dieta artificial preparada com 50 g de glicose, 10 g de peptona bacteriológica, 1 g de extrato de levedura e 15 de ágar para 1000 ml de água destilada. As dietas foram preparadas com a adição dos extratos, exceto os controles, A concentração final dos extratos das espécies vegetais foi 2% ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) sendo os extratos incorporados na dieta utilizando o método dry-mix, que consiste em acrescentar o extrato junto à glicose e aos demais ingredientes secos da dieta e, posteriormente, à água destilada (PEÑAFLORES et al., 2009).

Para esterilização, as dietas foram autoclavadas a 120°C e 1,1 atm de pressão, durante 20 minutos (BUENO et al., 1997). Após a esterilização, as dietas foram vertidas em placas de Petri de 10cm de diâmetro em câmara asséptica de fluxo laminar, sendo as placas envolvidas com filme de polietileno, após o resfriamento, e mantidas na geladeira para melhor conservação durante o período dos bioensaios.

Foram montados nove tratamentos, três controles (1: ausência de dieta e de água; 2: apenas água; 3: dieta sólida sem extrato + água) e seis com dietas acrescidas com os extratos vegetais que inibiram o desenvolvimento *in vitro* do fungo simbiote, da qual foram fornecidas de 0,4g a 0,5g por placa. A cada 24 horas as dietas foram renovadas e, sempre que necessário, os papéis filtro foram trocados, a fim de se evitar o desenvolvimento de microorganismos contaminantes, que poderiam alterar o comportamento e/ou a sobrevivência das formigas. O período máximo de observação foi de 20 dias e o número de formigas mortas foi diariamente registrado.

3.4. COLETA DOS DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.4.1. Extratos Vegetais no Desenvolvimento *in vitro* do Fungo Simbiote e Extratos Vegetais em Diferentes Proporções no Desenvolvimento *in vitro* do Fungo Simbiote

O crescimento do fungo foi avaliado macroscopicamente com base no diâmetro da colônia, em milímetros e em intervalos semanais, totalizando seis avaliações aos 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias após a inoculação. Para facilitar as mensurações foram traçadas duas retas perpendiculares com ponto de cruzamento coincidindo com o centro do disco do inóculo (Figura 4). As medidas foram realizadas a partir da borda do inóculo até a extremidade do crescimento do fungo no meio de cultura e em seguida calculado o valor médio dos diâmetros para cada placa.

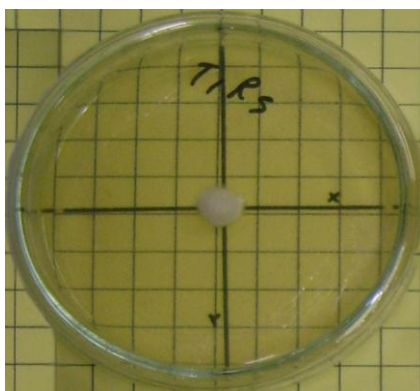


FIGURA 4 – PLACA DE PETRI TRAÇADA COM DUAS RETAS PERPENDICULARES COM O MICÉLIO DO FUNGO EM DESENVOLVIMENTO. LABORATÓRIO DE PATOLOGIA FLORESTAL, FENF/UFMT. CUIABÁ, MT, 2010.

Para o efeito dos extratos vegetais no desenvolvimento *in vitro* do fungo simbiote, o delineamento experimental, foi inteiramente casualizado, sendo 28 tratamentos (quatro controles e 24 com BDA + extratos vegetais) e seis repetições. Os controles consistiam em BDA puro (Controle 1 e 3) e BDA + Água destilada sem Extrato (Controle 2 e 4). Para o efeito dos extratos vegetais em diferentes proporções no desenvolvimento *in vitro* do fungo simbiote experimento, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial de 8x3 (espécies vegetais x proporção) com seis repetições, onde os controles foram acrescidos com água destilada sem extrato. Ambos os experimentos foram realizados em duas etapas, pois a incubadora B.O.D não comportava todos os tratamentos simultaneamente, todavia as condições de temperatura e fotoperíodo foram idênticas.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro. As análises foram executadas através do software SISVAR versão 5.6 (FERREIRA, 2008).

3.4.1.1. Análise multivariada de agrupamento de dados

A análise de agrupamento foi utilizada com o objetivo de agrupar os valores do crescimento do fungo *L. gongylophorus* relacionados com os efeitos benéficos ou prejudiciais dos extratos, sendo

escolhidos aleatoriamente oito extratos vegetais que não inibiram o crescimento do fungo simbiote, juntamente com os controles, totalizando dez tratamentos. O método utilizado para a sequência de fusão dos agrupamentos foi a ligação média com a distância euclidiana (HAIR JÚNIOR et al., 2005). Foi adotado como ponto de corte a distância equivalente a 50% da distância máxima observada, conforme Albuquerque et al. (2006), a fim de facilitar a avaliação e a tomada de decisão sobre os grupos formados.

3.4.1.2. Análise de regressão

Para validar os grupos obtidos, foram estimadas e confeccionadas as curvas de crescimento do fungo, sob os diferentes extratos, por meio do ajuste do modelo de regressão não-linear de Chapman-Richards, pois este modelo interpreta melhor o crescimento biológico (FLORIANO et al., 2006), sendo expresso por:

$$d = \beta_0 \left(1 - e^{(-\beta_1 \cdot t)}\right)^{\beta_2} + \varepsilon_i$$

Em que:

d = diâmetro (mm)

t = tempo (dias)

β_0 , β_1 e β_2 = coeficientes de regressão

e = exponencial

ε_i = erro associado.

O modelo foi ajustado com o auxílio do pacote estatístico SAS (SAS INSTITUTE, 2008) e o critério de avaliação considerou o menor erro padrão da estimativa em porcentagem ($S_{yx}\%$) e ao maior coeficiente de determinação ajustado ($R^2_{aj.}$). O $S_{yx}\%$ mede a dispersão média entre os valores observados e estimados ao longo da linha de regressão e o $R^2_{aj.}$ expressa o quanto a variação total é explicada pela regressão (MACHADO et al., 2002).

Foram avaliados o teste F e a significância dos coeficientes de regressão (β) pelo teste t, ao nível de 5% de probabilidade, o qual fornece uma estimativa baseada na probabilidade de que os coeficientes obtidos em muitas amostras de um dado tamanho, sejam de fato diferentes de zero. Assim, se não for estatisticamente significativo, a variável independente específica (tempo) não é um bom indicador da variável dependente (diâmetro), devendo, portanto, ser descartada a equação (HAIR JÚNIOR et al., 2005).

3.4.2. Extratos Vegetais na Sobrevivência de Operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Através de Ingestão

A cada 24h foi verificada a quantidade de formigas mortas por placa de Petri. Para a análise estatística, foi utilizado o dia em que 50% das saúvas morreram (M_{50}) (VICTOR, et al., 2001; ALMEIDA et al., 2007; MIYASHIRA, 2007; BUENO et al., 2005; PEÑAFLORES, et al., 2009; TEREZAN et al., 2010). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo nove tratamentos com seis repetições, onde os dados foram submetidos a uma Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade de erro. As análises foram executadas através do software SISVAR versão 5.6 (FERREIRA, 2008). Nas análises estatísticas, levando-se em conta a distribuição dos valores de contagem do número de formigas mortas nas diferentes dietas fornecidas, utilizou-se a transformação dos dados usando a fórmula $\sqrt{X+0,5}$, para a uniformização destes e normalidade dos dados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO DO FUNGO

Embora o fungo simbiote trazido ao laboratório estivesse acompanhado das formigas, as quais continuavam a manutenção do fungo, o isolamento e a manutenção *in vitro* do fungo simbiote das saúvas foi de grande dificuldade, pois microrganismos contaminantes, ainda cresceram em algumas placas (Figura 5A). Isso ocorre porque no ambiente em que o fungo cresce naturalmente, há outros microrganismos (fungos, bactérias e leveduras), que desempenham papel importante nesse sistema saúva-fungo (CRAVEN et al., 1970). Além disso, o fungo mutualista apresenta um lento crescimento em meio de cultura, o que leva a um maior tempo de incubação, aumentando os riscos de contaminações por esses microrganismos. Outro problema é a perda de água no meio de cultura, fazendo com que se desidrate e rache (Figura 5 B), podendo influenciar no desenvolvimento do fungo.

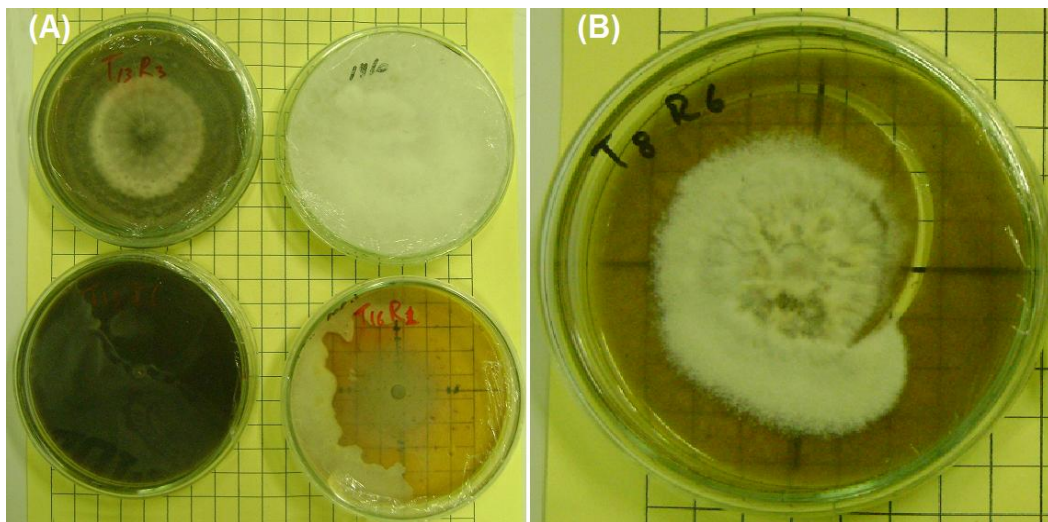


FIGURA 5 – (A) FUNGOS E BACTÉRIAS CONSIDERADOS COMO CONTAMINANTES, CRESCENDO NO MEIO DE CULTURA E (B) MEIO DESIDRATADO APRESENTANDO RACHADURAS. LABORATÓRIO DE PATOLOGIA FLORESTAL, FENF/UFMT. CUIABÁ, MT, 2010.

Em algumas placas pôde ser observado o fungo sem a presença de nenhum microorganismo contaminante, os quais foram

repicados para novas placas, garantindo seu isolamento puro. Essa replicação foi realizada sempre que o meio de cultura começava a diminuir de tamanho devido à perda de água, começava a escurecer, e/ou quando ocorria o aparecimento de algum microorganismo contaminante. A replicação geralmente ocorria após oito semanas, a não ser nos casos de ocorrência de contaminação, onde este tempo era menor.

Para confirmar se o fungo isolado nas placas de Petri era o mesmo cultivado pelas saúvas, as placas contendo fungo foram colocados nos sauveiros e observada às reações das formigas, onde o recolhiam o incorporavam ao fungo do sauveiro. O mesmo fato foram observados por Howard et al. (1988) e Cazin Jr. et al. (1989). Outro método de confirmação do isolado puro, se da pela observação de gongilídeos presentes no fungo simbiote de formigas cortadeiras (CASTELLANI et al., 2007; MIYASHIRA et al., 2010), onde foi possível constatar a presença desses gongilídeos nas placas de Petri (Figura 6), podendo assim iniciar os ensaios.

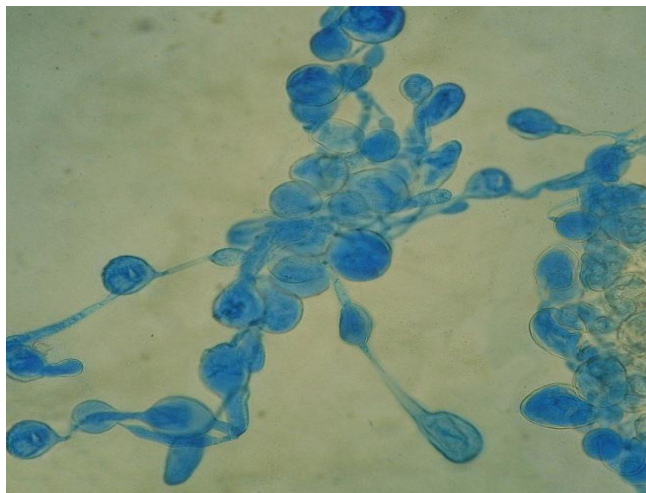


FIGURA 6 - GONGILÍDEOS E HIFAS DO FUNGO SIMBIONTE DE *Atta sexdens* ISOLADO NO LABORATÓRIO (AUMENTO DE 400 X). LABORATÓRIO DE PATOLOGIA FLORESTAL, FENF/UFMT. CUIABÁ, MT, 2010.

4.2. EFEITO DOS EXTRATOS VEGETAIS NO DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DO FUNGO SIMBIONTE

A variação do pH do meio de BDA após o preparo foi de 5,55 a 5,68. Os extratos vegetais apresentaram uma faixa bem mais ampla, de 3,81 a 6,57, assim, após a mistura com o BDA, foram ajustados para 5,5, onde houve redução no valor do pH entre 0,3 a 0,33 após a esterilização em autoclave (Tabela 2). Segundo Castellani et al. (2007), com o valor de pH inicial de 4,5 há pouca variação após a autoclavagem, porém apresenta pouco crescimento micelial quando comparado a pH de 6 e 7,5. Para Loeck et al. (2004), fungos cultivados pela tribo Attini apresentam um ótimo desenvolvimento em pH próximo de 5,0, já Mudd e Bateman (1979) encontraram um valor de pH ideal de 5,5 a 6,0 para o fungo de *A. cephalotes*.

TABELA 2 – VALORES DE pH DO MEIO BDA, DO EXTRATO VEGETAL, DA MISTURA DO BDA COM O EXTRATO APÓS A CORREÇÃO, DA MISTURA APÓS A AUTOCLAVAGEM E SUA VARIAÇÃO EM RELAÇÃO AO BDA ANTES DA AUTOCLAVAGEM, UTILIZADO COMO SUBSTRATO PARA O CRESCIMENTO DO FUNGO *Leucoagaricus gongylophorus*. CUIABÁ, MT, 2010.

Meio de cultura	pH				Variação
	BDA	Extrato (E)	BDA + E Corrigido	BDA + E autoclavados	
BDA + Almécega	5,68	4,93	5,41	5,08	0,33
BDA + Angico	5,58	4,88	5,44	5,11	0,33
BDA + Aricá	5,66	4,78	5,42	5,09	0,33
BDA + Aroeira	5,58	3,81	5,47	5,26	0,21
BDA + Caixeta	5,62	5,26	5,43	5,12	0,31
BDA + Cambará	5,66	5,36	5,58	5,42	0,16
BDA + Carvãozinho	5,67	5,17	5,46	5,28	0,18
BDA + Cedro	5,63	6,16	5,62	5,54	0,08
BDA + Cerejeira	5,66	6,12	5,61	5,58	0,03
BDA + Copaíba	5,63	4,34	5,43	5,13	0,30
BDA + Cumbaru	5,68	5,18	5,38	5,27	0,11
BDA + Jenipapo	5,63	6,57	5,62	5,56	0,06

Continua...

Tabela 2, continuação

Meio de cultura	pH				Variação
	BDA	Extrato (E)	BDA + E Corrigido	BDA + E autoclavados	
BDA + Gonçalves	5,55	5,08	5,41	5,16	0,25
BDA + Ingá	5,55	5,82	5,62	5,49	0,13
BDA + Ipê	5,55	5,96	5,55	5,48	0,07
BDA + Jatobá	5,55	5,89	5,61	5,43	0,18
BDA + Jequitibá	5,62	4,89	5,39	5,10	0,29
BDA + Leucena	5,58	5,12	5,43	5,26	0,17
BDA + Mogno	5,68	4,52	5,32	5,06	0,26
BDA + Mutamba	5,68	3,89	5,54	5,23	0,31
BDA + Pau-terra	5,68	5,09	5,53	5,48	0,05
BDA + Pequi	5,68	5,21	5,38	5,20	0,18
BDA + Seringueira	5,62	5,85	5,66	5,59	0,07
BDA + Timbó	5,62	4,58	5,45	5,15	0,30

Nos tratamentos BDA + extratos de aroeira, copaíba e mutamba não houve solidificação do meio e esses três tratamentos foram excluídos do ensaio. Foi possível observar que estes extratos apresentaram os menores valores de pH, 3,81, 4,34 e 3,89, respectivamente, esse resultado confirma com os de Pierik (1987), onde o meio de cultura BDA, acrescido com partes vegetais, quando apresentando valor de pH baixo (<4,8) tem a solidificação dificultada.

Para saber se o fato do experimento terem sido realizado em duas etapas influenciava nos resultados, os dados foram calculados juntos e separados (dados não amostrados), onde não foi constatado diferenças entre as análises juntas e separadas. Na primeira semana após o início do ensaio, já se constatou diferenças significativas entre os crescimentos radiais nos tratamentos.

Alguns extratos apresentaram condições inadequadas para o desenvolvimento e acabaram levando o fungo à morte em algumas placas ou apenas impediram que o fungo se desenvolvesse por mais um período. Esse fato foi constatado nos tratamentos BDA + extratos de aricá, cerejeira, cedro, timbó, leucena e mogno, onde o desenvolvimento foi paralisado nos períodos 14, 14, 21, 21, 28 e 28, respectivamente (Tabela 3). Resultado semelhante foi obtido por Castellani et al. (2009),

onde ao incorporarem extratos de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*, variedade SP80-1842) e *Brachiaria brizantha* (Marandu) no meio de cultura BDA, prejudica o crescimento micelial do fungo simbionte de *A. capiguara*.

TABELA 3 – CRESCIMENTO MÉDIO (mm), DO FUNGO *Leucoagaricus gongylophorus* CULTIVADO EM MEIO DE CULTURA COM DIFERENTES EXTRATOS VEGETAIS, EM SEIS PERÍODOS DE AVALIAÇÃO. CUIABÁ, MT, 2010.

Tratamentos	Período de incubação (dias)					
	7	14	21	28	35	42
BDA + Almécega	5,3 b	12,1 b	18,3 d	23,8 d	30,3 e	35,4 c
BDA + Angico	1,7 g	2,2 g	2,5 h	2,6 i	2,6 j	2,8 i
BDA + Aricá	1,0 h	1,2 h	-	-	-	-
BDA + Caixeta	1,4 g	2,0 g	2,5 h	2,8 i	3,0 j	3,8 i
BDA + Cambará	3,0 e	14,1 a	24 a	30,6 b	37,3 c	46,4 a
BDA + Carvãozinho	2,4 f	7,8 d	13 e	16,7 f	18,1 h	21,4 g
BDA + Cedro	0,5 h	0,6 h	0,7 i	-	-	-
BDA + Cerejeira	0,5 h	0,5 h	-	-	-	-
BDA + Cumbaru	6,6 a	14,2 a	21,5 b	28,3 c	35,4 d	40,7 b
BDA + Jenipapo	3,3 d	13,5 a	23,2 a	32,6 a	39,1 b	44,8 a
Controle1	4,4 c	13,5 a	19,7 c	23,4 d	28,9 e	34,1 c
Controle2	3,8 d	11,5 b	17,5 d	21,9 e	25,6 f	27,1 e
BDA + Gonçalves	1,4 g	10,1 c	18,5 d	20,7 e	21,9 g	26,7 e
BDA + Ingá	3,0 e	14,2 a	23,0 a	32,4 a	40,0 b	45,4 a
BDA + Ipê	2,0 f	4,2 f	8,6 f	13,8 g	17,3 h	24,1 f
BDA + Jatobá	1,9 f	9,6 c	21,1 b	29,5 b	33,8 d	38,8 b
BDA + Jequitibá	2,9 e	3,2 f	4,0 g	4,4 h	4,7 j	4,9 i
BDA + Leucena	0,9 h	1,1 h	2,1 h	2,4 i	-	-
BDA + Mogno	0,8 h	1,4 h	1,5 i	1,7 i	-	-
BDA + Pau-terra	1,6 g	5,6 e	12,4 e	14,1 g	14,3 i	17,5 h
BDA + Pequi	2,2 f	3,9 f	4,4 g	4,8 h	4,0 j	4,1 i
BDA + Seringueira	5,3 b	13,9 a	23,2 a	33,1 a	42,9 a	45,7 a
BDA + Timbó	2,3 f	2,5 g	2,8 h	-	-	-
Controle3	4,7 c	14,1 a	20,4 c	24,3 d	26,6 f	30,4 d
Controle4	4,1 d	12,4 b	18,2 d	22,4 e	25,2 f	26,3 e
CV(%)	25,03	11,35	8,19	8,29	7,91	7,12

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Controle 1 e 3: BDA puro; Controle 2 e 4: BDA + 20 ml a mais água destilada sem Extrato.

Foi verificado maior desenvolvimento do fungo nos tratamentos BDA + extratos de cambará, seringueira, ingá e jenipapo, sendo significativamente superiores aos demais tratamentos, na maioria dos períodos avaliados. Camargo et al. (2003) acrescentaram macerados de seis espécies de plantas, individualmente e uma mistura de todas no meio artificial (ágar), na qual foram encontradas diferenças significativas entre os meios, sendo o meio acrescido com *Alchornea triplinervia* (alcórnea), o que apresentou melhores condições de desenvolvimento, quando comparado com as outras espécies e até mesmo o controle.

Ao incorporar extratos vegetais ao meio BDA pode favorecer ou inibir o desenvolvimento do fungo *L. gongylophorus*, pois alguns dos meios acrescidos com os extratos apresentaram melhores condições de desenvolvimento que os controles e outros eliminaram o fungo antes do período final de incubação. Bueno et al. (1995) e Hebling et al. (2000) observaram que componentes das folhas de algumas plantas exercem forte efeito sobre o desenvolvimento do fungo simbiote, beneficiando ou prejudicando o seu desenvolvimento, havendo evidências de que isso ocorra pela presença de metabolitos secundários presentes em algumas espécies. Sendo essa uma das possibilidades para explicar as alterações observadas em campo no comportamento de preferência de corte pelas formigas.

Segundo Siqueira et al. (1998), o fungo simbiote de *A. sexdens* cresce eficientemente em componentes encontrados nas folhas, como amido e xilana, sendo esses polissacarídeos, quando metabolizados pelo fungo, importantes fontes de carbono para a dieta das formigas. Mesmo que a adição de alguns extratos possa beneficiar o desenvolvimento do fungo, o mesmo ainda apresentou um crescimento lento em laboratório, o que corrobora com muitos autores que analisaram o desenvolvimento *in vitro* do referido fungo (BORBA et al., 2006; CAMARGO et al., 2003; CASTELLANI et al., 2007; CASTELLANI et al., 2009).

Apesar das densidades de gongilídeos não terem sido quantificadas no presente trabalho, alguns meios apresentaram maiores quantidades de biomassa e quantidade reduzida de gongilídeos e outros

apresentaram maiores quantidades de gongilídeos. Segundo Castellani et al. (2007), certos meios de cultura podem resultar em maior produção de biomassa, especialmente hifas, no entanto com formação reduzida de gongilídeos.

4.2.1. Análise Multivariada de Agrupamento de Dados

A análise de agrupamento para o desenvolvimento do fungo, com fase no diâmetro da colônia resultou na formação de cinco grupos ao estabelecer o ponto de corte (C) igual a 0,65 da distância euclidiana, sendo que os grupos apresentaram as seguintes composições: o grupo 1 com as espécies carvãozinho e pau-terra; o grupo 2 com as espécies camará, ingá, jenipapo e seringueira; o grupo 3 composto pelos controles; e finalmente, o gonzaleiro e o jatobá que não apresentaram similaridade com outras espécies e cada um constituiu um grupo isolado (Figura 7).

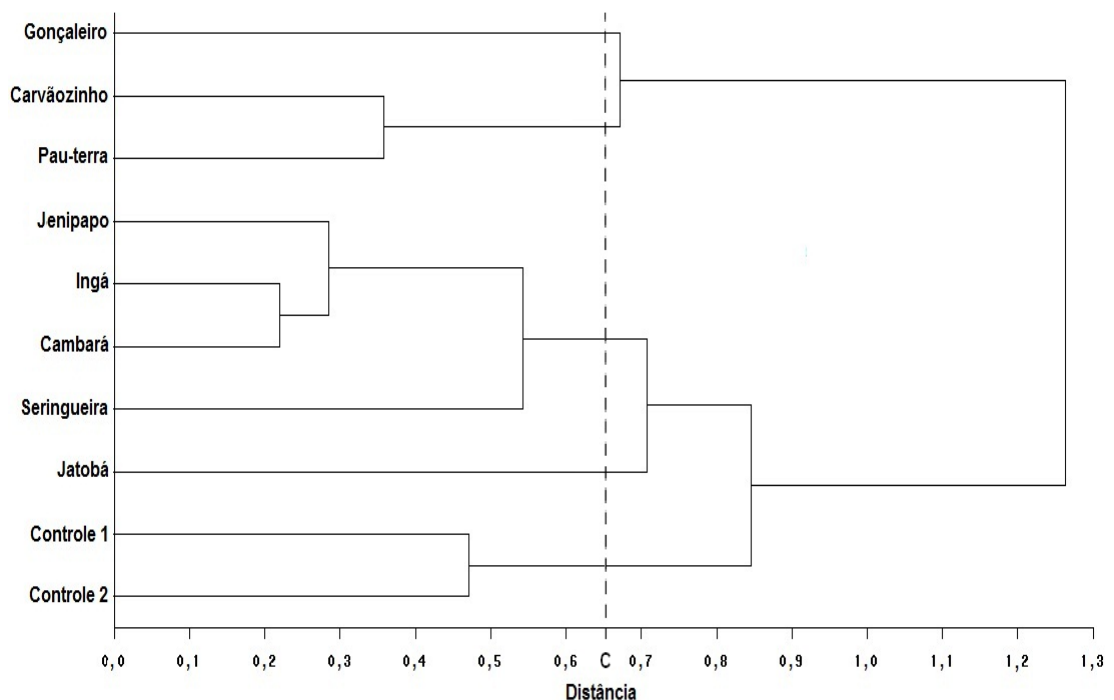


FIGURA 7 - DENDROGRAMA DA ANÁLISE DE AGRUPAMENTO PELO MÉTODO DA LIGAÇÃO MÉDIA NOS DIFERENTES EXTRATOS FLORESTAIS. CUIABÁ – MT, 2010.

De acordo com Puntar (2003), para identificar em um conjunto de dados, grupos cujos dados apresentam um comportamento semelhante segundo um determinado critério ou fator, o caminho mais comumente utilizado para tal procedimento é a análise de agrupamento de dados que engloba uma série de técnicas para análise multivariada. Para Alves e Belo (2003), a análise de agrupamento (cluster) é o processo de particionar um conjunto de dados em classes, chamadas de grupos, sendo que os objetos dentro de cada grupo compartilham de características semelhantes entre si. Assim sendo, cada grupo deve apresentar alta homogeneidade interna e, da mesma forma, grupos diferentes devem apresentar alta heterogeneidade entre si.

4.2.2. Análise de Regressão

O modelo de Chapman-Richards apresentou bons ajustes (Tabela 4) ao fornecer erros padrão de estimativa ($S_{yx}\%$) inferiores a 13% e eficiência na estimativa do crescimento do fungo *L. gongylophorus* ao apresentar coeficientes de determinação ajustados ($R^2_{aj.}$) superiores a 0,900. Com o menor $S_{yx}\%$ e o maior $R^2_{aj.}$ de 5,265% e 0,991, respectivamente, para o extrato à base de jenipapo.

TABELA 4 - COEFICIENTES E ESTATÍSTICAS DO MODELO DE CHAPMAN-RICHARDS PARA A ESTIMATIVA DO CRESCIMENTO *IN VITRO* DO FUNGO *Leucoagaricus gongylophorus* NOS DIFERENTES EXTRATOS VEGETAIS. CUIABÁ – MT, 2010.

Extrato	β_0	β_1	β_2	$S_{yx}\%$	$R^2_{aj.}$	F
Gonçaleiro	25,5881*	0,1169*	4,3342*	10,761	0,957	1297,15*
Carvãozinho	23,9376*	0,0671*	2,2585*	10,834	0,954	1263,14*
Jenipapo	56,2521*	0,0573*	2,4593*	5,265	0,991	5654,36*
Jatobá	42,5376*	0,0872*	4,1310*	7,527	0,984	2841,21*
Seringueira	63,8582*	0,0470*	2,0914*	8,179	0,978	2309,87*
Ingá	59,0342*	0,0533*	2,3334*	6,096	0,988	1297,15*
Pau-terra	17,021*	0,1155*	4,4552*	12,088	0,945	1023,75*
Cambará	69,3521*	0,0377*	1,8545*	6,922	0,985	3272,66*
Controle 1	32,4501*	0,0720*	1,9640*	5,910	0,981	4053,58*
Controle 2	30,3623*	0,0717*	2,1782*	7,037	0,977	2925,53*

* significativo ao nível de 5% de probabilidade.

O erro padrão da estimativa em porcentagem ($S_{yx}\%$) é o parâmetro mais eficiente para informar a qualidade dos ajustes de modelos de regressão, pois apresenta o quanto, relativamente, a equação erra, em média, ao estimar a variável dependente (MACHADO et al., 2008). Enquanto os valores das estatísticas F e dos coeficientes de regressão (β) foram significativos, o que demonstra que a variável tempo (dias) é um bom indicador da variável diâmetro (mm) para o estudo do crescimento do fungo *L. gongylophorus*.

O corte estabelecido na análise de agrupamento foi essencial na explicação do comportamento do crescimento micelial, uma vez que determinou quais os extratos vegetais que influenciaram de forma semelhante às curvas de crescimento do fungo *L. gongylophorus* (Figura 8).

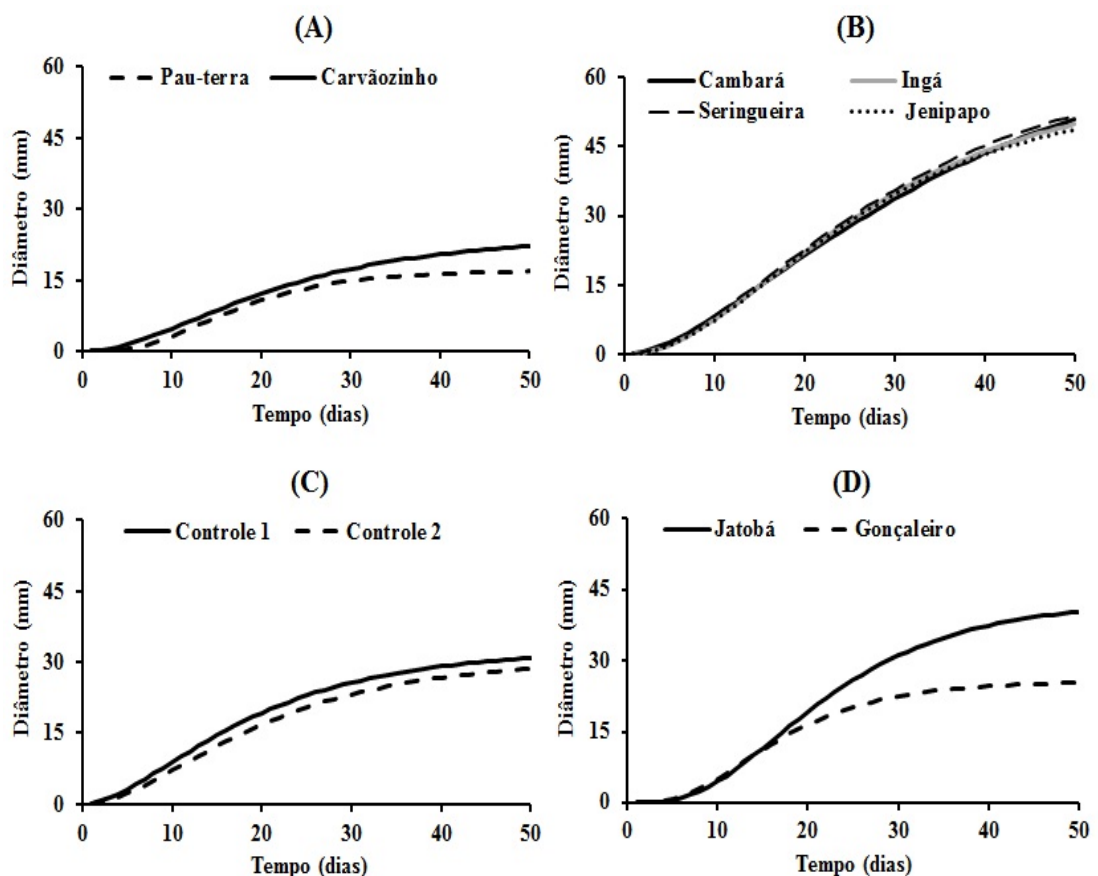


FIGURA 8 - CURVAS DE CRESCIMENTO DO FUNGO *Leucoagaricus gongylophorus* EM DIFERENTES EXTRATOS FLORESTAIS ESTIMADOS PELO MODELO DE CHAPMAN-RICHARDS. CUIABÁ – MT, 2010.

Os extratos obtidos a partir das folhas de pau-terra e carvãozinho apresentaram comportamentos semelhantes no crescimento do fungo *L. gongylophorus* ao longo do período de avaliação, com maiores valores de crescimento no extrato à base de carvãozinho e tendência à estabilização da curva de crescimento no extrato de pau-terra a partir dos 30 dias (Figura 8A). Já o grupo formado pelos extratos de cambará, ingá, seringueira e jenipapo proporcionaram os maiores crescimentos em diâmetro, com aproximadamente 50mm aos 50 dias, e comportamentos similares entre si (Figura 8B).

Os controles demonstraram tendências semelhantes em função do tempo, com os maiores diâmetros observados no controle 1. Enquanto o controle 2 demonstrou que a adição de 20ml de água destilada ao meio de cultura resultou em menor crescimento do fungo *L. gongylophorus* (Figura 8C). Os extratos à base de jatobá e gonçaleiro não resultaram em crescimentos similares a outros tratamentos pela análise de agrupamento. Desta forma, a avaliação comparativa das suas curvas (Figura 8D) demonstrou a dissimilaridade do crescimento de *L. gongylophorus* em função do tempo, com semelhança somente nos períodos iniciais de desenvolvimento do fungo, até aproximadamente 18 dias, seguido por um maior crescimento no extrato de jatobá e forte tendência à estabilização com o extrato de gonçaleiro.

O modelo de Chapman-Richards é um dos mais utilizados para modelar o crescimento biológico, devido à grande flexibilidade ao se ajustar aos diversos conjuntos de dados (ZEIDE, 1993). O que demonstrou ser eficiente para modelar o crescimento do fungo *L. gongylophorus* e comprovar a similaridade observada entre os extratos vegetais pelos resultados da análise de agrupamento. Borba et al. (2006) descreveram o comportamento de crescimento do fungo simbionte de espécies de *Acromyrmex* spp. por meio de regressão linear e quadrática, onde foi verificado apenas a precisão da curva (R^2), na qual os valores tiveram uma variação de 60,82 a 98,51. Cabe ressaltar que a regressão linear não consegue descrever precisamente o crescimento de *L. gongylophorus*, uma vez que este fungo é de crescimento lento em laboratório, caracterizado por uma fase de crescimento maior que vai se

atenuando com o passar do tempo até que o processo tenda a se estabilizar ou parar, sendo esse processo de avaliação determinado pelo fator tempo em intervalos iguais.

Segundo Godoy et al. (2006), quando o crescimento de alguns organismo vivos for estudado por longos períodos de desenvolvimento, estes podem não ser satisfatoriamente representados por funções lineares, visto que o comportamento não-linear é o que predomina nos seres vivos, em razão de sua natureza dinâmica e complexa. Para Regazzi (2003), crescimento biológico com variável idade ou período de tempo são melhores explicados por meio de regressão não-lineares, pois explicam melhor o crescimento, apresentando menores erros e maior valor da curva de precisão.

Silveira et al. (2001), ao compararem a influência da temperatura no desenvolvimento *in vitro* de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, *Geotrichum candidum* Link. ex Pers. e *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill., constataram que os modelos matemáticos não lineares explicaram melhor o comportamento do crescimento dos referidos fungos. Assim como observado por Andrade et al. (2005), que ao descreverem o desenvolvimento *in vitro* do fungo *Monosporascus cannonballus* Pollack no colapso do meloeiro, constataram que os modelos de regressão não-linear foram os mais adequados para explicar o comportamento do referido fungo do que os modelos de regressão linear.

4.3. EFEITO DOS EXTRATOS VEGETAIS EM DIFERENTES PROPORÇÕES NO DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DO FUNGO SIMBIONTE

Os extratos de folhas de cerejeira, timbó, mogno, cedro, leucena e aricá apresentaram inibição no desenvolvimento do fungo, já o extrato de seringueira foi escolhido aleatoriamente dentre as que proporcionaram boas condições de desenvolvimento. A quantidade de extrato fornecido no meio de cultura foi reduzida a fim de determinar se com a redução da quantidade adicionada ao meio de cultura, ocorre a inibição no crescimento do fungo. Em relação ao pH, houve pouca

variação nos valores das concentrações após a esterilização em autoclave e a diferença entre as concentrações foram decimais, sendo os meios contendo extrato de cerejeira e mogno, os que apresentaram maior variação, 0,22 e 0,19, respectivamente (Tabela 5).

TABELA 5 – VALORES DE pH DO MEIO BDA, DA MISTURA DO BDA COM O EXTRATO (E) APÓS A CORREÇÃO E APÓS A AUTOCLAVAGEM E A RESPECTIVA VARIAÇÃO NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS DAS ESPÉCIES UTILIZADAS NO DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE *Leucoagaricus gongylophorus*. CUIABÁ, MT, 2010.

Extrato / Concentração (v/v)	pH			Variação
	BDA	BDA + E Corrigido	BDA + E autoclavados	
Cerejeira				
1,5:10	5,63	5,43	5,21	0,22
1:10	5,63	5,37	5,26	0,11
0,5:10	5,63	5,46	5,33	0,13
Timbó				
1,5:10	5,63	5,31	5,12	0,19
1:10	5,63	5,36	5,15	0,11
0,5:10	5,63	5,39	5,27	0,12
Mogno				
1,5:10	5,61	5,62	5,86	0,11
1:10	5,61	5,61	5,78	0,08
0,5:10	5,61	5,67	5,73	0,09
Leucena				
1,5:10	5,59	5,65	5,87	0,04
1:10	5,59	5,61	5,83	0,03
0,5:10	5,59	5,59	5,76	0,04
Aricá				
1,5:10	5,59	5,41	5,28	0,13
1:10	5,59	5,48	5,37	0,11
0,5:10	5,59	5,51	5,41	0,12
Seringueira				
1,5:10	5,61	5,61	5,61	0,05
1:10	5,61	5,63	5,61	0,02
0,5:10	5,61	5,61	5,61	0,02

Continua...

Tabela 5, continuação

Extrato / Concentração (v/v)	pH			Variação
	BDA	BDA + E Corrigido	BDA + E Corrigido	
Controle				
1,5:10	5,56	-	5,54	0,02
1:10	5,56	-	5,55	0,01
0,5:10	5,56	-	5,55	0,01

De acordo com Castellani et al. (2009), o pH do meio é um fator importante na determinação de efeitos dos extratos no desenvolvimento, onde o fungo *L. gongylophorus* apresenta baixo crescimento quando submetidos a valores de pH abaixo de 4 e quando acima de 6, além de desenvolver lentamente, o meio favorece o aparecimento de microrganismos contaminantes. Nos estudos realizados por Boaretto et al. (1999) foram encontrados resultados diferentes em relação ao melhor valor do pH, para o desenvolvimento do fungo simbionte de *Atta capiguara*, sendo constatado um melhor crescimento em meio com pH de 7,5.

A quantidade de extrato adicionado no meio de cultura influenciou nos resultados, onde os meios contendo maior proporção de extratos apresentaram efeito inibitório, exceto no meio contendo extrato de seringueira, que catalisou o crescimento do fungo, onde quanto menor a proporção, menor foi o crescimento (Figura 9A). Em algumas placas com o mesmo extrato, porém com concentrações diferentes, pôde-se observar um crescimento diferenciado de acordo com a concentração, onde em proporção maiores, maior foi o efeito inibitório, como o extrato à base de mogno (Figura 9B).

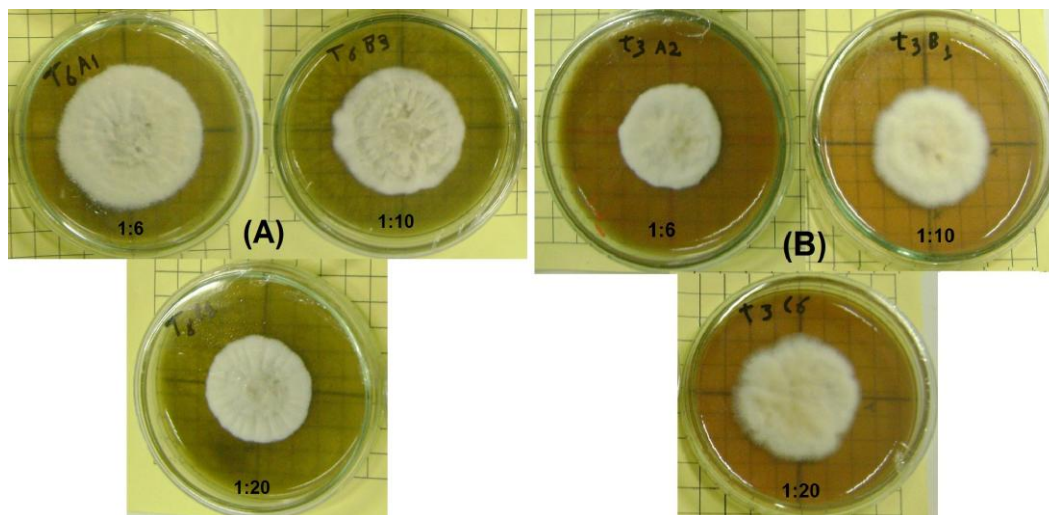


FIGURA 9 – MICÉLIO DE *Leucoagaricus gongylophorus* AOS 42 DIAS DE INCUBAÇÃO EM MEIO DE CULTURA ACRESCIDO COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE EXTRATOS VEGETAIS DE (A) SERINGUEIRA E DE (B) MOGNO. LABORATÓRIO DE PATOLOGIA FLORESTAL, FENF/UFMT. CUIABÁ, MT, 2010.

Na primeira semana de avaliação, ocorreram diferenças significativas nos extratos e nas concentrações, onde a proporção de 1,5:10 resultou em maior efeito inibitório no desenvolvimento do fungo em todos os períodos avaliados. O extrato à base de timbó foi o que mais inibiu o desenvolvimento, mesmo em proporções mais baixas. Alguns extratos apresentaram condições tão inadequadas que resultaram na morte do fungo simbiote em algumas placas ou apenas evitaram que o fungo se desenvolvesse por mais um período. Esse fato foi constatado nas maiores proporções dos extratos de cerejeira, timbó, leucena e aricá, onde o desenvolvimento foi paralisado nos períodos 21, 21, 35 e 21 dias respectivamente (Tabela 6).

TABELA 6 – CRESCIMENTO MÉDIO (mm) DE *Leucoagaricus gongylophorus* EM SEIS PERÍODOS DE INCUBAÇÃO, CULTIVADO EM TRÊS PROPORÇÕES DE EXTRATOS VEGETAIS. CUIABÁ, MT, 2010.

Extrato / Concentração (v/v)	Período de incubação (dias)					
	7	14	21	28	35	42
Cerejeira						
1,5:10	0,29 e	0,34 i	-	-	-	-
1:10	1,19 e	2,25 h	4,29 g	9,83 h	14,54 i	19,25 i
0,5:10	2,12 d	9,62 d	15,49 c	19,66 d	22,33 f	26,33 f
Timbó						
1,5:10	1,37 e	1,58 h	-	-	-	-
1:10	1,85 d	2,08 h	2,04 h	2,75 i	-	-
0,5:10	2,08 d	4,33 g	8,41 f	14,16 f	17,66 h	23,62 g
Mogno						
1,5:10	1,33 e	1,75 h	3,83 g	12,25 g	17,20 h	20,54 h
1:10	4,25 b	9,04 d	13,01 d	24,66 b	31,41 c	34,75 c
0,5:10	5,08 a	9,79 d	18,16 b	26,54 a	33,79 b	37,41 b
Cedro						
1,5:10	3,16 c	4,45 g	11,29 e	12,87 g	17,01 h	18,87 i
1:10	4,25 b	6,58 f	12,41 d	15,16 f	19,83 g	21,41 h
0,5:10	4,62 a	7,5 e	13,29 d	17,70 e	21,91 f	23,87 g
Leucena						
1,5:10	0,91 e	1,25 i	2,45 h	2,79 i	-	-
1:10	1,20 e	2,21 h	3,54 g	4,01 i	4,70 j	6,37 j
0,5:10	4,37 b	13,45 a	18,01 b	22,33 c	24,83 e	30,01 e
Aricá						
1,5:10	0,95 e	1,15 i	-	-	-	-
1:10	1,16 e	1,83 h	2,25 h	2,87 i	-	-
0,5:10	3,3 c	10,87 c	17,54 b	19,95 d	22,20 f	24,51 g
Seringueira						
1,5:10	2,08 d	12,45 b	16,70 b	26,70 a	36,04 a	44,79 a
1:10	3,25 c	12,95 b	17,87 b	21,95 c	33,12 b	43,91 a
0,5:10	4,12 b	13,5 a	17,83 b	18,95 e	26,62 d	31,29 d
Controle						
1,5:10	3,20 c	5,25 g	14,70 c	18,58 e	21,83 f	24,45 g
1:10	3,75 c	9,62 d	15,25 c	20,08 d	23,33 f	29,66 e
0,5:10	4,91 a	13,75 a	19,33 a	22,87 c	25,62 e	31,83 d
CV(%)	23,77	11,83	8,75	7,56	5,09	4,73

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Pode ser observado um maior desenvolvimento do fungo nas proporções menores de extratos vegetais em relação aos controles em todos os tratamentos. Como a quantidade de extrato reduzida, influenciou na quantidade de compostos extraídos, não sendo o suficiente para inibir o desenvolvimento do fungo e de acordo com Siqueira et al. (1998), o fungo simbiote de *A. sexdens* cresce eficientemente em componentes encontrados nas folhas, como amido e xilana, podendo estes ter catalisado o desenvolvimento.

Apesar das plantas produzirem metabólitos secundários, estes nem sempre são tóxicos a um determinado grupo de microrganismo, ou podem apenas ter efeito inibidor ao ataque, como no caso do extrato à base de jatobá, que não tem efeito deletério sobre o fungo e de acordo com Hubbell et al. (1983), essa planta funciona como um repelente para as formigas. Para Fernandes et al. (2008), algumas plantas podem causar a morte do fungo simbiote e das formigas cortadeiras, por apresentarem metabólitos secundários tóxicos, onde no campo, essas plantas têm menor preferência de corte pelas formigas.

Segundo Della Lucia et al. (2008), a obtenção de moléculas extraídas de extratos de plantas tóxicas é uma das áreas de maiores perspectivas no manejo de formigas cortadeiras, onde é necessário estudar as plantas que apresentam resistência ao ataque de formigas cortadeiras no campo, para uma possível descoberta de plantas tóxicas às formigas ou ao fungo simbiote.

Existem várias espécies vegetais com efeito comprovado em inibir o desenvolvimento do fungo simbiote e/ou eliminar formigas. Extratos de sementes, frutos e folhas velhas e novas de *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae) (gergelim) causam inibição no crescimento *in vitro* do fungo simbiote de *A. sexdens rubropilosa* (PAGNOCCA et al., 1990). Ribeiro et al. (1998) relataram que extratos dessa espécie adicionados em meio de cultura, podem causar até 60% de inibição no desenvolvimento *in vitro* do fungo simbiote. Souza et al. (2011b) relataram que as espécies *Tabebuia vellosi* (ipê amarelo), *Magonia pubescens* (Timbó), *Azadirachta indica* (Nim), *Annona reticulata* (Pinha) e *Amburana acreana* (Cerejeira) apresentaram efeito deletério sobre o

fungo simbiote de *A. sexdens*, onde ao aplicar extratos diretamente sobre o fungo, fez com que as formigas os descartassem, pois estavam impregnado com os extratos, além de constatar a presença de formigas mortas.

Pode se perceber que o fator concentração influencia fortemente nos resultados, onde praticamente as proporções, em todos os extratos, se diferenciaram significativamente, exceto nos extratos à base de timbó e seringueira. Os extratos à base de cerejeira, aricá e timbó apresentaram maior efeito inibitório nas proporções 1,5:10, 1:10 e 0,5:10, respectivamente (Tabela 6). De acordo com Miyashira et al. (2010), quando o produto a ser adicionado ao meio de cultura apresenta poder inibitório de desenvolvimento, se for adicionado em maiores concentrações, a tendência é que diminua o desenvolvimento ou podendo até mesmo matar o organismo ou interromper o crescimento em algum determinado período.

TABELA 7 – CRESCIMENTO MÉDIO (mm), DE *Leucoagaricus gongylophorus* APÓS 42 DIAS DE INCUBAÇÃO EM MEIO DE CULTURA COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE EXTRATOS VEGETAIS. CUIABÁ, MT, 2010.

Extratos	Proporção		
	1,5:10	1:10	0,5:10
Cerejeira	0,34 f C	19,25 e B	26,33 e A
Timbó	1,58 f B	2,75 g B	23,62 f A
Mogno	20,54 c C	34,75 b B	37,41 a A
Cedro	18,87 d C	21,41 d B	23,87 f A
Leucena	2,79 e C	6,37 f B	30,01 d A
Aricá	1,15 f C	2,87 g B	24,5 f A
Seringueira	44,79 a A	43,91 a B	34,29 b B
Controle	24,45 b C	29,66 c B	31,83 c A
CV(%)	5,87		

Médias seguidas pela mesma letra minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

Castellani et al. (2009) adicionaram diferentes proporções de extratos de *Pennisetum purpureum* (capim-elefante), *Hyparrhenia rufa* (capim-vermelho), *Brachiaria brizantha* (braquiária), *Saccharum officinarum* (cana-de-açúcar) variedade SP80-1842 e *Paspalum* sp.

(gramado) em meio de cultura BDA e constataram que os meios contendo extratos de *B. brizantha* apresentaram maior efeito inibitório de desenvolvimento, sendo que na maior concentração utilizada retardou o crescimento do fungo *L. gongylophorus*.

Miyashira (2007) estudando o desenvolvimento do fungo *in vitro* do fungo simbiote de *A. sexdens* incorporou diferentes doses de cafeína ao meio de cultura conhecido como “pagnocca”, na qual o fungo não sobreviveu nas maiores concentrações, 0,10% e 0,50% (p/p), já na menor concentração (0,01%) pode se perceber um beneficiamento no desenvolvimento do fungo em algumas placas, em relação ao controle.

4.4. EFEITO DOS EXTRATOS VEGETAIS NA SOBREVIVÊNCIA DE OPERÁRIAS DE *Atta sexdens* ATRAVÉS DE INGESTÃO

Como os extratos de aricá, cedro, leucena, mogno, timbó e cerejeira apresentaram inibição no desenvolvimento *in vitro* do fungo simbiote, estes foram fornecidos em dietas artificiais para as operárias de *A. sexdens rubropilosa*. As formigas não se alimentavam das dietas com extratos de cerejeira, sendo este retirado das análises. Pode se perceber que as formigas conseguem sobreviver sem a presença de dieta e água no máximo oito dias, já quando adicionado apenas água ou dieta controlada + água, a longevidade aumenta para 10 e 17 dias respectivamente (Figura 10). Bueno et al. (1997) encontraram valores diferentes, das quais as operárias de *A. sexdens* conseguiram sobreviver em dieta artificial + água e contendo apenas água por mais de 20 dias, cabe ressaltar que estes autores utilizaram estufas climatizadas para realização dos testes.

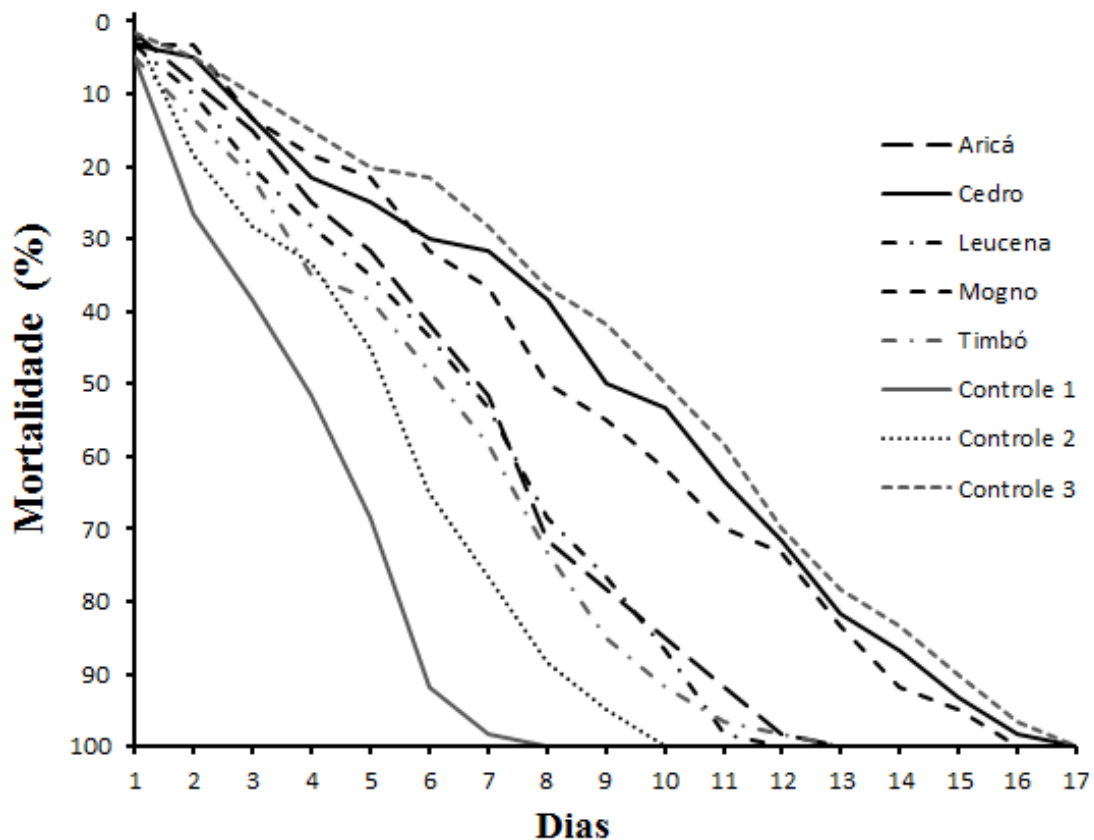


FIGURA 10 - MORTALIDADE DE OPERÁRIAS DE *Atta sexdens* ALIMENTADAS COM DIETA ARTIFICIAL À BASE DE DIFERENTES EXTRATOS VEGETAIS. CUIABÁ, MT, 2010.

De acordo com Terezan et al. (2010), operárias de *A. sexdens* sobrevivem até 20 dias em condições controladas e sem adição de componentes vegetais nas dietas. Nos estudos de Almeida et al. (2007), as operárias conseguiram sobreviver por mais de 25 dias. Um motivo que pode explicar a baixa sobrevivência das formigas é que o consumo das dietas foi baixo, pois a cada 24h as dietas recolhidas apresentavam poucos sinais de consumo, tanto nas dietas contendo extratos (Figura 11A), quanto nas condições controladas (Figura 11B).

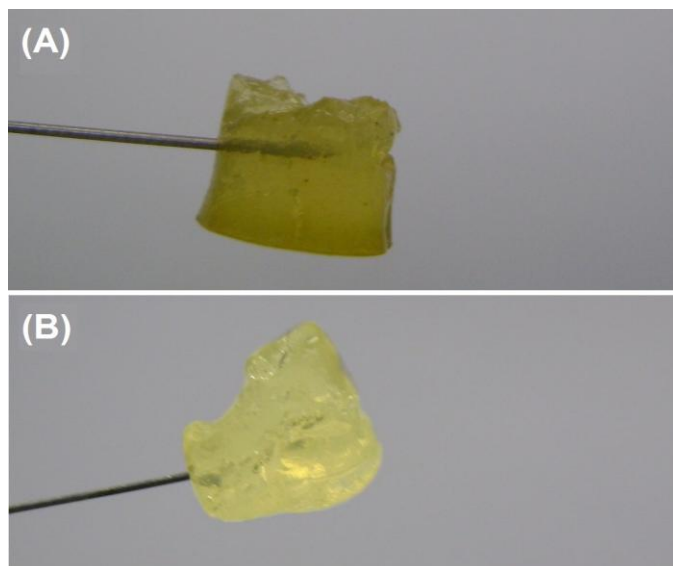


FIGURA 11 – DIETA ARTIFICIAL RECOLHIDA DAS PLACAS APOS 24H, (A) DIETA CONTENDO EXTRATO DE CEDRO E (B) DIETA NAS CONDIÇÕES DE CONTROLE. LABORATÓRIO DE PATOLOGIA FLORESTAL, FENF/UFMT. CUIABÁ, MT, 2010.

Um fator que explica o motivo das formigas sobreviverem mais nas condições controle, é devido à presença da glicose na formulação das dietas, uma vez que esta substância pode ser responsável por até 50% das necessidades nutricionais das operárias (MIYASHIRA, 2007). Silva et al. (2003) constataram um aumento na sobrevivência das saúvas em condições experimentais num período de até 25 dias, quando as dietas continham glicose em sua composição.

As dietas contendo extratos vegetais causaram mortalidade nas operárias, sendo que a dieta contendo extratos de timbó apresentou mortalidade de 100% (M_{100}) depois de 12 dias e valor médio de mortalidade de 50% (M_{50}) 6,51 dias, o qual foi significativamente igual às dietas contendo extratos de aricá e leucena, 7,01 e 7,33 dias, respectivamente (Tabela 8). É possível observar que o valor da média para M_{50} da situação de controle contendo dieta e água foi o maior para todos os tratamentos, sendo significativamente igual à dieta contendo extrato de cedro.

TABELA 8 – PERCENTUAL DE MORTALIDADE E M₅₀ DAS FORMIGAS CORTADEIRAS FORNECIDA DIARIAMENTE COM DIETA À BASE DE EXTRATOS VEGETAIS. CUIABÁ, MT, 2010.

Dietas	Dias					M ₅₀ ¹
	4	8	12	16	20	
Aricá	25	72	98	100	100	7,01 ± 3,14 c
Cedro	22	38	72	98	100	9,67 ± 3,60 a
Leucena	28	68	100	100	100	7,33 ± 3,20 c
Mogno	18	50	73	100	100	8,33 ± 3,38 b
Timbó	35	73	98	100	100	6,51 ± 3,02 c
Controle 1	52	100	100	100	100	4,16 ± 2,53 d
Controle 2	33	88	100	100	100	5,16 ± 2,77 d
Controle 3	15	37	70	97	100	10,83 ± 3,79 a
F	-	-	-	-	-	19,37
CV(%)	-	-	-	-	-	15,86

¹ Dados transformados $\sqrt{X + 0,5}$.

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

O fato de fornecer dieta com água não influenciou no aumento da sobrevivência das saúvas, pois os valores de M₅₀ para os controles sem água e sem dieta e os de apenas água (4,16 e 5,16 respectivamente) foram significativamente iguais, sendo que esses resultados corroboram com os obtidos por Miyashira (2007) que estudando o efeito da cafeína adicionado em dietas para as formigas relataram que nas situações dos controles (iguais ao deste trabalho) apresentaram resultados significativamente iguais, sendo possível observar que o valor da média para M₅₀ da situação controle foi o maior entre todos os tratamentos nas duas procedências de formigas, 8,00 e 10,67, respectivamente, mostrando que as saúvas sobreviveram por mais tempo quando a dieta sem cafeína e a tampa com algodão e água foram fornecidas.

As dietas contendo extrato de mogno apresentaram a menor mortalidade dos extratos, pois as formigas sobreviveram por até 16 dias, e tiveram M₅₀ em cerca de oito dias. Bueno et al. (2005) acrescentaram extratos de diferentes partes vegetais de *Cedrela fissilis* em dietas artificiais para *A. sexdens rubropilosa*, na qual apresentou M₁₀₀ ao 15 dias de experimento e M₅₀ aos oito dias, na qual foi significativamente

maior quando a extração dos compostos secundários foi à base de metanol.

Peñaflor et al. (2009) analisaram extratos de diversas partes vegetais de *S. versicolor* (caixeta) adicionados às dietas artificiais para as formigas cortadeiras e em meios de cultura para o fungo simbiote, onde os autores constataram que extratos das folhas adicionados nas dietas provocam M_{50} em torno de 16 e 10 dias respectivamente. Miyashira (2007) adicionou terrores de cafeína em dietas artificiais para alimentação de *A. sexdens rubropilosa*, onde algumas formigas as rejeitaram, mesmo em menores concentrações, e outros que se alimentam dessas dietas acabam mortos, sendo essa substância responsável por acelerar a morte dos insetos.

Terezan et al. (2010) verificaram o efeito dos componentes encontrados em nas folhas de *Spiranthera odoratissima* St. Hil (manacá), nas formigas e no fungo simbiote, sendo as extrações realizadas à base dos extrativos hexano (HEX), diclorometano (DIC) e metanol (MET), onde no desenvolvimento *in vitro* de *L. gongylophorus* provocou uma inibição em torno de 100%, já quando adicionado nas dietas artificiais para *A. sexdens rubropilosa*, a extração à base de hexano, teve M_{50} aos 5 dias de experimento sendo observado uma sobrevivência de no máximo 18 dias em todas as repetições.

Almeida et al. (2007) verificaram o efeito dos componentes encontrados em diversas partes vegetais de *Helietta puberula* RE Fr. (canela-de-veado) nas formigas e no fungo simbiote, sendo as extrações realizadas à base dos extrativos hexano, diclorometano e metanol, onde as extrações de todas as partes (folhas, caule e ramos) foram capazes de provocar uma inibição quase que total no desenvolvimento *in vitro* de *L. gongylophorus*. Quando adicionados nas dietas artificiais para *A. sexdens rubropilosa*, a extração foliar à base de hexano, teve M_{50} aos 5 dias de experimento sendo observado uma sobrevivência média de no máximo 15 dias.

5. CONCLUSÕES

- Os meios contendo extratos de *Physocalymma scaberrimum*, *Amburana acreana*, *Cedrela fissilis*, *Magonia pubescens*, *Leucaena leucocephala* e *Swietenia macrophylla* prejudicam o desenvolvimento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, enquanto os meios contendo os extratos de *Genipa americana*, *Hevea brasiliensis*, *Inga edulis* e *Vochysia divergens* propiciam melhores condições ao desenvolvimento;
- A análise estatística multivariada de agrupamento é eficiente para discriminar o comportamento do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* nos meios de cultura com a adição dos extratos vegetais, bem como a regressão não-linear, com o modelo de Chapman-Richards, pode descrever e estimar o crescimento desse fungo em meio de cultura;
- Diferentes concentrações de extrato foliares adicionado ao meio de cultura podem eliminar, interromper ou beneficiar o desenvolvimento do fungo, em função da concentração;
- As formigas conseguem sobreviver, em condições de laboratório sem presença de água ou alimento, já quando há fornecimento disso, essa sobrevivência aumenta, entretanto se adicionados extratos, tais como os de leucena podem causar mortalidade;
- Os extratos vegetais que inibiram o desenvolvimento do fungo simbiote e causaram mortalidade nas formigas, devem ser melhores analisados, descobrindo os grupos químicos presentes nas folhas, sendo analisado cada componente isoladamente, podendo assim contribuir com o manejo integrado de pragas (MIP) de formigas cortadeiras, fornecendo outras moléculas tóxicas que possam ser usados para controle desses insetos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, M. A. DE; FERREIRA, R. L. C.; SILVA, J. A. A.; SANTOS, E. S.; STOSIC, B.; SOUZA, A. L. Estabilidade em análise de agrupamento: estudo de caso em ciência florestal. **Revista Árvore**, Viçosa, v.30, n.2, p.257-265, 2006.

ALMEIDA, R. N. A., PEÑAFLORES, M. F. G. V.; SIMOTE, S. Y.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F. Toxicity of substances isolated from *Helietta puberula* Re Fr. (Rutaceae) to the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. **Bioassay**. v.2, n.2, p.1-8, 2007.

ALVES, R.; BELO, O. **Mineração de dados em sistemas multidimensionais**. Relatório Técnico 001, Universidade do Minho. Braga – Portugal. 2003, 10p.

AMANTE, E. **Influência de alguns fatores microclimáticos sobre a formiga saúva *Atta laevigata* (F. Smith, 1858), *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908, *Atta bisphaerica* Forel, 1908 e *Atta capiguara* Gonçalves, 1944 (Hymenoptera, Formicidae), em formigueiros localizados no Estado de São Paulo**. 1972. 175f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, USP-SP.

ANDRADE, D. E. G. T.; MICHEREFF, S. J.; BORGES, M. A. S.; ARAÚJO, I. B.; SALES JR., R. Influência da densidade de inóculo e de isolados de *Monosporascus cannonballus* na severidade do colapso do meloeiro. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.31, n.2, p.173-180, 2005.

ANJOS, N.; DELLA LUCIA, T. M. C.; MAYHÉ NUNES, A. J. **Guia prático sobre formigas cortadeiras em reflorestamento**. Ponte Nova, MG: Graff Cor, 1998. 100p.

BOARETTO, M. A. C.; FORTI, L. C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. **Série Técnica IPEF**. Piracicaba. v.11, n.30, p.31-46, 1997.

BOARETTO, M.A.C.; FORTI, L.C.; FENILLE, R.C. Influência do pH e temperatura no crescimento do fungo simbiote de *Atta capiguara* Gonçalves (Hymenoptera: Formicidae). **Naturalia**, v.24, p.41-43, 1999.

BORBA, R. S.; LOECKI, A. E.; BANDEIRA, J. M.; MORAES, C. L.; CENTENARO E. D. Crescimento do fungo simbiote de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* em meios de cultura com diferentes extratos. **Ciência Rural**. Santa Maria. v.36, n.3, p.725-730, 2006.

BUENO O. C.; BUENO, F. C.; DINIZ, E. A.; SCHNEIDER, M. O. Utilização de alimentos pelas formigas cortadeiras. **Insetos Sociais da biologia à aplicação**, 2008, p.96-114, 442p.

BUENO, F. C.; GODOY, M. P.; LEITE, A. C.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B.; HEBLING, M. J. A.; BACCI JR, M.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F. Toxicity of *Cedrela fissilis* to *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and its symbiotic fungus. **Sociobiology**. v.45, n.2, p.389-99, 2005.

BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; SILVA, O. A.; MATENHAUER, A. M. C. Effect of sesame (*Sesamum indicum*) on the nest development of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Applied Entomology**. v.119, p.341-343, 1995.

BUENO, O. C.; BUENO, F. C.; BETELLA, G.; MORINI, M. S. C.; HEBLING, M. J. A.; PAGNOCCA, F. C.; LEITE, A. C.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B. Toxicity of sesame extracts to leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera:Formicidae). **Sociobiology**. v.44, n.3, p.599-606, 2004.

BUENO, O. C.; BUENO, F. C.; DINIZ, E. A.; SCHNEIDER, M. O. Utilização de alimentos pelas formigas-cortadeiras. In: VILELA, E. F.; SANTOS, I. A.; SCHOEREDER, J. H.; SERRÃO, J. E.; CAMPOS, L. A. O.; LINO-NETO, J. (Ed.). **Insetos sociais: da biologia a aplicação**. UFV, Viçosa-MG, 2008. v.1. p.97-114, 441p.

BUENO, O. C.; MORINI, M. S. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A.; SILVA, O. A. Sobrevivência de Operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) Isoladas do Formigueiro e Alimentadas com Dietas Artificiais. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.26, n.1, p.107-113, 1997.

CAMARGO, R. S.; FORTI, L. C.; ROCHA, M. M.; MATOS, C. A. O.; LOPES, J. F.; ANDRADE, A. P. P.; VERZA, S. S. The effect of plant diversity on fungus garden development and foraging behavior of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**. v.42, n.2, p.1-10, 2003.

CARLOS, A. A. **Influência da polpa cítrica, do óleo e de fungos filamentosos na atratividade de iscas tóxicas à *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera, Formicidae)**. 2008. 90 f. Tese (Doutorado em proteção de plantas) Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" UNESP - Botucatu - SP.

CASTELLANI, M. A.; FORTI, L. C.; FENILLE, R. C.; MOREIRA, A.A.; ANDRADE, A. P. P.; NOVCAES, Q. S. Isolation and growth of the symbiotic fungus of *Atta capiguara* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v.50, n.3, p.959-972, 2007.

CASTELLANI, M. A.; FORTI, L. C.; FENILLE, R. C.; RAETANO, C. G.; MOREIRA, A. A.; ANDRADE, A. P. P.; CAMARGO, R. S.; LEMOS, R. N. S.; AGUIAR, A. G.; NAGAMOTO, N. S. Growth of the Symbiotic Fungus of the Grass-cutting Ant *Atta capiguara* (Hymenoptera: Formicidae): Effect of Grass Extracts. **Sociobiology**. v.54, n.1, p.283-298, 2009.

CAZIN JR., J.; WIEMER, D. F.; HOWARD, J. J. Isolation, growth characteristics, and long-term storage of fungi cultivated by Attini ants. **Applied and Environmental Microbiology**. v.55, p.1346-1350, 1989.

CHERRET, J. M. History of the leaf-cutting ant problems. In: LOFGREN, C.S.; VANDER MEER, R.K. (Eds.) **Fire ants and leaf cutting ants: biology and management**. Boulder, Westview Press: p.10–17. 1986.

CHERRETT, J. M. Some factors involved in the selection of vegetable substrate by *Atta cephalotes* (L.) (Hymenoptera: Formicidae) in tropical rain forest. **Journal of Animal Ecology**. v.41, n.2, p.647-660, 1972.

CHERRETT, J. M.; E. SEAFORD, C. E. Phytochemical arrestants for the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) with some notes on the ants' response. **Bulletin of Entomological Research**. v.59, n.1, p.615-625, 1970.

CHERRETT, J. M.; POWELL, R. J.; STRADLING, D. J. The mutualism between leaf-cutting ants and their fungus. In: WILDING N. (ed.), **Insect-Fungus Interactions: Proceedings of the 14th Symposium of the Royal Entomological Society of London**. Department of Physics, Imperial College, Academic Press, London 1989, p.16-17, 120pp.

CRAVEN, S. E.; DIX, M. W.; MICHAELS, G. E. Attini fungus gardens contain yeasts. **Science**. v.169, n.1, p.184-186, 1970.

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

DELLA LUCIA, T. M. C., FOWLER, H. G. As formigas cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **As formigas cortadeiras**. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 1993. p.01–03.

DELLA LUCIA, T. M. C.; MARINHO, C. G. S.; RIBEIRO, M. M. R. Perspectiva no manejo de formigas-cortadeiras. In: VILELA, E. F.; SANTOS, I. A.; SCHOEREDER, J. H.; SERRÃO, J. E.; CAMPOS, L. A. O.; LINO-NETO, J. (Ed.). **Insetos sociais: da biologia a aplicação**. UFV, Viçosa-MG, 2008. v.1. p.371-380, 441p.

DEQUECH, S. T. B.; RIBEIRO, L. P.; SAUSEN, C. D.; EGEWARTH, R.; KRUSE, N. D. Fitotoxicidade causada por inseticidas botânicos em feijão-de-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado em estufa plástica. **Revista da FZVA**. Uruguaiana, v.15, n.1, p.71-80, 2008.

FERNANDES, J. B.; DAVID, V.; FACCHINI, P. H.; SILVA, M. F. G. F.; RODRIGUES FILHO, E.; VIEIRA, P. C. Extrações de óleos de sementes de citros e suas atividades sobre a formiga cortadeira *Atta sexdens* e seu fungo simbiote. **Química Nova**, São Paulo. v.25, n.6, p.1091-1095, 2002.

FERNANDES, J. B.; ZAVEM, C.; LEITE, A. C.; SIMOTE, S. Y.; FACCHINI, P. H.; TEREZAN, A. P.; et al. Produtos naturais no controle de formigas-cortadeiras. In: VILELA, E. F.; SANTOS, I. A.; SCHOEREDER, J. H.; SERRÃO, J. E.; CAMPOS, L. A. O.; LINO-NETO, J. (Eds.). **Insetos sociais: da biologia a aplicação**. UFV, Viçosa-MG, 2008. v.1. p.381-391, 441p.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v.6, p.36-41, 2008.

FLORIANO, E. P. MÜLLER, I.; FINGER, C. A. G.; SCHNEIDER, P. R. A. Seleção de modelos tradicionais para série temporal de dados de altura das árvores. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.16, n.2, p.177-199, 2006.

FORTI, L. C; ANDRADE, A. P. P. Ingestão de líquidos por *Atta sexdens* (L.) (Hymenoptera: Formicidae) durante a atividade forrageira e na preparação do substrato em condições de laboratório. **Naturalia**, Rio Claro, v.24, n.1, p.61-63, 1999.

GARCIA, I. P. FORTI, L. C.; ENGEL, V. L.; ANDRADE, A. P. P.; WILCKEN, C. F. Ecological Interaction Between *Atta sexdens* (Hymenoptera: Formicidae) and the Vegetation of a Mesophyll Semideciduous Forest Fragment in Botucatu, SP, Brazil. **Sociobiology**, v.42, n.2, p.265-283, 2003.

GODOY, M. F.; TAKAKURA, I. T.; CORREA, P. R. Relevância da análise do comportamento dinâmico não-linear (Teoria do Caos) como elemento prognóstico de morbidade e mortalidade em pacientes submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica. **Arquivos de Ciência da Saúde**, Umuarama, v.12, n.4, p.167-71, 2006.

HAIR JÚNIOR, J. F; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L.; BLACK, W. C. **Análise multivariada de dados**. 5 ed. Porto Alegre: Bookman, 2005. 597p.

HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C. et al. Toxic effects of *Canavalia ensiformis* L. (Leguminosae) on laboratory colonies of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Applied Entomology**. v.124, p.33-35, 2000.

HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; SILVA, O. A. A.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. Derivados de plantas tóxicas como alternativa potencial para o controle de formigas cortadeiras. **Anais do III, Curso de Atualização no Controle de Formigas Cortadeiras**. PCMIP/IPEF, p.8-10, 1994.

HEBLING, M. J. A.; MAROTI, P. S.; BUENO, O. C.; SILVA, O. A.; PAGNOCCA, F. C. Toxic effects of leaves of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) to laboratory nests of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Bulletin of Entomological Research**, v.86, p.253-256, 1996.

- HOLLOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants**. Cambridge: Harvard University, 1990. 732p.
- HOWARD, J. J.; CAZIN JR., J.; WIEMER, D. F. Toxicity of terpenoid deterrents to the leafcutting ant *Atta cephalotes* and its mutualistic fungus. **Journal of Chemical Ecology**, v.14, p.59-69, 1988.
- HUBBEL, S. P.; WIEMER, D. F.; ADEJARE, A. An antifungal terpenoid defends a neotropical tree (Hymenaea) against attack by fungus-growing ants (*Atta*). **Oecologia**, Berlin, v.60, n.3, p.321-327, 1983.
- ISMAN, M.B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**. Guildford, v.19. p.603–608, 2000.
- LOECK, A. E.; PIEROBOM, C. R.; GUSMÃO, L. G.; AFONSO, A. P. Growth of symbiont fungi of some higher Attini ants in mineral medium. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.34, p.79-82, 2004.
- MACHADO, S. A.; NASCIMENTO, R. G.M.; AUGUSTYNCZIK, A. L. D.; SILVA, L. C. R. da; FIGURA, M. A.; PEREIRA, E. M.; TÊO, S. J. Comportamento da relação hipsométrica de *Araucaria angustifolia* no capão da Engenharia Florestal da UFPR. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n. 56, p. 5-16, 2008.
- MACHADO, S. A; CONCEIÇÃO, M. B.; FIGUEIREDO, D. J. Modelagem do volume individual para diferentes idades e regimes de desbaste em plantações de *Pinus oocarpa*. **Ciências Exatas e Naturais**, Curitiba, v.4, n.2, p.185-196, 2002.
- MARTIN, M. M. **Invertebrate-microbial interactions**. Ithaca: Cornell University, 1987. 148p.
- MARTINEZ, S. S. **O nim – *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção**. Instituto Agrônômico do Paraná. Londrina, 2002. 142p.
- MIYASHIRA, C. H.; **Influência da cafeína na sobrevivência de saúvas *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) e no crescimento *in vitro* de seu fungo mutualista**. 2007 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências Botânicas) – Universidade de São Paulo, USP - São Paulo/ SP.
- MIYASHIRA, C. H.; TANIGUSHI, D. G.; GUGLIOTTA, A. M.; SANTOS, D. Y. A. C. Comparison of radial growth rate of the mutualistic fungus of *Atta sexdens rubropilosa* Forel in two culture media. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.41, p.506-511, 2010.
- MORDUE, A. J.; BLACKWELL, A. Azadirachtin: an update. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v.39, p.903-924, 1993.

MUDD, A.; BATEMAN, G. L. Rates of growth of the food fungus of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.) (Hymenoptera: Formicidae) on different substrates gathered by the ants. **Bulletin of Entomologic Research**. v.69, p.141-148, 1979.

NORTH, R. D.; JACKSON, C. W. HOWSE, P. E. Communication between the fungus garden and workers of the leaf-cutting ant, *Atta sexdens rubropilosa*, regarding choice of substrate for the fungus. **Physiological Entomology**. Oxford, v.24, p.127–133, 1999.

OLIVEIRA, M. F. S. S. **Controle de formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae) com produtos naturais**. 2006, 125f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" UNESP – Rio Claro/SP.

PAGNOCCA, F. C.; SILVA, O. A.; HEBLING-BERALDO, M. J.; BUENO, O. C. Toxicity of sesame extracts to the symbiotic fungus of leaf cutting ants. **Bulletin of Entomological Research**, v.80, n.3, p.349-352, 1990.

PEÑAFLORES, M.F. G. V.; ALMEIDA, R. N. A.; SIMOTE, S. Y.; YAMANE, E.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; PAGNOCCA, F. C. Toxicity of Substances Isolated from *Simarouba versicolor* St. Hil. (Simaroubaceae) to the Leaf-cutting Ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae) and the Symbiotic Fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. **BioAssay**, v.4, p.1, 2009.

PERES FILHO, O. **Entomologia Florestal: Formigas Cortadeiras**. Apostila de Graduação em Engenharia Florestal. Cuiabá: UFMT/FENF, 2002. 84p.

PERES FILHO, O.; DORVAL, A.; BERTI FILHO, E. **A Entomofauna Associada à Teca, *Tectona grandis* L.f. no Estado de Mato Grosso**. Piracicaba: IPEF, 2006. 58p.

PERES FILHO, O.; DORVAL, A. Efeito de formulações granuladas de diferentes produtos químicos e à base de folhas e de sementes de gergelim, *Sesamum indicum*, no controle de formigueiros de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.13, n.2, p.67-70, 2003.

PERES FILHO, O.; DORVAL, A.; BERTI FILHO, E. Preferência de saúva limão, *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera, Formicidae) a diferentes espécies florestais, em condições de laboratório. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.12, n.2, p.1-7, 2002.

PIERIK, R. L. M. **In vitro culture of higher plants**. Dordrecht, Martinus Nyhoff Publishers. 1987, 344p.

PINTERA, A. Selection of plants utilized by *Atta insularis* in Cuba (Hymenoptera: Formicidae). **Acta Entomologica Bohemoslovaca**. v.80, p.13-20, 1983.

PUNTAR, S. G. **Métodos e visualização de agrupamentos de dados**. 2003. 131 f. Dissertação (Mestrado em Ciências em Engenharia Civil) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ - Rio de Janeiro/RJ.

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

REGAZZI, A. J. Teste para verificar a igualdade de parâmetros e a identidade de modelos de regressão não-linear. **Ceres**, Viçosa, v.50, n.287, p.9-26, 2003.

RIBEIRO, S. B.; PAGNOCCA, F. C.; VICTOR, S. R.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J.; BACCI Jr., M.; SILVA, O. A.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F. Activity of Sesame Leaf Extracts Against the Symbiotic Fungus of *Atta sexdens* L. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v.27, n.3, p.421-426, 1998.

ROCES, F.; HÖLLDOBLER, B. Leaf density and a trade-off load-size selection and recruitment behavior in the ant *Atta cephalotes*. **Oecologia**. v.97, n.1-8, 1994.

RODRIGUEZ, C. H.; VENDRAMIM, J. D. Toxicidad de extractos acuosos de Meliaceae en *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Manejo Integrado de Plagas**. v.42, p.14-22, 1996.

ROEL, A. R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. **Revista internacional de desenvolvimento local**. v.1, n.2, p.43-50, 2001.

SAITO, M. L. **As Plantas Praguicidas: alternativa para o controle de pragas da agricultura**. Embrapa-Meio Ambiente. Jaguariúna, 2004, 4p.

SAS INSTITUTE. SAS/STAT[®] 9.2 **User's Guide Cary**: SAS Institute Inc., 2008. 64 p.

SCHLINDWEIN, M. N.; FOWLER, H. G. **Como as saúvas escolhem seu alvo**. Estudos revelam como a saúva-limão localiza e corta as plantas de que precisa. **Ciência Hoje**, 1999, v.25, 68p.

SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review of Entomology**. v.35, p.271-297, 1990.

SCHNEIDER, M. O. **Comportamento de cuidado da prole da saúvalimão *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae).** 2003. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" UNESP – Rio Claro/SP.

SCHULTZ, T. R.; MUELLER, U. G.; CURRIE, C. R.; REHNER S. A. **Reciprocal illumination: A comparison of agriculture of humans and in fungus-growing ants.** Insect-Fungal Association: Ecology and Evolution. New York: Oxford University Press, 2005, p.149-190, 333p.

SHAPIRO, M.; ROBERTSON, J. L.; WEBB, R. E. Effect of neem seed extract upon the *Gypsy moth* (Lepidoptera: Lymantriidae) and its nuclear polyhedrosis virus. **Ecological Entomology.** v.87, p.356-360, 1994.

SILVA, A. S.; BACCI JR., M.; SIQUEIRA, C. G.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. **Journal of Insect Physiology,** v.49, n1, p.307-313, 2003.

SILVEIRA, N. S. S.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R.; TAVARES, L. A.; MAIA, L. C. Influência da temperatura, período de molhamento e concentração do inóculo de fungos na incidência de podridões pós-colheita em frutos de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira,** Brasília, v.26, n.1, p.33-38, 2001.

SIQUEIRA, C. G.; BACCI JR.; M. PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. **Applied and environmental microbiology,** v.64, p.4820-4822, 1998.

SOUZA, A. P.; VENDRAMIM, J. D. Atividade Inseticida de Extratos Aquosos de Meliáceas sobre a Mosca-branca *Bemisia tabaci* (Genn.) Biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). **Neotropical Entomology.** v.30, n.1, p.133-137, 2001.

SOUZA, M. D.; PERES FILHO, O.; CALDEIRA, S. F.; PELISSARI, A. L.; DORVAL, A. Análise de agrupamento e regressão não-linear aplicados ao crescimento *in vitro* de *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller em meios de cultura acrescido com diferentes extratos vegetais. **Biotemas,** v.24, n.4, p.83-91, 2011a.

SOUZA, M. D.; PERES FILHO, O.; DORVAL, A. Efeito de extratos naturais de folhas vegetais em *Leucoagaricus gongylophorus* (Möller) Singer, (Agaricales: Agaricaceae). **Ambiência.** v.7, n.3, p.461-471, 2011b.

SOUZA, M. D. ; PERES FILHO, O. ; CALDEIRA, S. F. ; DORVAL, A. ; GUSMÃO, R. S. Desenvolvimento *in vitro* de *Leucoagaricus gongylophorus* (Möller) Singer, fungo simbiote de *Atta sexedens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) em dois meios de cultura. In: III Simpósio Regional da Pós Graduação em Ciências Florestais e Ambientais. **Artigo Completo**. 2010, Cuiabá: UFMT. v.1, p.7-11, 228p.

TEREZAN, A. P.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; PAGNOCCA, F. C.; ALMEIDA, R. N.; BUENO, O. C.; ROSSI, R. A. Isolamento das substâncias do Extrato Bioativo obtido dos galhos de *Spiranthera odoratissima* St. Hil. **Systematics and Ecology**. São Paulo. v.31, n. 7, p.805-807, 2003.

TEREZAN, A. P.; ROSSI, R. A.; ALMEIDA, R. N. A.; FREITAS, T. G.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; PIRANI, J. R. Activities of Extracts and Compounds from *Spiranthera odoratissima* St. Hil. (Rutaceae) in leaf-cutting Ants and their symbiotic Fungus. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.00, n.00, p.1-5, 2010.

VENDRAMIM, J. D.; CASTIGLIONI, E. Aleloquímicos, resistência de plantas e plantas inseticidas, **Bases e técnicas do manejo de insetos**, cap. 8. Santa Maria, UFSM/CCR/DFS, Palloti, 2000, p.113-128, 248p.

VICTOR, S. R.; CRISÓSTOMO, F. R.; BUENO, F. C.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B.; CORREA, A. G.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; BACCI JR, M. VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F. Toxicity of synthetic piperonyl compounds to leaf-cutting ants and their symbiotic fungus. **Pest management science**. v.57, p.603-608, 2001.

WETTERER, J. K. Diel changes in forager size, activity, and load selectivity in the tropical leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. **Ecological Entomology**. v.15, p.97-109, 1989.

WETTERER, J. K. Nourishment and evolution in fungus-growing ants and their fungi. In: HUNT, J. H.; NALEPA, C. A. (Eds.). **Nourishment and evolution in insect societies**. Westview Press, Boulder Colorado. 1994, 309 p.

WIESBROOK, M. L. Natural indeed: are natural insecticides safer and better than conventional insecticides. **Illinois Pesticide Review**, Urbana, v.17, n.3, p.1-3, 2004.

ZANETTI, R.; CARVALHO, G. A.; SANTOS, A.; SILVA, A S.; GODOY, M. S. **Manejo integrado de formigas cortadeiras**. Lavras: UFLA, 2002. 16p.

ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J. C.; SOUZA-SILVA, A.; ABREU L. G. Eficiência de isca formicida aplicada sobre o monte de terra solta de ninho de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Árvore**. Viçosa, v.27, n.3, p.407-410, 2003.

ZANUNCIO, J. C.; SOSSAI, M. F.; ZANUNCIO JUNIOR, J. S.; OLIVEIRA, H. N. Influência das iscas formicidas Mirex-S Max e Blitz na paralisação de corte e no controle de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Árvore**. Viçosa, v.26, n.2, p.237-242, 2002.

ZAYAS, F. M. **Entomofauna Cubana**. Tomo VIII. Editorial Científica. Cuba, 1981, 62p.

ZEIDE, B. Analysis of growth equations. **Forest Science**, Bethesda, v.30, n.3, p.594-616, 1993.