

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Influência da comunidade microbiana do solo no estabelecimento de
sauveiros iniciais de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908
(Hymenoptera: Formicidae)**

Ohana Daroszewski Rodrigues

Dissertação apresentada, para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

**Piracicaba
2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Ohana Daroszewski Rodrigues
Bióloga

**Influência da comunidade microbiana do solo no estabelecimento de saúveiros
iniciais de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae)**

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ MAURÍCIO SIMÕES BENTO**

Dissertação apresentada, para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração
Entomologia

**Piracicaba
2007**

“Dedico este trabalho aos meus familiares e amigos”

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Maurício Simões Bento pela orientação, paciência, compreensão e apoio durante a condução do trabalho e redação do manuscrito;

À CAPES, pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho;

Ao Engenheiro Agrônomo Erich Stingel por disponibilizar a estrutura do CTC e pelo auxílio tanto no planejamento quanto na parte de campo do trabalho;

Ao Centro de Tecnologia Canavieira pelo apoio e interesse pela pesquisa;

Ao Prof. Dr. Márcio Rodrigues Lambais por disponibilizar o Laboratório de Biologia Molecular para as análises do trabalho;

À Prof^a.Dr^a, Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso por permitir a utilização do Laboratório de Microbiologia do Solo para a realização das análises microbiológicas;

Ao Prof. Dr. Sérgio Batista Alves pelo auxílio no isolamento e identificação dos entomopatógenos, e em especial à Solange Aparecida Vieira pela ajuda;

Aos funcionários do Departamento de Solos, Luis Fernando Baldesin, Waldmir e Denise L. C. Mescolotti, pela ajuda durante a condução dos experimentos.

Ao Vitalis Wafula Wekesa pela amizade, incentivo e ajuda durante as análises estatísticas;

À Cristiane Nardi pela amizade, apoio, incentivo e paciência durante minha estadia em Piracicaba;

À Nancy Barreto-Triana pela amizade e por fazer me sentir parte de sua família;

Ao Prof. Dr. Paulo Marçal Fernandes da Universidade Federal de Goiás, pela formação inicial, apoio, amizade e confiança;

Aos colegas do Laboratório de Comportamento de Insetos: Maria Fernanda, André, Newton, Ana Lia, Renata e Rejane, pela amizade e convívio;

Aos colegas do Departamento de Solos, do Laboratório de Biologia Molecular, Carolina, Robinson, Gisele, Lucas, Cristiane, Rafael e Márcio, em especial ao Rafael e ao Márcio Morais pela ajuda e paciência durante a realização dos experimentos e análise dos dados e do Laboratório de Microbiologia do Solo, Dilmar Baretta, pelas discussões e Rafael pelas novas perspectivas geradas pelo trabalho;

A todos os professores, colegas e funcionários do programa de Pós-graduação em Entomologia da ESALQ-USP pelo convívio e aprendizado;

A minha família pelo incentivo, carinho, paciência e apoio nos momentos de dificuldade;

Ao Vinicius Borges Horbylon, pelo incentivo, paciência e apoio;

Aos meus amigos, Anamaria, Sejana, Welinton, Mateus e Luciana pelo apoio incondicional e amizade sincera independente da distância que nos separou;

Ao Leonardo Dantas da Silva pela amizade e apoio;

Aos amigos, Samuel Martineli, Fernando Joly Campos, Valerie Maquère, Eliane Gonçalves, Jozé Montoya, Silvana, Thiago, Rodrigo, Thaiz e Gabriela pelos momentos de alegria e descontração;

À todos que estiveram envolvidos direta ou indiretamente neste trabalho;

Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 DESENVOLVIMENTO	14
2.1 Revisão bibliográfica	14
2.1.1 As saúvas.....	14
2.1.2 Os microrganismos do solo.....	17
2.1.3 Alterações no solo causadas por formigas.....	21
2.2 Material e métodos.....	22
2.2.1 Área de estudo.....	22
2.2.2 Coleta e manutenção de iças em laboratório	23
2.2.3. Marcação e avaliação dos sauveiros em campo.....	24
2.2.4. Coleta das amostras de solo	27
2.2.4.1 Análises químicas e físicas do solo.....	27
2.2.4.2 Análises microbiológicas	29
2.2.4.2.1 Carbono na biomassa microbiana (CBM)	29
2.2.4.2.2 Número mais provável (NMP) de fungos e bactérias	29
2.2.4.2.3 Contagem de actinomicetos	31
2.2.5 Diversidade bacteriana.....	32
2.2.5.1 Extração do DNA total do solo	32
2.2.5.2 PCR.....	32
2.2.5.3 DGGE.....	33
2.2.6 Análises estatísticas.....	34
2.3 Resultados	35
2.4 Discussão.....	49
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
REFERÊNCIAS.....	54

RESUMO

Influência da comunidade microbiana do solo no estabelecimento de saúveiros iniciais de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae)

O presente trabalho teve como objetivo comparar o estabelecimento de saúveiros iniciais em duas áreas de cultivo de cana-de-açúcar com solos de diferentes texturas (médio-argilosa e argilosa) e verificar a influência dos fatores químicos e microbiológicos desses solos no estabelecimento de formigueiros iniciais de *A. sexdens rubropilosa*. Os saúveiros iniciais foram demarcados após a penetração das içás no solo a partir da revoada. As avaliações foram conduzidas após 40 dias da revoada e foram mantidas semanalmente, por um período de 120 dias ou até a reabertura do canal inicial dos ninhos para forrageamento. No experimento de laboratório, as rainhas foram acondicionadas em potes com solo das duas áreas em $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e UR 70%. As avaliações de laboratório foram feitas seguindo-se a mesma metodologia de campo, verificando a atividade dos saúveiros. Os saúveiros mortos foram descartados e as rainhas, foram utilizadas para isolamento de microrganismos para associá-los à causa da morte. As análises dos fatores químicos e microbiológicos do solo incluíram macro e micronutrientes, carbono da biomassa microbiana, contagem do número mais provável de fungos, bactérias e contagem de unidades formadoras de colônias de actinomicetos. Houve uma maior sobrevivência dos saúveiros iniciais de *A. sexdens rubropilosa* em solos contendo textura argilosa do que médio-argilosa em laboratório. Nas áreas com solo de textura argilosa e médio-argilosa, a sobrevivência dos ninhos foi de 47,8 e 26,7%, respectivamente. No campo, por sua vez, não foram observadas diferenças no estabelecimento dos saúveiros iniciais para as duas áreas de cana-de-açúcar. O carbono da biomassa microbiana bem como o número mais provável de bactérias foi superior no solo de textura médio-argilosa comparativamente ao de textura argilosa. Diferentemente dos resultados de laboratório, os estudos de campo indicaram que a ação dos microrganismos do solo no estabelecimento de saúveiros novos de *A. sexdens rubropilosa* não foi tão expressiva.

Palavras-chaves: *Atta sexdens rubropilosa*, formiga cortadeira; microrganismos do solo; revoada; saúva.

ABSTRACT

Influence of soil microbial community on the establishment of ant nests of *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae)

The objective of the present study was to compare the establishment of new ant nests in two sugarcane growing areas with different soil types (sandy clay and clay) and to verify the influence of chemical and microbiological soil factors on nest establishment. In order to determine nest establishment, initial ant nests were marked and accompanied with other activities immediately after nuptial flight. Evaluations for verification of nest establishment were made weekly after 40 days for the period of 120 days. In laboratory experiment, mated queens collected from the two areas with different soils were maintained in plastic pots containing soil from respective areas at $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and 70% RH. To verify activities of the ants, a method similar to the one used to the field study was adopted. Dead ants were discarded while dead queens were used for isolation of associated microorganisms to determine the cause of mortality. The analysis of chemical and microbiological factors of the soil determined macro and micro-nutrients including carbon biomass, the most probable number of fungi, bacteria and counting of the colony forming units of the actinomycetes. The establishment of new ant nests occurred significantly more in the sandy clay soil than clay soil in laboratory. In the areas of sandy clay and clay soil the establishments were 47.8 and 26.7%, respectively. In the field was not observed difference in the establishment of new ant nest in both areas. The carbon biomass and most probable number of bacteria were significantly higher in the sandy clay soil when compared with clay soil area. Differently from laboratory results, the field studies indicated that the establishment of new ant nests of *A. sexdens rubropilosa* was not only based on the soil microorganism.

Keywords: *Atta sexdens rubropilosa*, leaf cutting ant; soil microorganisms; nuptial flight; ant queen

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Manutenção em laboratório das rainhas de *Atta sexdens rubropilosa*, coletadas durante revoadas, Jaú-SP. 25
- Figura 2 - Identificação, marcação e avaliação do estabelecimento de novos formigueiros de *Atta sexdens rubropilosa* em duas áreas de cultivo de cana-de-açúcar, Jaú-SP 26
- Figura 3 - (A) Placa para contagem do número mais provável (NMP) de bactérias, pelo método de plaqueamento por gotas (Janhel et al. 1999); (B) Placa para contagem de colônias de actinomicetos, mostrando as colônias isoladas e os halos de inibição (setas). 31
- Figura 4 - Porcentagem média de estabelecimento de formigueiros iniciais de *Atta sexdens rubropilosa* em laboratório mantidos em solo com características de textura distintas provenientes de duas áreas de cultivo de cana-de-açúcar 36
- Figura 5 - Porcentagem média de estabelecimento de formigueiros iniciais de *Atta sexdens rubropilosa* em duas áreas de cultivo de cana-de-açúcar contendo solos de características de textura distintas. Jaú-SP 37
- Figura 6 - Carbono da biomassa microbiana (CBM) em duas áreas de cultivo de cana-de-açúcar contendo solos de textura distintas, Jaú-SP. (n = 10/área) 39
- Figura 7 - Número mais provável (NMP) de bactérias por grama de solo em duas áreas de cultivo de cana-de-açúcar, sendo uma com solo do tipo médio-argilosa e outra argilosa..... 40
- Figura 8 - Número mais provável (NMP) de fungos por grama de solo em duas áreas de cultivo de cana-de-açúcar, sendo uma com solo do tipo médio-argilosa e outra argilosa 40

Figura 9 - Unidades formadoras de colônias de actinomicetos por grama de solo para solo de textura médio-argilosa e argilosa em área de cultivo de cana-de-açúcar, Jaú-SP	41
Figura 10 - Rainhas de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> contaminadas por fungos entomopatogênicos, após mantidas em laboratório com solos de textura médio-argilosa, Jaú-SP	42
Figura 11 - Diversidade de alguns actinomicetos isolados (A, B, C, D, e E), porém não identificados em amostras de solo de duas áreas sob cultivo de cana-de-açúcar, Jaú-SP	43
Figura 12 – ‘Amplicons’ na região V3 do rDNA 16S de bactérias, após separação por DGGE.....	45
Figura 13 - Riqueza de ‘amplicons’ (Se) do rDNA 16S de bactérias, com base no número de bandas detectadas após separação por DGGE	46
Figura 14 - Agrupamento hierárquico com base na separação de ‘amplicons’ de rDNA 16S de bactérias por DGGE.....	47
Figura 15 - Análise de componentes principais.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características físicas das amostras de solo coletadas na camada de 0-15 cm em duas áreas de cultivo de cana-de-açúcar segundo o método do densímetro, Jaú-SP	23
Tabela 2 - Parâmetros avaliados e metodologia para a análise química do solo de duas áreas de solo contendo cana-de-açúcar, Jaú-SP.....	28
Tabela 3 - Mortalidade e sobrevivência de rainhas de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> em laboratório, no período de outubro de 2006 a fevereiro de 2007, coletadas em duas áreas de solo distintos de cultivo de cana-de-açúcar, Jaú-SP	35
Tabela 4 - Mortalidade e sobrevivência de rainhas de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> em campo, no período de outubro de 2006 a fevereiro de 2007, coletadas em duas áreas de solo distintos de cultivo de cana-de-açúcar contendo solos de textura distintas, Jaú-SP.....	36
Tabela 5 – Características químicas médias obtidas em amostras de solo com textura médio-argilosa e argilosa, coletadas na camada de 0-15 cm em duas áreas de cana cana-de-açúcar, segundo método descrito por Raij et al (2001), Jaú-SP	38
Tabela 6 – Diversidade de fungos entomopatogênicos isolados de rainhas mortas de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> proveniente de duas áreas de cultivo de cana-de-açúcar com características distintas para solo médio-argiloso e solo argiloso.....	42

1 INTRODUÇÃO

As formigas cortadeiras do gênero *Atta* (Hymenoptera: Formicidae) têm o sofisticado hábito de cultivar e se alimentar do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales: Basidiomycota) (SILVA et al., 2006b). Conhecidas popularmente como saúvas, estas formigas tem sua ocorrência restrita à região Neotropical e parte da Neártica (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Possuem indivíduos morfológicamente distintos de acordo com a função que desempenham na colônia (JUSTI JÚNIOR et al., 1996) e para o cultivo do fungo, essas formigas cortam e transportam fragmentos de folhas frescas, flores e até mesmo sementes como substrato, o que as tornam pragas de áreas cultivadas, pastagens e florestas da América do Sul, América Central e sul da América do Norte (DELLA LUCIA; FOWLER, 1993).

O sucesso na formação de um novo saueiro está diretamente relacionado com a capacidade da içá fecundada (rainha) iniciar a construção de um canal subterrâneo e dar origem a sua colônia. Entretanto, de acordo com Autuori (1950), a porcentagem de sobrevivência destas colônias iniciais nos primeiros 100 dias é de apenas 2,5% chegando a 0,05% após 12 meses, uma vez que a rainha enfrenta fatores adversos durante todo processo de revoada, escavação do canal inicial e aparecimento dos primeiros olheiros. Dentre esses, destacam-se a predação por inimigos naturais, as chuvas durante ou após a revoada, os períodos de seca subseqüentes a construção do saueiro e a perda das reservas nutricionais da rainha durante o estabelecimento inicial da nova colônia (AUTUORI, 1950; MARICONI, 1970).

Um dado importante revelado por diversos autores demonstra que a mortalidade dos saueiros iniciais é alta (88 a 100%) desde a penetração da içá no solo até o surgimento do primeiro olheiro (canal ativo) (AUTUORI, 1941; MARICONI, 1974; RIBEIRO; WOESSNER, 1982). Contudo, sabe-se que muitos dos organismos que estiveram presentes durante a revoada e escavação do canal inicial não exercem a mesma influência após a penetração das içás. Em razão disso, Bento et al. (1991), sugeriu que os microrganismos naturalmente presentes no solo seriam um dos grandes responsáveis pela alta mortalidade natural desses saueiros iniciais. Segundo esses autores, em condições de laboratório, os solos mais pobres em nutrientes e com menor

diversidade microbiana natural foram os mais favoráveis ao estabelecimento dos sauveiros incipientes.

Desse modo, o presente trabalho objetivou relacionar a diversidade microbiana em duas áreas de cultivo de cana-de-açúcar com distintos manejos culturais e textura de solo, relacionando-as ao grau de estabelecimento de sauveiros iniciais de *A. sexdens rubropilosa*.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 As saúvas

As formigas cortadeiras do gênero *Atta* (Hymenoptera: Formicidae), conhecidas popularmente como saúvas, são consideradas insetos eusociais por apresentarem sobreposição de gerações; divisão de trabalho e cuidado com a prole (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). As saúvas vivem em formigueiros formados por dezenas ou centenas de câmaras subterrâneas (panelas) interligadas entre si e com a superfície do solo, por meio de galerias (GONÇALVES, 1964 apud DELLA LUCIA, 1993).

As saúvas, assim como as demais formigas da tribo Attini, são as únicas capazes de cultivar um fungo simbiote, *Leucoagaricus gongylophorus* para sua alimentação (FISHER et al., 1994). Em razão disso, cortam folhas, ramos, flores e sementes como substrato para este fungo, sendo por isso conhecidas como pragas importantes de áreas cultivadas, pastagens e florestas (DELLA LUCIA; FOWLER, 1993; GALLO et al., 2002; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; JUSTI JÚNIOR, 1996).

As novas colônias são formadas após as revoadas que acontecem anualmente nos saueiros adultos (após 38 meses da fundação), em razão da liberação de um grande número de formigas sexuadas aladas (iças e bitus) (AUTUORI, 1950). As iças, ou futuras rainhas, são fecundadas em pleno vôo e descem ao solo para fundar os novos saueiros.

Porém, antes das revoadas, ocorre o período conhecido como 'pré-revoada', que se inicia com uma a cinco semanas antes e termina assim que as iças e os bitus iniciam o vôo nupcial. A 'pré-revoada' é caracterizada pelo aspecto dos olheiros, que se apresentam limpos, abertos e com contornos bem delineados, além do alargamento dos canais abaixo dos olheiros; e também pelo alvoroço das operárias fora do ninho e o aumento da agilidade e agressividade dos soldados. Esse comportamento é importante não só para a defesa dos alados como para a eliminação de rainhas que tentam se estabelecer muito próximas à colônia mãe (AUTUORI, 1947).

As içás, antes de saírem para a revoada, carregam uma pequena porção do fungo que fica alojado na cavidade infrabucal, que servirá de “semente” para o novo sauveiro (AUTUORI, 1942a). A possibilidade de um não estabelecimento de novos formigueiros pelo fato das fêmeas não levarem o pequeno micélio ou perderem durante o vôo e escavação no solo foi descartado por Bento et al. (2002), para algumas espécies. Segundo estes autores, foi constatada a presença do fungo na cavidade infrabucal de 100% das fêmeas virgens de *Atta sexdens rubropilosa* Forel e *Atta texana* (Buckley). No caso de *Atta laevigata* (F. Smith) e *Atta bisphaerica* Forel, todas as futuras rainhas regurgitaram o fungo após a escavação ou não câmara inicial.

A revoada se inicia após um período de permanência das formas aladas (içás e bitus) na superfície dos sauveiros. Inicialmente, as içás levantam vôo isoladamente, sendo seguidas por diversos bitus, até que a revoada se torne geral, quando então ocorre a fecundação em pleno ar. Inicialmente o vôo é vertical, alcançando certa altura (ainda não determinada), tomam sentido horizontal e a velocidade aumenta graças à ação de correntes de ar (AUTUORI, 1942b).

Após o vôo, as içás voltam ao solo já fecundadas, livram-se das asas e, num local livre ou quase de vegetação, iniciam a construção dos pequenos sauveiros. Cada içá inicia a escavação de um pequeno canal, retirando a terra da superfície do solo com a ajuda das mandíbulas. Terminando o canal, a içá inicia a construção da primeira câmara, cuja terra é aproveitada para obstruir todo o canal de entrada, permanecendo a saúva encerrada na “panela”. A formação do sauveiro inicial é perfeitamente percebida devido à presença de pelotinhas de terra em volta do local de penetração da içá, entretanto, basta uma leve chuva para desmanchá-las, tornando assim difícil ou impossível a posterior localização de um sauveiro inicial (AUTUORI, 1942).

Terminado o trabalho de escavação, a saúva regurgita o fungo, que será cultivado primeiramente pela rainha que constantemente umidificam esses fragmentos por lambadura e pela deposição de gotas de fluido fecal sobre o mesmo (DELLA LUCIA et al., 1995).

O fungo cresce rapidamente e já no 5º dia, notam-se filamentos micelianos. Durante esse período a rainha exerce várias funções que, posteriormente, são

repassados para as operárias, como o cultivo do fungo, alimentação da prole e limpeza da rainha que passa então a ter apenas a função de reprodutora da colônia.

A rainha alimenta a si própria e à prole nos primeiros 90 dias da colônia com “ovos de alimentação”, que são bem maiores que os ovos normais e de casca mole. As primeiras operárias que emergem na colônia têm tamanho reduzido e aparecem a partir de 60 dias (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Essas operárias ajudam a rainha nos seus vários trabalhos, com o aumento da população, as operárias reabrem o canal que havia sido fechado pela içá e iniciam o corte e transporte de material vegetal. Os ovos de alimentação deixam de aparecer e o fungo passa a ser a única fonte alimentar da rainha e das larvas, enquanto que as operárias complementam sua alimentação com a seiva das plantas.

A estrutura do fungo simbiote foi analisada por Bass e Cherrett (1996), que observaram que os jardins de fungo são formados por pequenas câmaras responsáveis pela maior parte da produção de gongilídeos, definidos por Weber (1972) como dilatações na parte central ou final das hifas e estáfilas. As pequenas câmaras são acessíveis apenas às operárias mínimas e proporcionam uma grande superfície interna e maior produção de gongilídeos por unidade de área que as superfícies externas.

Segundo Abril e Bucher (2004), o fungo cultivado tem natureza biotrófica, além de utilizar os solutos citoplasmáticos da folhas cortadas, ele completa sua nutrição através da retirada de nitrogênio inorgânico do solo. Caso o fungo fosse saprofítico como era considerado antigamente, seria necessário um volume muito maior de material vegetal, pois o fungo consegue metabolizar apenas de 11 a 27% dos componentes da folha, o que geraria enorme quantidade de lixo, o que não acontece. Novos estudos demonstraram ainda, que o fungo é capaz de produzir amido e carboidratos simples (SILVA et al., 2006a).

As saúvas apresentam plasticidade de comportamento frente aos fatores que ponham em risco a colônia, o que permite gerar respostas rápidas para resolver dificuldades como a contaminação do jardim de fungo. Ortiz et al. (1999) avaliaram o comportamento de descontaminação do jardim de fungo de *Atta cephalotes* (L.) pelo fungo *Trichoderma lignorum* (Tode) Harz. Estes autores observaram que a prioridade para a descontaminação fica a cargo das outras operárias que não as jardineiras,

através de ingestão do contaminante, o corte das partes do fungo contaminado e em alguns casos a retirada de uma parte não contaminada do fungo e sua transferência para outra câmara para iniciar um novo jardim.

O jardim de fungo é uma monocultura de uma única linhagem de fungo, o que minimiza conflitos e competições que poderiam surgir entre diferentes linhagens do fungo simbiote (MUELLER, POULIN; ADAMS, 2004). Curiosamente, o fungo domesticado de uma colônia é capaz de rejeitar ativamente componentes micelianos de colônias vizinhas (POULSEN; BOOMSMA, 2005). Adicionalmente, as formigas impedem a reprodução sexual do fungo para evitar a recombinação e economizar o custo energético da frutificação (ZIENTZ et al., 2005).

O cultivo de um único clone do fungo implica em uma baixa diversidade genética reduzindo a habilidade das populações em se adaptarem às mudanças ambientais e favorecendo o potencial evolutivo de predadores e doenças em vencerem as defesas do hospedeiro (MEHDIABADI; HUGHES; MUELLER, 2006). A alternativa para driblar essa desvantagem em uma colônia é o aumento na diversidade genética do parceiro na simbiose, moldando assim a evolução dos múltiplos acasalamentos das fêmeas para aumentar a diversidade genética entre as operárias nos sistemas sociais, que possuem um grande número de indivíduos e estão sempre sob severa pressão por patógenos, sendo essa característica observada apenas nos attines superiores (VILLESEN et al., 1999; MUELLER et al., 2005; CHAPPELLA et al., 2004; FERNÁNDEZ-MARÍN et al. 2004).

De acordo com Della Lucia e Araújo (1993) a presença de leveduras e bactérias no jardim de fungo dos Attini já foi confirmada por diversos estudos. Contudo, segundo esses autores, a verdadeira função desses organismos ainda permanece obscura, sugerindo-se tratar de simbiotes, auxiliando na degradação ou no preparo do substrato, ou mesmo como parasitas da associação formiga-fungo.

2.1.2 Os microrganismos do solo

O solo pode ser encarado como um habitat microbiano por excelência, local de vida de inúmeras e variadas comunidades de todos os tipos de microrganismos

(bactérias, fungos, actinomicetos, vírus, protozoários etc.) e mesmo como reservatório final da grande diversidade genética de quase todos eles. O solo é constituído de inúmeros microssítios, caracterizados não apenas pelas condições edafoclimáticas, mas ainda por fatores peculiares, como presença de uma partícula de matéria orgânica, de uma raiz vegetal, de um microporo saturado de água, de maior ou menor facilidade de trocas gasosas, etc. Mesmo se considerando um terreno de dimensões restritas, constituído pelo mesmo tipo de solo, lida-se com grande número de microhabitats microbianos que diferem entre si (CARDOSO et al., 1992).

A organização e o funcionamento das comunidades microbianas governam as transformações bioquímicas que ocorrem no solo. As atividades da microbiota do solo são essenciais para a reciclagem da matéria orgânica, formação do húmus, nitrificação e fixação biológica do nitrogênio, dentre outros processos, os quais podem contribuir para a alteração da disponibilidade de nutrientes e elementos tóxicos no solo, concentração de gases associados ao efeito estufa na atmosfera, bem como para a alteração dos atributos físicos dos solos (LAMBAIS et al., 2005).

As interações ecológicas dos organismos incluindo microrganismos presentes no solo são muito ricas e complexas, com grande probabilidade de que surjam efeitos indiretos importantes no sistema, em razão dos diversos caminhos que essas interações podem tomar (PRICE, 1988). Segundo Cardoso (1978), essas principais interações são: (i) neutralismo, onde duas espécies vivem lado a lado sem que a presença de uma afete a da outra, é caracterizado pela ausência de interação fisiológica e de ocorrência casual; (ii) comensalismo, onde um dos participantes é beneficiado pela presença da outra espécie, mas essa última não deriva vantagens ou desvantagens da situação; (iii) protocooperação, caracterizada pelo intercâmbio de compostos entre duas populações, favorecendo a ambas, essa relação não é obrigatória nem específica, podendo haver mudança entre os organismos participantes e, normalmente, não há uma associação íntima entre suas células; (iv) simbiose, devido à coexistência íntima de duas espécies diferentes, resultando em benefício mútuo; (v) parasitismo, pela interação íntima morfológica e fisiológica entre duas populações, beneficiando o parasita e prejudicando o hospedeiro; (vi) predação, onde um organismo, o predador, se alimenta de um outro (presa), e comumente causa sua

morte; (vii) competição, que refere-se à luta entre organismos para obter um recurso indispensável no habitat que se encontra em quantidade insuficiente para suprir a demanda biológica, de modo que ambas são prejudicadas, embora freqüentemente a mais apta acabe predominando; e (viii) amensalismo, onde uma população é prejudicada por um fator produzido pela outra população que não é afetada, todavia, deve-se admitir que em alguns casos a população antagonica possa ser favorecida pela eliminação da outra, sua competidora.

Portanto, o conhecimento da diversidade microbiana nos solos é essencial tanto para a definição de estratégias para preservação de biomassa, quanto para o desenvolvimento de sistemas indicadores de alterações ambientais associadas a algum distúrbio, incluindo a utilização não-sustentável de solos agrícolas. Além disso, o conhecimento dos recursos genéticos da microbiota dos solos pode contribuir para a descoberta de genes codificando novas enzimas, enzimas com atividade ótima em condições ambientais extremas e peptídeos com atividades de interesse agrícola.

As bactérias apresentam as maiores diversidades e quantidades entre todos os outros grupos de organismos (WARD et al., 1992). Diversas espécies de bactérias do solo estão associadas com a ciclagem de nutrientes, a formação de matéria orgânica e sua decomposição, formação da estrutura do solo, ação antagonista contra insetos e patógenos de plantas, doenças em plantas e outros organismos (KENNEDY, 1999).

Muitas bactérias dos tipos: autotróficas e heterotróficas; mesófilas, termófilas e psicrófilas; “móveis e imóveis”, aeróbicas e anaeróbicas; digestoras de celulose e oxidantes de enxofre; fixadoras de nitrogênio e digestoras de proteínas, além de outras, podem ser encontradas no solo e isoladas a partir do mesmo (GRAY, 1990). Contudo, a maioria das bactérias presentes em amostras ambientais não pode ser detectada através da microscopia convencional, porque elas ficam aderidas a partículas de solo e sedimento (ROSADO; DUARTE, 2002a). Em razão disso, experimentos de clonagem das seqüências 16S recuperadas do ambiente fornecem uma noção mais precisa sobre a identidade dos membros da comunidade microbiana. Por meio dessa metodologia, é possível identificar diferentes bactérias. Porém, esse procedimento tem como grande desvantagem o fato de ser extremamente trabalhoso e demorado. Como alternativa às exaustivas estratégias de clonagem, pode-se lançar mão de experimentos de

'*fingerprinting*' de comunidades microbianas, a partir, por exemplo, do uso de DGGE de fragmentos amplificados por PCR usando *primers* específicos (ROSADO; DUARTE, 2002b; VALINSKY et al., 2002).

A reação de polimerização em cadeia (PCR) possibilita a multiplicação *in vitro* de fragmentos específicos de DNA (MULLIS; FALOONA, 1987). O método requer um molde de DNA que contenha a região "alvo" a ser amplificada, dois oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que flanqueiam a região "alvo", e o uso de uma polimerase termoestável, como por exemplo a *Taq* polimerase, isolada de *Thermus aquaticus* (SAIKI et al., 1988). Todos os componentes do PCR são misturados simultaneamente e o procedimento consiste de uma sucessão de três etapas, as quais são determinadas por diferentes temperaturas: a desnaturação do DNA molde, o anelamento dos *primers* e a extensão do DNA (CURY, 2002).

Fragmentos de DNA de mesmo tamanho, obtidos após a amplificação por PCR e visualizados em gel de agarose, podem ser separados no DGGE pelo fato de possuírem diferentes seqüências nucleotídicas. Usando-se o DGGE, pode-se detectar aproximadamente 50% das variações de seqüências em fragmentos de DNA com até 500 pares de bases (MYERS et al., 1985). Essa porcentagem pode ser aumentada para quase 100% quando se acrescenta a um dos lados do fragmento de DNA um segmento rico em GC (*GC-clamp*). Esse "grampo de GC", quando anexado à extremidade 5' de um dos iniciadores, é amplificado por PCR junto com o DNA e introduzido no fragmento de DNA amplificado (SHEFFIELD et al., 1989), agindo como um domínio de alta temperatura de desnaturação, que impede a dissociação das duas fitas de DNA em fitas simples. Normalmente, o comprimento do grampo de GC varia entre 30 a 509 nucleotídeos (MUYZER et al., 1998).

A vantagem da técnica PCR-DGGE sobre outras técnicas "*fingerprinting*" é o surgimento ou o desaparecimento de bandas como conseqüência de uma perturbação ambiental. Deste modo, é possível fazer o monitoramento "*in situ*" da estabilidade e atividade das comunidades bacterianas (ELSAS et al., 1998).

Os actinomicetos são microrganismos unicelulares, taxonomicamente classificados entre as bactérias e os fungos (WAKSMAN, 1950). Esses microrganismos foram negligenciados por bastante tempo devido ao seu crescimento lento que dificulta

seu isolamento em relação a seus competidores diretos, mas atualmente, vem atraindo a atenção de biotecnologistas e ecologistas por serem reconhecidamente, os principais produtores de compostos bioativos de alto valor comercial e pelo seu importante papel na ciclagem de nutrientes do solo (ARAÚJO, 1998). Dentre esses compostos, é importante destacar a grande variedade de antibióticos por eles produzidos sendo abundantes no solo, principalmente, naqueles em que o teor de matéria orgânica é abundante (HEISEY et al., 1985).

Os fungos, por serem microrganismos estritamente heterotróficos são saprófitas, parasitas, patógenos ou simbiontes e como tal, têm função vital direta ou indiretamente na produção primária. Em razão disso, os fungos são importantes agentes na ciclagem de nutrientes e, em geral, utilizam materiais mais recalcitrantes, como celulose, taninos, ligninas e húmus. Muitos fungos são cosmopolitas, mas alguns demonstram locais e funções específicas, como na sucessão de fungos em detritos de folhas e madeira, e na simbiose com raízes (micorrizas) (CARROLL; WICKLOW, 1992). As populações fúngicas são mais abundantes nas camadas mais próximas da superfície do solo, onde uma condição aeróbica predomina. Os fungos existem na forma de crescimento vegetativo (micelial) e reprodutiva, na forma de esporos ou corpos de frutificação contendo esporos. A penetração de micélio no solo forma uma rede que entrelaça partículas de solo resultando na formação de agregados e influenciando a estrutura do mesmo.

Muitos fungos possuem reconhecido papel como entomopatógenos de insetos, sendo que a maioria dos gêneros já relatados são encontrados no Brasil. A ocorrência desses fungos em condições naturais, tanto enzoótica como epizoótica é considerado um fator importante na regulação de populações de pragas, incluído as de solo (ALVES, 1998).

2.1.3 Alterações no solo causadas por formigas

A peculiaridade do solo, com relação aos outros habitats terrestres, reside na sua natureza heterogênea, complexa e dinâmica, que permite organismos com

metabolismos díspares conviverem lado a lado, interagindo em estado de equilíbrio dinâmico, muitas vezes com relações de dependência essenciais para sua sobrevivência, e proporcionando, assim, condições ideais para uma biodiversidade extremamente elevada (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002). Sob esse ponto de vista, uma elevada complexidade biológica propicia uma infinidade de relações entre os organismos, limitando a explosão populacional, e gerando condições de equilíbrio biológico do sistema.

É bem conhecida a capacidade das formigas de alterarem as características do solo onde estabelecem suas colônias. O solo adjacente ao formigueiro, geralmente tem altas concentrações de matéria orgânica e nitrogênio e fósforo mineralizados (WAGNER et al., 2004; BOULTON; AMBERMAN, 2006). A intensa atividade de escavação como também o cultivo do fungo, as galerias e as câmaras de lixo, onde são depositados restos de folhas porções velhas ou contaminadas do fungo e também carcaças contribuem para o aumento da heterogeneidade desse solo (MORA, 2005; VERCHOT et al., 2003; LANE; BASSIRIRAD, 2005; AMADOR; GÖRRES, 2007).

2.2 Material e métodos

2.2.1 Área de estudo

O presente estudo foi realizado na Estação Experimental do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), em Jaú-SP, nas fazendas Santa Clara (Área 1) (S 22° 15' 10"; W 48° 30' 19") e São José (Área 2) (S 22° 15' 28"; W 48° 30' 59"). Em ambas as áreas, o cultivo de cana-de-açúcar vem sendo conduzido por aproximadamente 30 anos, sendo que os tipos de solo (Tabela 1) e os métodos de manejo cultural variaram entre elas. Por se tratar de áreas experimentais, diferentes cultivares de cana-de-açúcar foram plantados, não sendo possível determinar o efeito da cultivar nesse estudo.

Na Área 1 (4,98 ha), de solo com textura médio-argilosa, o plantio foi realizado em abril de 2006 sendo, o primeiro corte e a colheita realizadas mecanicamente. Desse modo, não houve queima no canavial e realizou-se a rotação de cultura com crotalária.

Tabela 1 - Características físicas das amostras de solo coletadas na camada de 0-15 cm em duas áreas de cultivo de cana-de-açúcar segundo o método do densímetro, Jaú-SP

Área	Areia Total (%)	Silte (%)	Argila Total (%)	Classe de textura
1	60	8	32	Médio-argilosa
2	26	18	56	Argilosa

Na Área 2 (2,38 ha), de solo com textura argilosa, o plantio foi realizado em fevereiro de 2004 (3º corte). A colheita foi realizada manualmente após a queima e não houve rotação de cultura nessa área.

2.2.2 Coleta e manutenção de iças em laboratório

Durante a revoada de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae), que ocorreu no dia 03 de outubro de 2006, foram coletadas nas duas áreas as iças que já haviam removido suas asas e que iniciavam a escavação. Foram coletadas 15 iças no solo com textura médio-argilosa e 67 iças no solo com textura argilosa.

Essas iças foram então acondicionados em recipientes rígidos de plástico (500mL) previamente preenchidos com o solo da respectiva área (Figura 1A). As iças foram transportadas para o laboratório e mantidas nos recipientes tampados em sala climatizada com $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e 75 a 85% UR, (Figura 1B) conforme metodologia utilizada por Bento et al. (1991).

Após 40 dias, foram realizadas avaliações semanais, verificando a reabertura do canal inicial e a sobrevivência dos saueiros por até 120 dias (Figuras 1C e D).

Uma vez constatado o canal inicial, foi fornecido em intervalos de três dias, durante todo o período de avaliação, porções de flocos de aveia como fonte de alimento para ser incorporado ao fungo pelas operárias (Figura 1D).

Os saueiros onde não foram observadas atividades dentro ou fora do solo, foram descartados e as rainhas separadas em placas de Petri para isolamento, identificação e armazenamento de possíveis fungos entomopatogênicos que

ocasionaram a morte das mesmas (Figura 1E). Esse procedimento foi realizado no Laboratório de Controle Microbiano de Insetos da Esalq/USP, sendo que o isolamento dos fungos entomopatogênicos, ocorreu a partir da retirada de um fragmento da carcaça da rainha morta. Esse material foi inoculado em uma placa de petri, contendo Meio BDA e as placas armazenadas em sala climatizada com $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Após sete dias, foram avaliados o crescimento dos micélios e feitas lâminas para a identificação das espécies de fungos isoladas.

2.2.3 Marcação e avaliação dos saueiros em campo

Na manhã seguinte à revoada (03 de outubro de 2006) de *A. sexdens rubropilosa*, foram localizadas as colônias de saúvas recém-fundadas, ou seja, aquelas onde a içá obteve sucesso na escavação, caracterizadas pela deposição de terra solta na superfície em volta do canal inicial obstruído (Figura 2A).

As novas colônias foram então demarcadas por estacas de bambu (Figura 2B), e numeradas, com etiquetas (Figura 2C). Ao todo foram demarcados 109 e 231 ninhos em solo com textura médio-argilosa (Área 1) argilosa (Área 2), respectivamente. As avaliações iniciaram após 40 dias da revoada e foram mantidas semanalmente, por um período de 120 dias ou até a reabertura do canal inicial dos ninhos para forrageamento (Figura 2D). As avaliações foram realizadas visualmente, vistoriando-se todos os pontos marcados, verificando-se a reabertura do canal inicial e a atividade das operárias, discriminando-os como ativos (Figura 2E) ou inativos (Figura 2F).

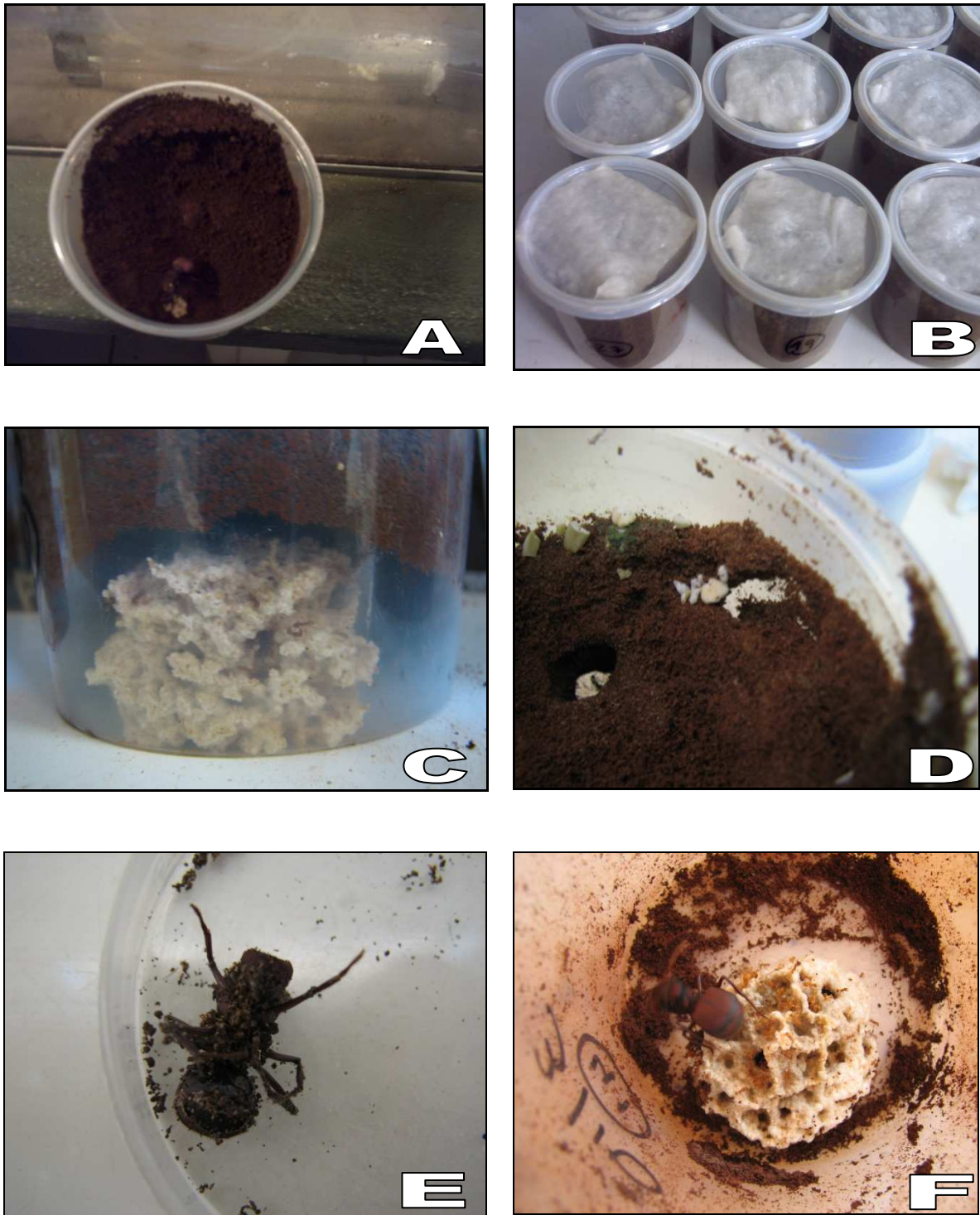


Figura 1 - Manutenção em laboratório das rainhas de *Atta sexdens rubropilosa*, coletadas durante revoada, Jaú-SP. **A**- Rainha cultivando o fungo sobre a superfície do solo, no recipiente; **B**- Detalhe do recipiente com o algodão umedecido sobre tampa perfurada para manutenção da umidade; **C**- Sauveiro estabelecido, esponja de fungo bastante desenvolvida; **D**- "Olheiro" reaberto de um formigueiro estabelecido; **E**- Rainha morta; **F**- Descarte de um formigueiro ativo

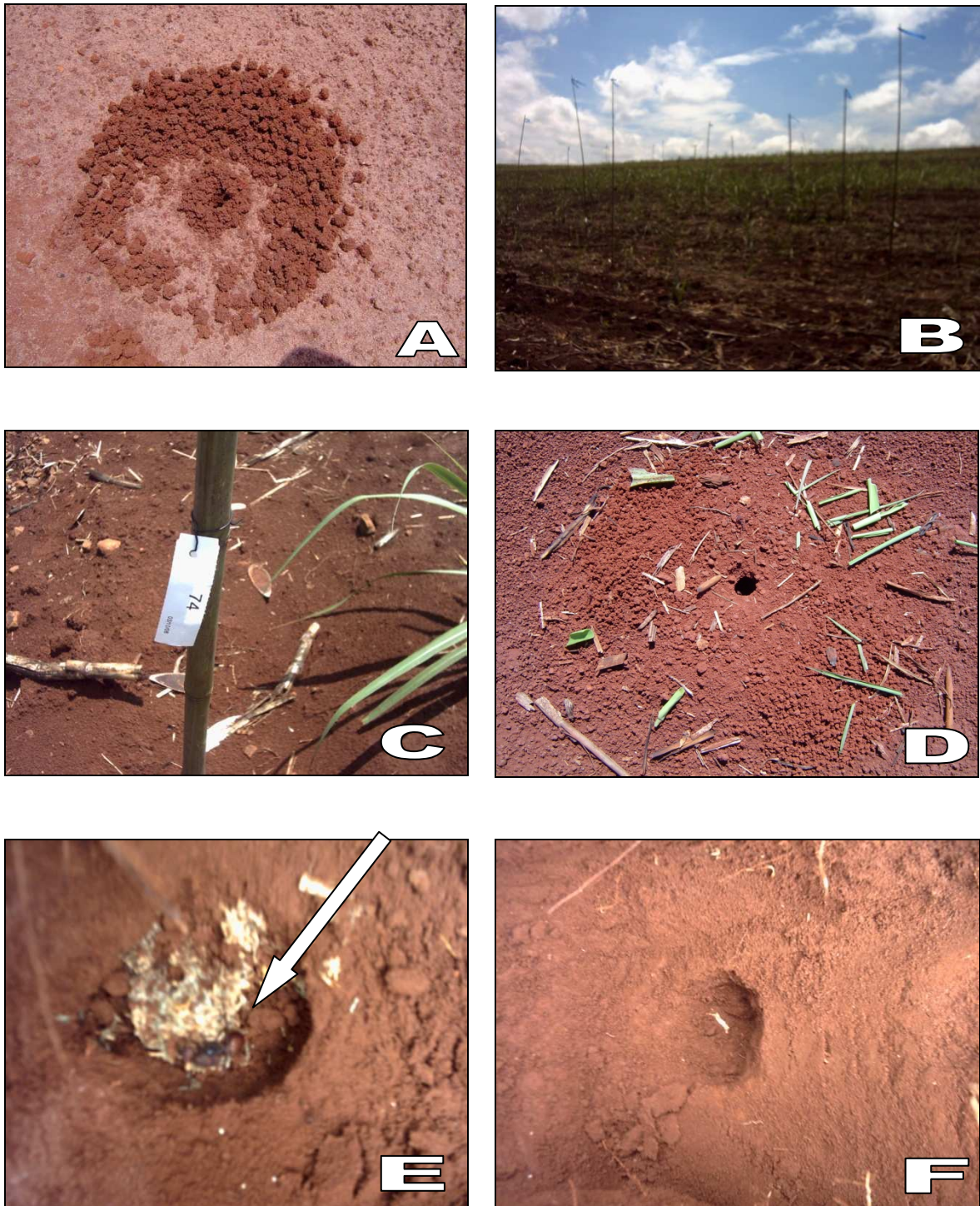


Figura 2 - Identificação, marcação e avaliação do estabelecimento de novos formigueiros de *Atta sexdens rubropilosa* em duas áreas de cultivo de cana-de-açúcar, Jaú-SP. **A-** Orifício de entrada da futura rainha; **B-** Marcação dos saueiros recém-fundados com estacas de bambu; **C-** Numeração dos novos saueiros; **D:** “Olheiro” reaberto de um formigueiro estabelecido; **E:** Escavação demonstrando um saueiro estabelecido (rainha e fungo em destaque); **F:** Escavação demonstrando um formigueiro inativo (câmara evidente, sem presença de fungo)

2.2.4 Coleta das amostras de solo

As amostras de solo nas duas áreas (Área 1 e 2) foram coletadas na profundidade de cerca de 15 cm, considerando-se que as fundações iniciais das colônias de *Atta* ocorrem justamente nos primeiros 10-20cm do solo (AUTUORI, 1942). Para tanto, foi utilizado um trado de 4,3cm de diâmetro, previamente desinfetado com uma solução de 30% de hipoclorito de sódio comercial. Foram coletados amostras de solo em 5 pontos por área, sendo que em cada ponto coletava-se 2 amostras (sub-amostras), totalizando 10 amostras/área. A cada novo ponto de coleta, o trado foi lavado, desinfetado com álcool 92% e seco com papel toalha. As amostras foram colocadas em sacos plásticos novos, devidamente identificados e mantidos em geladeira até o transporte, feito em caixas de isopor com gelo para o Laboratório de Microbiologia do Solo da Esalq/USP.

Das amostras coletadas por área foram analisados: (i) carbono da biomassa microbiana (CBM); (ii) Número Mais Provável (NMP) de microrganismos do solo (fungos e bactérias); (iii) contagem de actinomicetos; (iv) análises química e física; e (v) avaliação da diversidade genética.

Para a avaliação da diversidade genética (10g/ponto) as amostras foram acondicionadas em “Eppendorfs” e mantidas em freezer na temperatura de -80°C até a realização das análises. As demais amostras foram mantidas em câmara fria na temperatura de -20°C até a realização das análises.

2.2.4.1 Análise química e física do solo

As análises química e física do solo foram realizadas no Laboratório de Solos e Nutrição de Plantas da Esalq/USP. Para tanto, procedeu-se a secagem ao ar de todas as amostras para a obtenção das seguintes variáveis: pH, acidez potencial (H+Al), alumínio trocável (Al^{+3}), cálcio (Ca), magnésio (Mg), potássio (K), sódio (Na), fósforo (P), enxofre (S total), nitrogênio (N total), carbono orgânico (C-org), boro (B), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), zinco (Zn) e capacidade de troca catiônica (CTC) a pH

7,0 na camada de 0-20cm. A metodologia utilizada e as referências encontram-se na Tabela 2.

Os teores de enxofre total foram determinados em analisador elementar Flash EA 1112 NC Soil Analyzer (Thermo Electron Corporation). A CTC a pH 7,0 foi calculada somando-se os valores dos teores de H + Al, Ca, Mg, K e Na e, por fim, calculou-se a porcentagem da saturação da CTC por Ca, Mg, K, e por Al (m).

Tabela 2 – Parâmetros avaliados e metodologia para a análise química do solo de duas áreas de solo contendo cana-de-açúcar, Jaú-SP

Variável do solo	Método ou extrator	Referência
pH	Medido em CaCl ₂ 0,01M	Raij et al., 2001
M.O.	Método colorimétrico	Raij et al., 2001
H+Al	pH em SMP	Raij et al., 2001
Al ⁺³	KCl 1M e titulação com NaOH 0,025M	Raij et al., 2001
Ca, Mg trocáveis e P	Resina trocadora de íons	Raij et al., 2001
K trocável	Melich 1	Embrapa, 1999
Cu, Fe, Mn e Zn trocáveis	DTPA (Absorção atômica)	Raij et al., 2001
B	BaCl ₂ 2 OH em microondas	Embrapa, 1999
C-org	Digestão com K ₂ Cr ₂ O ₇	Raij et al., 2001
S total	Dynamic Flash Combustion by NC Soil Analyzer	Thermo Fisher Scientific

2.2.4.2 Análises microbiológicas

2.2.4.2.1 Carbono da biomassa microbiana (CBM)

A biomassa de carbono foi determinada pelo método de fumigação-extração de acordo com Vance et al. (1987). Para cada amostra, foram pesadas 20g de solo, sendo 10g para fumigação e as outras 10g para o controle (não-fumigada).

As amostras foram fumigadas em dessecador contendo um béquer com pérolas de vidro e clorofórmio. O clorofórmio foi evaporado sob vácuo. Depois de 24 horas foi retirado o resíduo de clorofórmio do dessecador.

A segunda alíquota serviu de controle (não-fumigada). Às amostras foi adicionado 40 mL de K_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e as mesmas foram agitadas por 30 minutos. A suspensão resultante foi filtrada em papel de filtro Whatman nº1. O carbono orgânico dos extratos foi determinado por digestão de 10 mL do filtrado com 1 mL de $K_2Cr_2O_7$ e 10 mL de uma mistura de H_2SO_4 e H_3PO_4 concentrados (1:1, v:v), em erlenmeyers de 50 mL. Esta solução permaneceu em banho-maria a 90°C por 1 hora. Após serem resfriadas, as amostras receberam 10 mL de H_2O deionizada. O excesso de $K_2Cr_2O_7$ foi determinado por titulação com sulfato ferroso de amônio, utilizando-se fenilamina sulfonato de bário como indicador. O CBM foi calculado pela seguinte equação:

$$C\text{-biomassa} = 2,64 E_c$$

$E_c = (\text{C-orgânico extraído de solos fumigado}) - (\text{C-orgânico extraído de solo não fumigado})$

Os dados foram expressos em mg de C g^{-1} de solo seco.

2.2.4.2.2 Número mais provável (NMP) de fungos e bactérias

Para a determinação do número mais provável (NMP) de bactérias e fungos das amostras foi utilizado o método de plaqueamento por gotas, desenvolvido por Janhel (1999), conforme rotina do Laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de

Solo e Nutrição de Plantas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (Esalq/USP).

Foram utilizados os meios de cultura ágar nutriente (Burnett et al., 1957), para determinação de bactérias e o meio de Martin, com exclusão do rosa-bengala, para a determinação de fungos (Martin, 1950) sendo o Ágar nutriente (1000mL água, 10g ágar, 3g extrato de carne, 10g NaCl, 5g peptona); Meio de Martin (1000ml água, 10g ágar, 1g KH_2PO_4 , 1g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5g peptona, 10g dextrose, 0,03g estreptomicina).

Após receberem 0,9 mL do meio de cultura correspondente, os tubos de ensaio foram autoclavados por 20 minutos a 120°C (1 atm) e em seguida mantidos em banho-maria a 45°C para que o meio de cultura permanecesse em estado líquido. Para as diluições, foram obtidas suspensões em frasco ‘Erlenmeyer’, utilizando 10g de solo e 90mL de solução salina de NaCl a 0,85%, homogeneizados em agitador na velocidade de 7000rpm. A partir desta suspensão, foram feitas diluições sucessivas com alíquotas de 0,1mL nos tubos de ensaio que continham 0,9mL de meio de cultura.

Para cada amostra de solo, foram feitas duas placas com 5 repetições e 5 diluições, uma para fungos e outra para bactérias (Figura 3A). Cada gota continha 0,04 mL de meio seletivo (descritos acima).

As placas foram mantidas em sala climatizada com 28°C e 70% de umidade relativa. As avaliações foram feitas 48 horas após a inoculação contando-se o número de gotas que apresentavam crescimento.

Os dados foram transformados com o auxílio de uma tabela de probabilidade de ocorrência – Tabela de McCrady (HUNGRIA e ARAÚJO, 1994) e expressos em número mais provável de microrganismos por grama de solo (MPN g^{-1}).

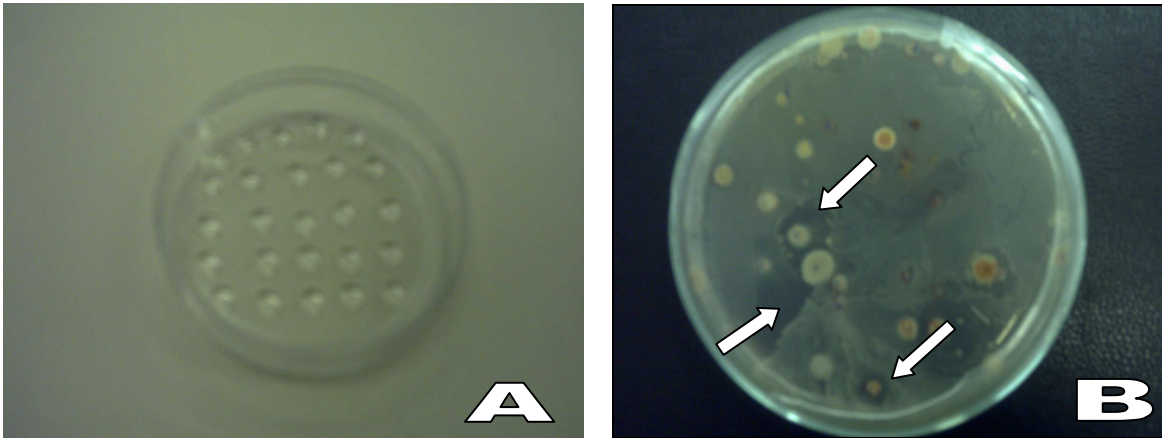


Figura 3 - (A) Placa para contagem do número mais provável (NMP) de bactérias, pelo método de plaqueamento por gotas (Janhel et al. 1999); (B) Placa para contagem de colônias de actinomicetos, mostrando as colônias isoladas e os halos de inibição (setas)

2.2.4.2.3 Contagem de actinomicetos

Os actinomicetos foram isolados por diluições em série e plaqueamento em meio seletivo para actinomicetos (1000mL água, 18g ágar, 0,3g de caseína hidrolisada, 10g glicerol, 2g KNO₃, 2g NaCl, 2g K₂HPO₄, 0,05g MgSO₄ e 7H₂O, 0,02g CaCO₃, 0,01g FeSO₄ e 7H₂O). Foram feitas suspensões em frasco 'Erlenmeyer', utilizando 10g de solo e 90mL de solução salina de NaCl a 0,85%, homogeneizados em agitador na velocidade de 7000rpm por 10 minutos. A partir desta suspensão, foram feitas diluições sucessivas com alíquotas de 0,1mL nos tubos de ensaio que continham 0,9mL de solução salina. Para cada diluição foram realizadas duas placas e a inoculação foi feita com o auxílio de micropipeta em capela de fluxo laminar, com uma gota 0,10mL por placa, espalhada por toda a superfície com o auxílio de uma alça de vidro. As placas foram vedadas com 'parafilm' (para impedir a perda de água e contaminação) e incubadas em sala climatizada a 28°C e umidade relativa de 70% por um período de 7 dias. Passado o período de incubação, foram feitas as avaliações para verificar o crescimento de colônias além da contagem de colônias por placa/diluição (SILVA, 2004). Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de solo seco (UFCg⁻¹).

2.2.5 Diversidade bacteriana

2.2.5.1 Extração do DNA total do solo

Para a extração do DNA, foi utilizado o 'kit' 'FastDNA Spin for Soil' (*Qbiogene*). Em microtubos contendo granada finamente moída, foram adicionados 0,5 g de solo, 978 μL de tampão fosfato e 122 μL de tampão MT. Os tubos foram agitados horizontalmente por 30s a 4ms^{-1} , em um homogeneizador FP120 'FastPrep Cell Disruptor' (*Qbiogene*). Em seguida, foi centrifugado por 1 min a $13000g$ sendo o sobrenadante transferido para um tubo limpo. A essa solução foi adicionado 250 μL de tampão PPS, agitando-se os tubos 10 vezes por inversão. Os tubos foram centrifugados por 10 min a $13000g$ e o sobrenadante coletado e transferido para um microtubo limpo. Ao sobrenadante foi adicionado 1 mL de matriz de ligação, agitando-se os tubos durante 2 min por inversão. Em seguida os tubos foram incubados por 3 min, a matriz de ligação foi transferida para um filtro acoplado a um microtubo ('Spin Filter', *Qbiogene*), e os tubos centrifugados por 2 min a $13000g$. A matriz de ligação retida no filtro foi lavada com 500 μL de uma solução (SEWS), e o filtro centrifugado 2 vezes por 2 min a $13000g$. Após 5 min de incubação à temperatura ambiente, foram adicionados 75 μL de água ultrapura ao filtro e centrifugado por 2 min a $13000g$. O DNA puro foi recolhido em um tubo limpo e sua quantificação feita por densitometria, após eletroforese em gel de agarose 1,5%-0,5xTBE (1xTBE: 44 mM Tris-borato, 1 mM EDTA pH 8,0), utilizando-se um densitômetro laser 'FluorImager' (*Amershan Biosciences*) e o programa 'Fragment Analysis' (*Amershan Biosciences*). Como padrão de tamanho e quantidade de DNA foi utilizado o marcador de massa ('Low DNA Mass Ladder-Invitrogen').

2.2.5.2 PCR

A amplificação da região V3 do rDNA 16S de bactéria foi feita em solução contendo: 2,5 μL de tampão para PCR 10X; 0,2 mM dNTP; 3 mM MgCl_2 ; 1 U de TAQ DNA-polimerase recombinante (*Gibco*); 10 ng de DNA total; 5 pmol dos

oligonucleotídeos iniciadores BA338fGC
 (5'GCCCCGCCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCAGCGACTCCTACGGGAGGCAGC
 AG 3') e UN518r (5'ATTACCGCGGCTGCTGG 3'), água Milli-Q esterilizada para um
 volume final de 25 µL. A amplificação foi realizada em um termociclador (*Mastercycler
 Gradient, Eppendorf*) nas seguintes condições: 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de 92°C
 por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto; 72°C por 10 minutos.

Os produtos da reação de amplificação ('amplicons') foram separados através de
 eletroforese em gel de agarose 1% TBE 0,5X. O DNA foi visualizado por coloração com
 SYBR Green 1 (*Molecular Probes*) utilizando-se um densitômetro à laser 'FluorImager
 SI' (*Amersham Biosciences*). Como padrão de tamanho e quantidade de DNA foi
 utilizado o marcador de massa 'Low DNA Mass Lader' (*Invitrogen*). Os 'amplicons' do
 rDNA 16S foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida (8%) com
 gradiente desnaturante.

2.2.5.3 DGGE ('Denaturing Gradient Gel Electrophoresis')

Os 'amplicons' do rDNA 16S foram separados por DGGE. Os géis de acrilamida
 (37,5: 1; m:m) 8%, foram preparados com gradiente desnaturante 15% a 55%, usando
 uma solução desnaturante 100% (7M uréia e 40% formamida) e uma solução 0% (sem
 uréia e formamida) (ØVREÅS et al., 1997). A eletroforese foi realizada a 60 °C e 200 V
 constantes por 4 horas, em um sistema DCode (*BioRad*), utilizando-se solução tampão
 0,5X TAE. Após a eletroforese, o gel foi imerso em solução de ácido acético 10% por 10
 min, metanol 50% por 10 min e 'SYBR-Green I' (*Molecular Probes*) 1:10.000 (v:v) por 30
 min, utilizando-se um agitador horizontal. Entre cada solução o gel foi lavado 3 vezes
 com água por 5 min. A imagem do gel foi capturada por varredura, utilizando-se um
 densitômetro a laser 'FluorImager' e o programa 'Fragment Analysis' (*Amersham
 Biosciences*). A riqueza de 'amplicons' (Se) foi determinada com base no número de
 bandas com diferentes valores de migração relativa (Rf), detectadas após varredura.

A diversidade genética foi determinada pela riqueza de 'amplicons' (número de
 'amplicons' presentes em cada amostra). A similaridade entre as estruturas de

comunidades de bactérias foi determinada com base na presença ou ausência das bandas detectadas no gel.

2.2.6. Análise estatística

O delineamento experimental empregado foi o inteiramente casualizado para as variáveis de estabelecimento dos saqueiros (campo e laboratório), análise química e microbiológica, sendo os dados submetidos à análise de variância (ANOVA). O teste de Tukey foi utilizado para comparar as médias das variáveis ($P < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa SAS Institute (1998), utilizando-se o módulo PROC GLM. A análise de similaridade entre as comunidades de bactérias das amostras foi feita a partir da concordância simples (“simple matching”) algoritmo de Wand e distância euclidiana como medida, utilizando-se o programa ‘Systat 8.0’, com base em dados binários para presença ou ausência (1 ou 0) das bandas detectadas.

2.3 Resultados

Estabelecimento dos saueiros

Houve uma maior sobrevivência dos saueiros iniciais de *A. sexdens rubropilosa*, em laboratório, com solos contendo textura argilosa do que médio-argilosa, provenientes das duas áreas cultivadas com cana-de-açúcar (Figura 4). Nas áreas com solo de textura argilosa e médio-argilosa, a sobrevivência dos ninhos foi de 47,8 e 26,7%, respectivamente (Tabela 3). Das içás mortas, ou seja, 52,2% no solo de textura argilosa e 73,3% na médio-argilosa, 25,7 e 36,4% delas, respectivamente, foi devido à ação de fungos entomopatogênicos (vide item, Fungos entomopatogênicos isolados).

No campo, por sua vez, não foram observadas diferenças no estabelecimento dos saueiros iniciais para as duas áreas de cana-de-açúcar (Figura 5). Em ambas as áreas, de textura argilosa e médio-argilosa, a sobrevivência dos ninhos de *A. sexdens rubropilosa* foi de 23,4 e 22,9%, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 3 - Mortalidade e sobrevivência de rainhas de *Atta sexdens rubropilosa* em laboratório, no período de outubro de 2006 a fevereiro de 2007, coletadas em duas áreas de solo distintos de cultivo de cana-de-açúcar, Jaú-SP.

Textura do solo	Rainhas observadas	% Sobrevivência (n)	% Mortalidade por fungos	% Mortalidade total (n)
Médio-argiloso	15	26,7 (4)	36,4	73,3 (11)
Argiloso	67	47,8 (32)	25,7	52,2 (35)

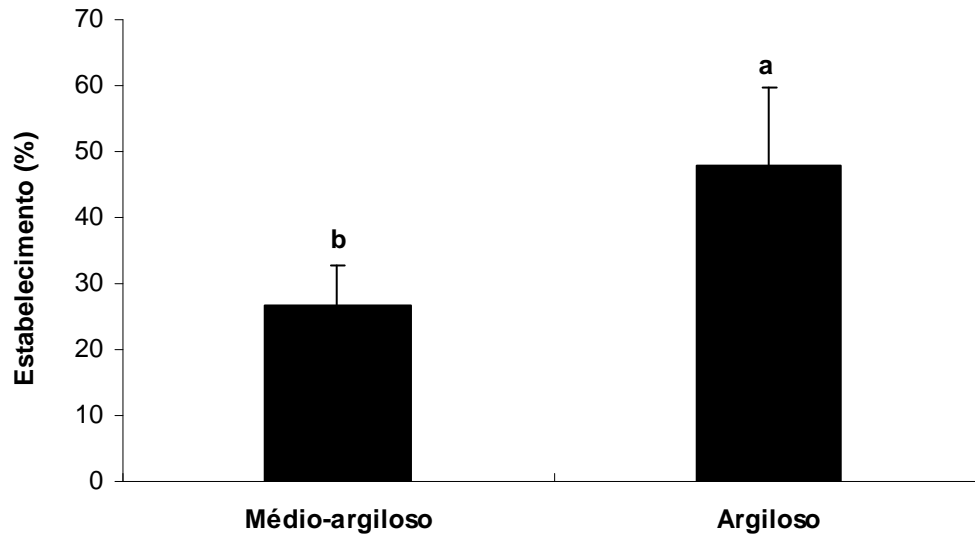


Figura 4 - Porcentagem média de estabelecimento de formigueiros iniciais de *Atta sexdens rubropilosa* em laboratório mantidos em solo com características de textura distintas provenientes de duas áreas de cultivo de cana-de-açúcar. *Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Tabela 4 - Mortalidade e sobrevivência de rainhas de *Atta sexdens rubropilosa* em campo, no período de outubro de 2006 a fevereiro de 2007, em duas áreas de cultivo de cana-de-açúcar contendo solos de textura distintas, Jaú-SP.

Textura do solo	Ninhos observados	% Sobrevivência (n)	% Mortalidade total (n)
Médio-argiloso	109	22,9 (25)	77,1 (84)
Argiloso	231	23,4 (54)	76,6 (177)

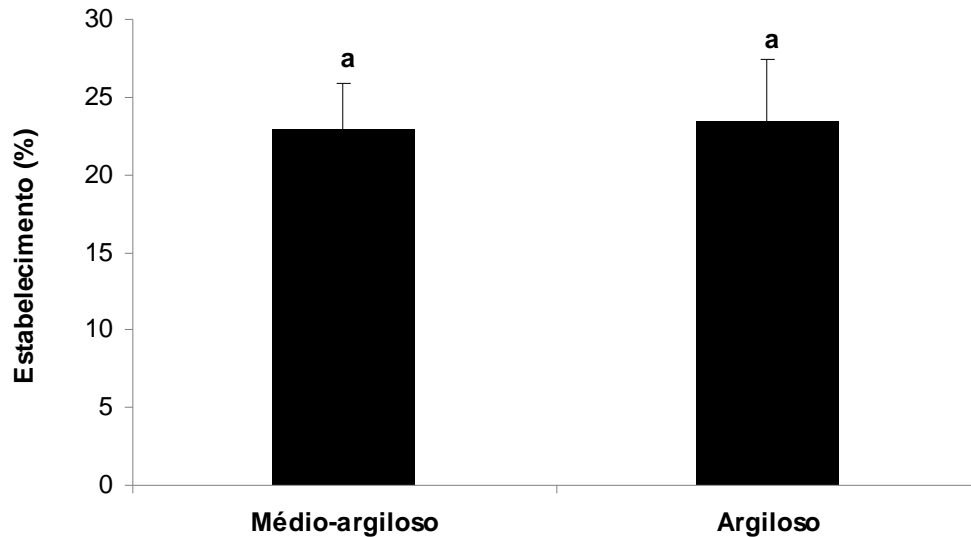


Figura 5 - Porcentagem média de estabelecimento de formigueiros iniciais de *Atta sexdens rubropilosa* em duas áreas de cultivo de cana-de-açúcar contendo solos de textura distintas. Jaú-SP.
*Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Análise química dos solos

A análise química dos solos contendo textura média-argilosa e argilosa onde foram avaliados o estabelecimento dos saúveiros iniciais de *A. sexdens rubropilosa* demonstrou diferenças significativas quanto ao pH, magnésio (Mg), alumínio trocável (Al^{+3}), acidez potencial (H + Al), capacidade de troca catiônica (T), saturação de bases (V), saturação por alumínio (m), cobre (Cu) e manganês (Mn) (Tabela 5). De modo geral, seguindo-se a interpretação de resultados de análise de solo do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC, 2007), o solo que apresentou textura argilosa foi considerado como muito ácido (pH até 4,3) e de V baixa (26-50%, distrófico) e o solo de textura médio-argilosa como ácido (pH ente 4,4-5,0) e V média (51-70%, eutrófico).

O teor de Mg foi considerado alto para o solo de textura argilosa e médio para médio-argilosa. O teor de Al^{+3} foi maior no solo de textura argilosa do que na médio-argilosa. Neste caso, considerando o pH muito ácido do solo de textura argilosa, indica

que boa parte deste alumínio está disponível neste solo (tóxico), o que pode ser comprovado por sua alta saturação de alumínio (m). Os teores de Cu e Mn embora tenham diferido entre as texturas de solos analisadas, foram ambos considerados como altos.

O teor de matéria orgânica (M.O.) responsável por um importante papel nas características químicas, físicas e microbiológicas dos solos foi semelhante para as duas áreas analisadas, sendo de 28,4 e 24,2 g/dm³ para os solos de textura argilosa e médio-argilosa, respectivamente.

Tabela 5 - Características químicas médias obtidas em amostras de solo com textura médio-argilosa e argilosa, coletadas na camada de 0-15 cm, em duas áreas de cana-de-açúcar, segundo método descrito por Raij et al. (2001), Jaú-SP

	Médio-argiloso	Argiloso
pH (CaCl ₂)	4,9 ± 0,2 a	4,3 ± 0,2 b
M.O. (g dm ⁻³)	24,2 ± 5,5 a	28,4 ± 2,0 a
P (mg dm ⁻³)	25,0 ± 33,2 a	9,6 ± 3,5 a
S (mg dm ⁻³)	9,0 ± 3,0 a	38,0 ± 29,5 a
K (mmol _c dm ⁻³)	1,3 ± 0,6 a	3,0 ± 2,0 a
Ca (mmol _c dm ⁻³)	31,0 ± 10,2 a	25,0 ± 5,0 a
Mg (mmol _c dm ⁻³)	8,0 ± 3,0 a	14,0 ± 3,3 b
Al⁺³ (mmol _c dm ⁻³)	1,0 ± 1,0 a	4,0 ± 2,2 b
H+Al (mmol _c dm ⁻³)	30,0 ± 7,0 a	53,4 ± 6,3 b
SB (mmol _c dm ⁻³)	39,7 ± 13,1 a	42,0 ± 8,1 a
T (mmol _c dm ⁻³)	67,5 ± 21,1 a	95,2 ± 9,4 b
V (%)	58,6 ± 7,1 a	43,8 ± 5,6 b
m (%)	2,2 ± 2,3 a	8,6 ± 4,5 b
B (mg dm ⁻³)	0,18 ± 0,03 a	0,14 ± 0,05 a
Cu (mg dm ⁻³)	3,2 ± 1,1 a	6,0 ± 1,2 b
Fe (mg dm ⁻³)	14,0 ± 2,1 a	14,4 ± 4,0 a
Mn (mg dm ⁻³)	8,2 ± 1,2 a	19,1 ± 3,1 b
Zn (mg dm ⁻³)	0,5 ± 0,1 a	0,7 ± 0,3 a

*Médias seguidas da mesma letra na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Análise da microbiota do solo

O carbono da biomassa microbiana (CBM) que representa a parte viva da matéria orgânica do solo, notavelmente os microrganismos, foi superior no solo de textura médio-argilosa comparativamente ao de textura argilosa (Figura 6), assim como o número mais provável de (NMP) de bactérias (Figura 7).

Para os demais parâmetros microbiológicos avaliados, incluindo o NMP de fungos (Figura 8) e as unidades formadoras de colônias de actinomicetos (Figura 9), não houve diferença entre os solos de textura médio-argilosa e argilosa, muito embora, tenham sido numericamente superiores no primeiro caso.

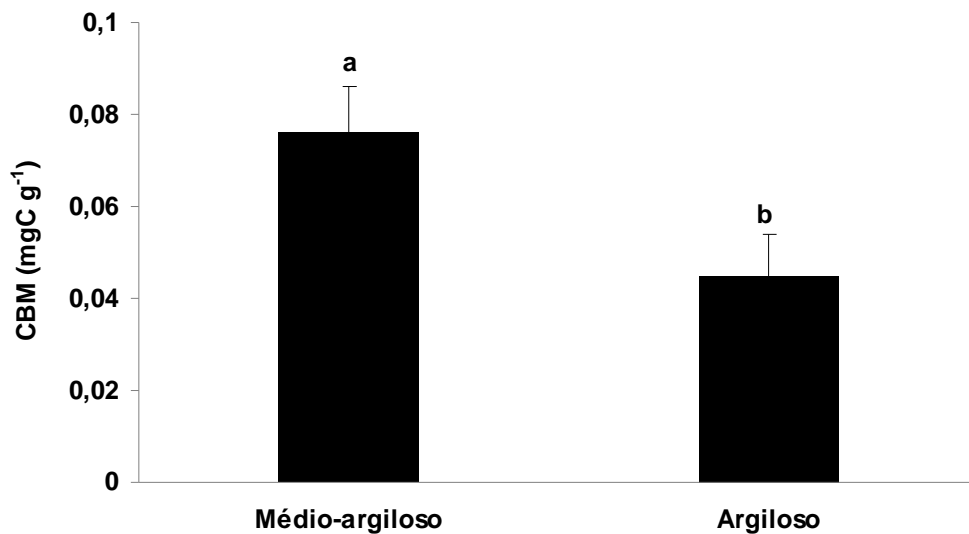


Figura 6 - Carbono da biomassa microbiana (CBM) em duas áreas de cultivo de cana-de-açúcar contendo solos de textura distintas, Jaú-SP. (n = 10/área). *Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey (P<0,05)

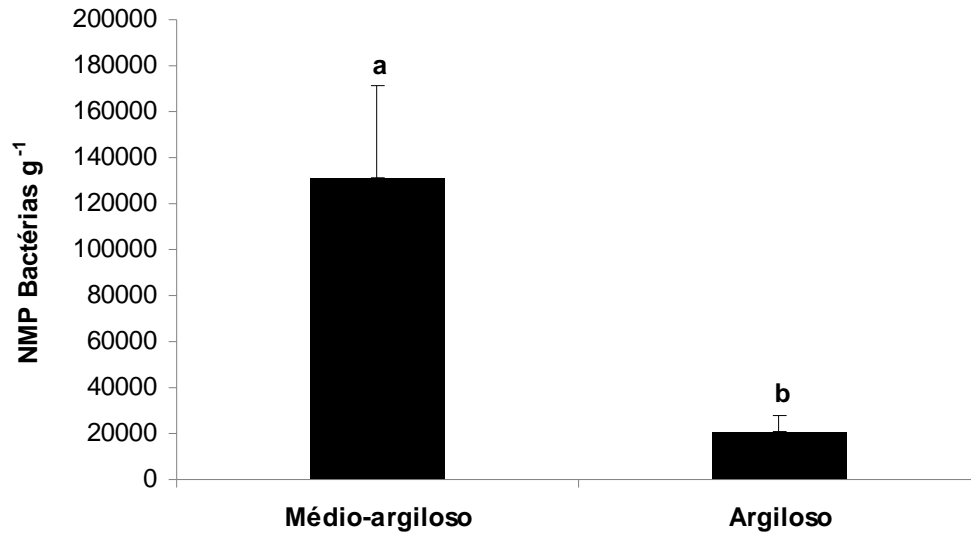


Figura 7 - Número mais provável (NMP) de bactérias por grama de solo em duas áreas de cultivo de cana-de-açúcar, sendo uma com solo de textura médio-argilosa e outra argilosa, Jaú-SP. *Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

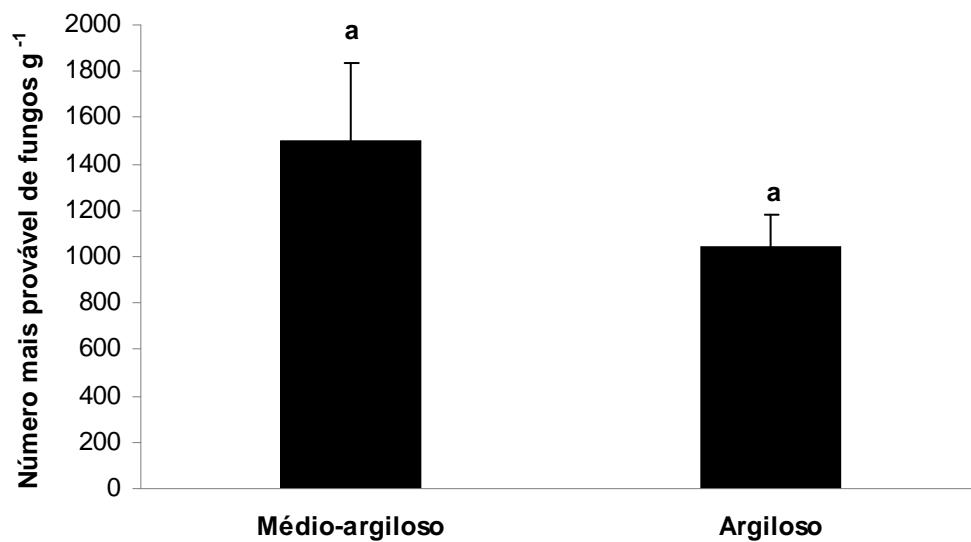


Figura 8 - Número mais provável (NMP) de fungos por grama de solo em duas áreas de cultivo de cana-de-açúcar, sendo uma com solo de textura médio-argilosa e outra argilosa, Jaú-SP. *Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

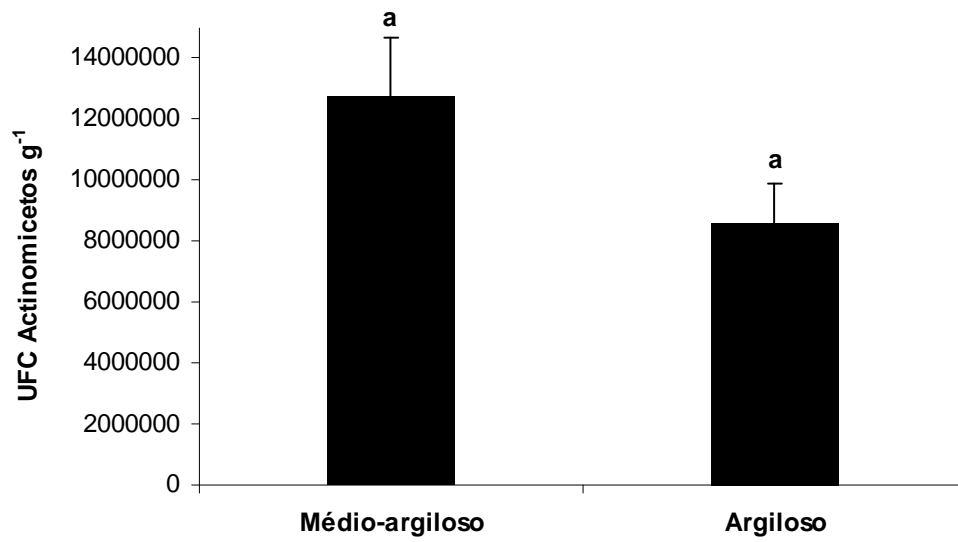


Figura 9 - Unidades formadoras de colônias de actinomicetos por grama de solo de textura médio-argilosa e argilosa em área de cultivo de cana-de-açúcar, Jaú-SP. *Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

Fungos entomopatogênicos isolados

Das colônias iniciais de *A. sexdens rubropilosa* mantidas em laboratório e que não sobreviveram com solos provenientes das duas áreas de cana-de-açúcar (Tabela 3), foi possível isolar uma maior diversidade de fungos entomopatogênicos naquelas rainhas presentes no solo com textura médio-argilosa (Tabela 6). Comparativamente, *Aspergillus* sp. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok foram encontrados em rainhas com solos de ambas as áreas, porém *Penicillium* sp. e *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, foram isoladas somente em rainhas com solos de textura médio-argilosa, e *Paecilomyces farinosus* (Holmsk.) AHS Br. & G. Sm., somente em rainhas com solo de textura argilosa. Os fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* isolados de rainhas em solo com textura médio-argilosa podem ser visualizados na Figura 10.

Presença de actinomicetos

Embora não tenham sido identificados os isolados dos actinomicetos encontrados em ambos os solos de textura média-argilosa e argilosa nas duas áreas de cana-de-açúcar, foi possível evidenciar a presença de uma enorme diversidade dos mesmos (Figura 11). Estes estudos poderão ser úteis em futuros trabalhos com actinomicetos.

Tabela 6 - Diversidade de fungos entomopatogênicos isolados de rainhas mortas de *Atta sexdens rubropilosa* proveniente de duas áreas de cultivo de cana-de-açúcar com características distintas para solo médio-argiloso e solo argiloso.

Fungos entomopatogênicos isolados	Médio-argiloso	Argiloso
<i>Aspergillus</i> sp.	X	X
<i>Penicillium</i> sp.	X	
<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metsch) Sorok	X	X
<i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo) Vuillemin	X	
<i>Paecilomyces farinosus</i> (Holmsk.) AHS Br. & G. Sm.		X



Figura 10 - Rainhas de *Atta sexdens rubropilosa* contaminadas por fungos entomopatogênicos, após mantidas em laboratório com solos de textura médio-argilosa, Jaú-SP. **A** - Rainha morta e colonizada por *Beauveria bassiana*; **B** - Rainha morta e colonizada por *Metarhizium anisopliae* (Fotos: Sérgio Batista Alves).

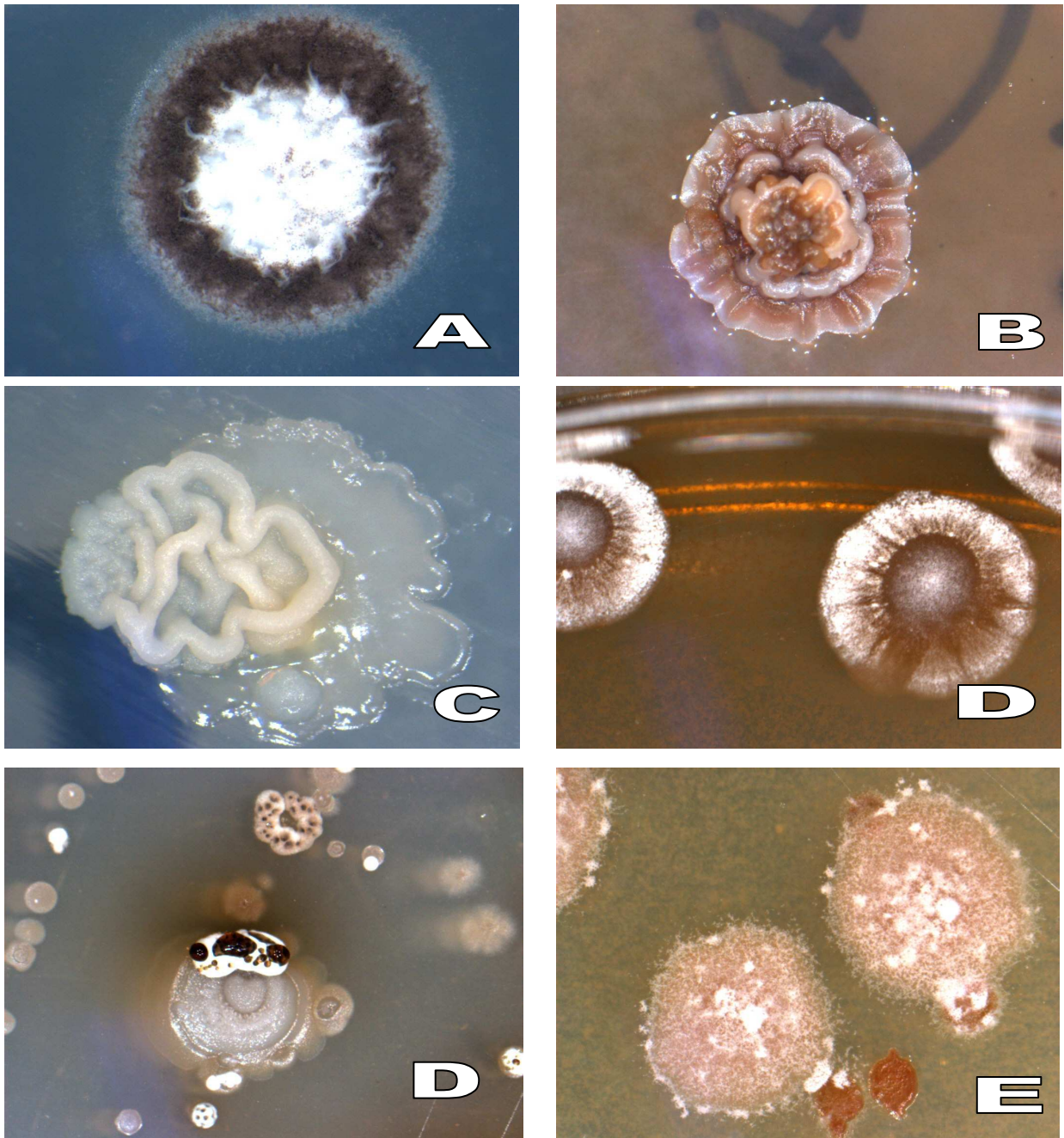


Figura 11 – Diversidade de alguns actinomicetos isolados (A, B, C, D, e E), porém não identificados em amostras de solo de duas áreas sob cultivo de cana-de-açúcar, Jaú-SP

Estrutura das comunidades de bactérias

A análise dos géis contendo a separação dos ‘amplicons’ de rDNA 16S de bactéria por DGGE possibilitou a detecção de 57 bandas polimórficas nas amostras de solos avaliadas (Figura 12). As diferenças da riqueza de ‘amplicons’ nas duas áreas indicaram que na área de solo com textura médio-argilosa, a riqueza foi superior (34%) ao de textura argilosa (29%) (Figura 13).

A análise dos dados por agrupamento hierárquico mostrou que as comunidades bacterianas nos diferentes pontos amostrados são semelhantes entre si, caracterizando uma nítida separação entre as duas áreas (Figura 14).

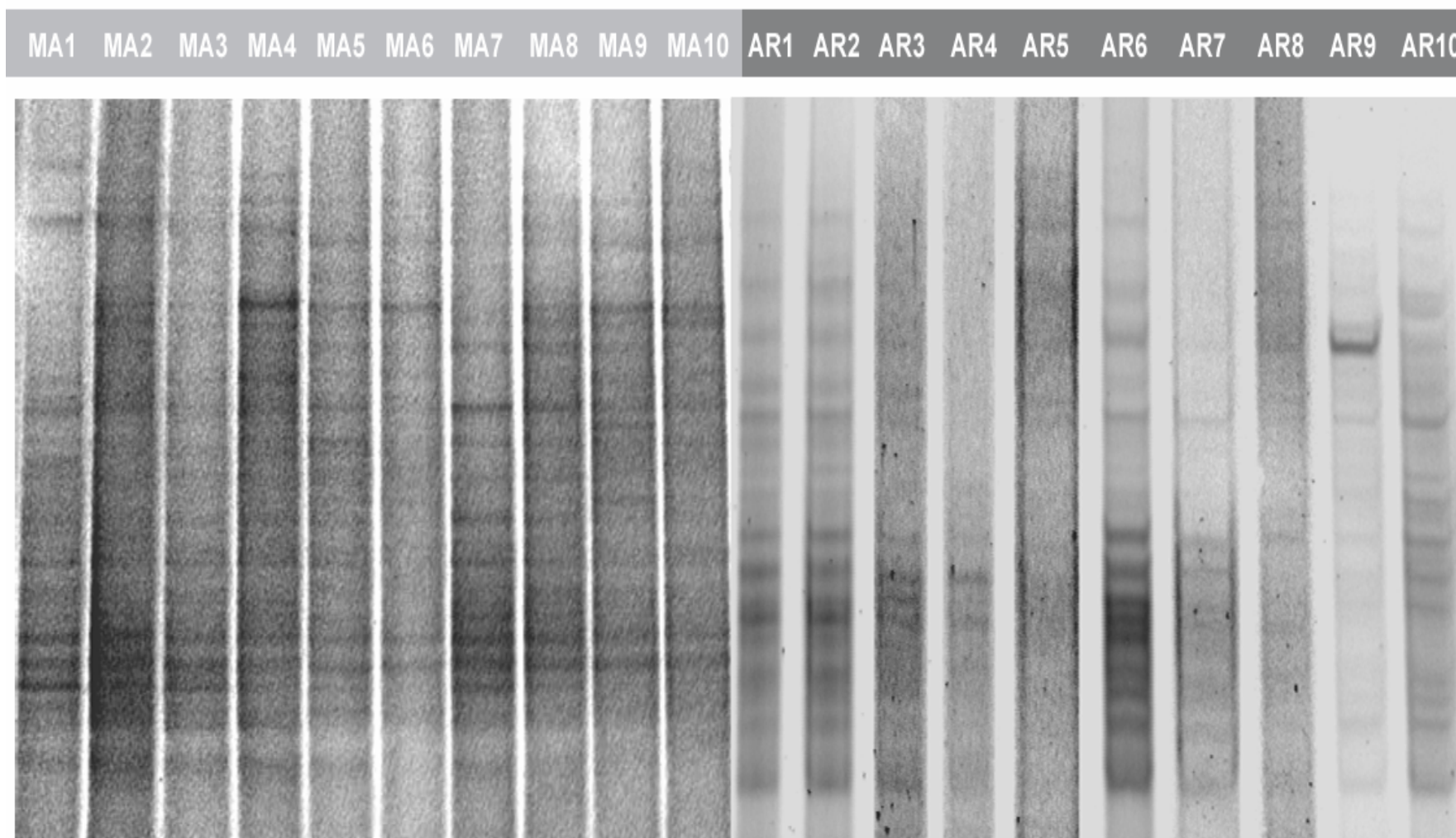


Figura 12 – ‘Amplicons’ na região V3 do rDNA 16S de bactérias, após separação por DGGE. As amostras representam os pontos utilizados nas áreas de solo médio-argiloso (MA) e argiloso (AR), sendo que 1-10 representam as repetições em cada área

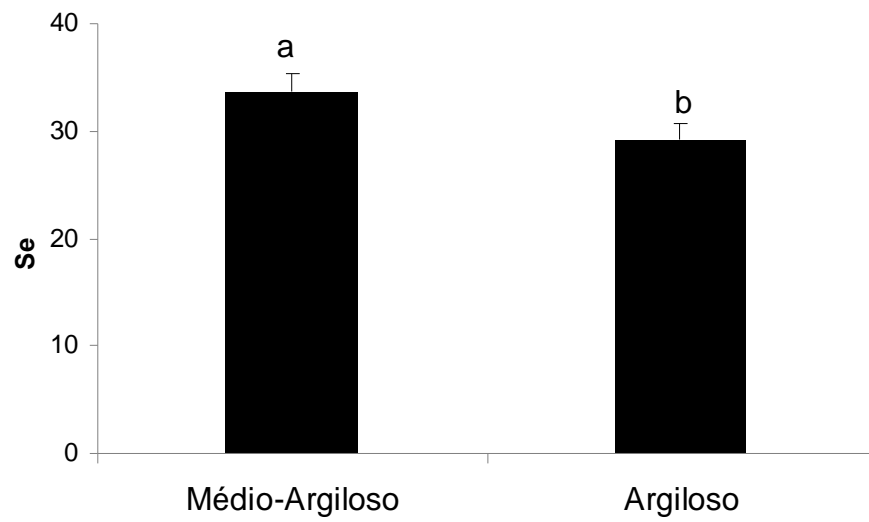


Figura 13 - Riqueza de 'amplicons' (Se) do rDNA 16S de bactérias, com base no número de bandas detectadas após separação por DGGE. (n = 10 pontos / área)

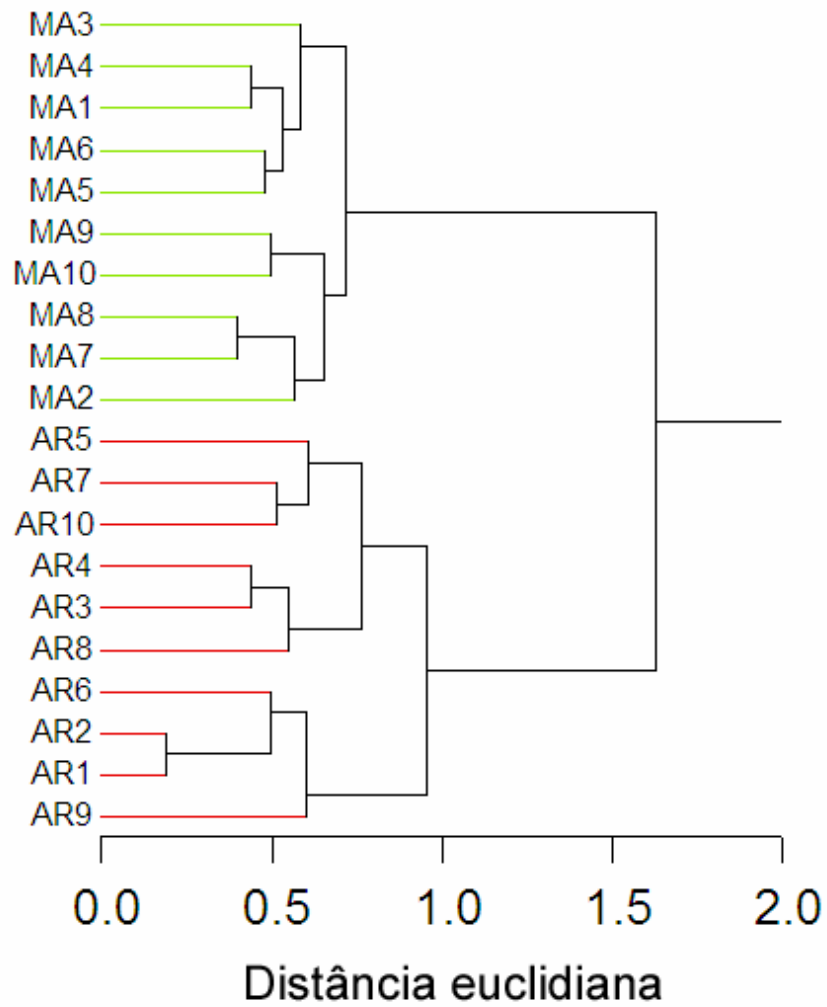


Figura 14 - Agrupamento hierárquico com base na separação de 'amplicons' de rDNA 16S de bactérias por DGGE. As amostras representam os pontos utilizados nas áreas de solo médio-argiloso e argiloso, 1-10 representam as repetições em cada área

Análise de componentes principais (ACP)

Os dois eixos principais explicam 80,3 % da variabilidade dos dados e indicam separação entre as amostras do solo de textura médio-argiloso e argiloso. O primeiro eixo explica 52,3 % dessa variabilidade e é o que melhor separa as amostras dos dois tipos de solo. As variáveis biológicas - Actinomicetos, Bactérias, Fungos e C da biomassa microbiana - têm maiores valores nas amostras do solo Médio-argiloso. Das variáveis químicas do solo, Mg, Mn, Cu, T, m, S, K e MO se encontram na parte negativa dos eixos 1 e 2 e estão associados às amostras do solo Argiloso (Figura 15).

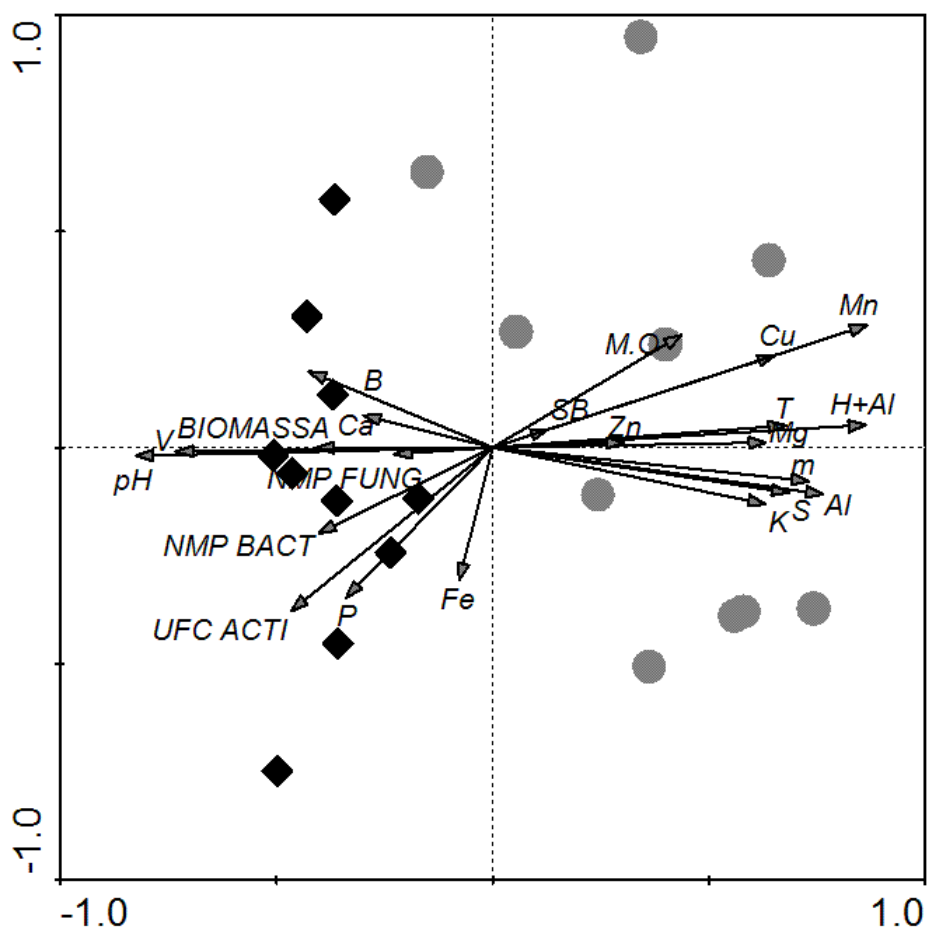


Figura 15 - Análise de componentes principais: 'Triplot' das variáveis ambientais (química do solo), contagens de microrganismos, e diversidade de bactérias em solo com textura médio-argilosa (◆) e argilosa (●).

Discussão

Diversas são as razões bioecológicas e edafoclimáticas que fazem com que os microrganismos encontrados naturalmente nos solos, possam ser considerados, como um dos agentes mais importantes para a não-sobrevivência de colônias iniciais em formigas cortadeiras do gênero *Atta*.

A fundação de uma nova colônia é um período crítico para as içás recém fecundadas. Sabe-se, por exemplo, que a profundidade da câmara inicial após a içá penetrar no solo, coincide, geralmente, com a camada mais superficial, tendo Autuori (1942), constatado uma variação entre 8,5 e 15 cm, e Gonçalves (1964), entre 9 e 12 cm, ambos para *A. sexdens rubropilosa*. A essas profundidades concentram-se também a maior parte dos microrganismos, graças à abundância de matéria orgânica e nutrientes (STOLP, 1988).

De acordo com Della Lucia et al. (1995), as rainhas de *A. sexdens rubropilosa* perdem em média 39,5% do seu peso durante os primeiros 120 dias após sua entrada no solo. Aliado a isso, a fundação claustral e a incapacidade de realizar uma limpeza eficiente do seu corpo antes do surgimento das primeiras operárias, que irão auxiliá-la nesta tarefa, não ocorre antes dos 60 dias (MARICONI, 1970), o que pode favorecer a ação inúmeros microrganismos entomopatogênicos.

Considerando-se que o solo se constitui num vasto reservatório de microrganismos, não só aqueles patogênicos quanto os não-patogênicos (RODRIGUES, 2004; CARREIRO et al., 1997), eles podem exercer um papel importante na sobrevivência das formigas e/ou do fungo, por competirem entre si por nutrientes e espaço. Neste último caso, a porção inicial de fungo, regurgitada pela futura rainha após a fundação do ninho, contem em média 0,390 mm³ (BENTO et al., 2002), e mesmo que higienizada constantemente pela rainha, fica em contato direto com o solo e necessita como os demais fungos de umidade para o seu desenvolvimento.

Neste trabalho, foi possível demonstrar uma menor sobrevivência de saúveiros iniciais de *A. sexdens rubropilosa* em solo de textura médio-argilosa proveniente de um plantio de cana-de-açúcar, contendo uma maior população microbiana, comprovado

principalmente, pelo carbono da biomassa microbiana (CBM) e pelo número mais provável (NMP) de bactérias, do que em um solo de textura argilosa sob a mesma cultura.

Embora em campo, o resultado do experimento conduzido nas mesmas áreas onde o solo foi coletado para o laboratório, não tenha apresentado diferença na sobrevivência dos ninhos, muitos fatores podem ter contribuído para este fim. Considerando-se que a mortalidade das rainhas em colônias iniciais pode-se dar por um ou mais fatores, isoladamente ou em conjunto, aparentemente, em laboratório, com a ausência de fatores externos como oscilações da umidade do solo (precipitação) e temperatura, que sabidamente influenciam a sobrevivência das novas colônias (MARICONI, 1974), os microrganismos podem ter se sobressaído. Nota-se, por exemplo, que muitos fungos entomopatogênicos (Tabela 6), comumente isolados em rainhas de *Atta* (ALVES; SOSA GOMEZ, 1983; LOUREIRO; MONTEIRO, 2004; LOPEZ et al., 1999; LOPEZ; ORDUZ, 2003), foram responsáveis por 36,4 e 25,7% da mortalidade das rainhas para os solos com textura médio-argilosa e argilosa, respectivamente (Tabela 3). Outros microrganismos entomopatogênicos como vírus e bactérias não foram avaliados.

Recentemente, as relações entre os microrganismos associados ao fungo de formigas da tribo Attini ganharam foco com os estudos de Currie et al. (1999a,b). Estes autores demonstraram a co-evolução do fungo cultivado, *L. gongylophorus*, o fungo patogênico *Escovopsis* e as próprias formigas. Na ausência das operárias, o fungo *L. gongylophorus* é rapidamente colonizado por esse patógeno. Em contrapartida, as formigas possuem na cutícula, uma espécie de actinomiceto que produz um composto efetivo exclusivamente contra o fungo patogênico *Escovopsis*, ilustrando a complexidade das interações no ambiente desses insetos (CURRIE, 2001).

Nas duas áreas com solos de textura distintas, a cultura da cana-de-açúcar vem sendo cultivada a cerca de 30 anos. Porém, ficou claro, por exemplo, que a diversidade de bactérias foi maior na área de solo com textura médio-argilosa (Figura 13), o que demonstra uma maior complexidade de interações entre os diferentes organismos neste ambiente. Do mesmo modo, as variáveis biológicas (bactérias, fungos, e actinomicetos), incluindo o carbono da biomassa microbiana, além de alguns micronutrientes como Fe

e B, e o nutriente P também foram mais relacionados ao solo de textura médio-argilosa, segundo a análise de componentes principais (ACP) (Figura 14). Já no solo com textura argilosa, foram as variáveis químicas como Mg, Mn, Cu, e K, além de M.O., m, e T as mais associadas.

Contudo, deve-se considerar o efeito das práticas agrícolas sobre os organismos do solo, fato este já investigado por diversos autores, incluindo Wallwork (1976), Anderson e Domsch (1990), Hassink et al. (1991), Edwards e Bohlen (1996) e Oliveira et al. (2000). Existe um consenso de que, dependendo da prática adotada, ela poderá ser benéfica ou prejudicial tanto aos microrganismos quanto às pragas, afetando a sua abundância, biomassa e diversidade (CURRY 1994; WARDLE, 1995; DIDHAM et al., 1996) e que a estrutura de comunidade dos microrganismos do solo é extremamente dependente das propriedades do solo (ALEF, 1995). Porém, estudos de como essas práticas agrícolas interferem na relação dos microrganismos com as pragas de solo são ainda escassos.

Em geral, as práticas agrícolas tendem a reduzir a diversidade de organismos presentes no solo, quando comparados ao seu ambiente natural. Entretanto, essas mudanças podem ser benéficas para algumas espécies, do ponto de vista quantitativo, resultando em altas densidades populacionais, como acontece com certas pragas de solo (VALPASSOS et al., 2001). Do mesmo modo, certas práticas agrícolas podem favorecer um aumento populacional de organismos benéficos, ou ainda, possibilitar o estabelecimento de novas espécies no sistema (STOTZKY, 1972).

Sob esta perspectiva, acredita-se que certas práticas agrícolas onde se permite a presença de uma única vegetação, ou onde há pouca alternância delas, em áreas extensas e por longos períodos, como neste estudo, tornariam esse agroecossistema mais seletivo para um determinado grupo de organismos.

Nas áreas selecionadas para este estudo, o solo contendo textura médio-argilosa não houve queima no canavial e foi realizada uma rotação de cultura com crotalária. Nesse caso, este solo, como demonstrado pela análise química (Tabela 5) apresentou 58,6% de saturação de bases (V), conferindo a este solo uma característica de boa fertilidade (eutrófica). Já no solo de textura argilosa, onde houve queima do canavial, e a não rotação com crotalária, apresentou 43,8% de V, conferindo uma baixa fertilidade

(distrófico). De acordo com Fowler e Robinson (1975) queimadas regulares podem favorecer a propagação de *Atta*. Já, Araújo et al. (2003) demonstraram que em áreas de queima recente de cana-de-açúcar, ocorreram alterações na constituição química e microbiológica do solo, elevando rapidamente a atividade destes últimos, podendo influenciar a sobrevivência de ninhos de *A. bisphaerica*.

Além disso, o uso regular de fertilizantes químicos também pode ter afetado a natureza química e microbiológica do solo. Entretanto, todos estes fatores listados não foram efetivamente avaliados quanto à sobrevivência ou não dos saúveiros iniciais em *A. sexdens rubropilosa*.

Existem ainda vários outros fatores que reconhecidamente afetam o estabelecimento de novos saúveiros. Dentre estes fatores, destacam-se, por exemplo, a predação, estiagem, excessos de chuvas e mortalidade natural (AUTUORI, 1942), que também não foram quantificados neste estudo e podem ter ocorrido em ambas as áreas.

Normalmente, as interações no solo são complexas e difíceis de serem comprovadas experimentalmente. Por exemplo, certos microrganismos funcionam como agentes reguladores de outros organismos, incluindo as pragas de solo. Assim, muitos microrganismos podem reduzir a fonte de alimento de um inseto ou outro organismo, ou ainda, competirem pelos mesmos substratos, afetando o desenvolvimento desse organismo (no caso um inseto) menos competitivo (LYNCH, 1990).

Portanto, os resultados deste estudo, considerando-se a ocorrência de microrganismos naturais do solo, sugerem uma menor sobrevivência de saúveiros iniciais em *A. sexdens rubropilosa*. Contudo, novos estudos, com solos de textura mais distintas e/ou procurando correlacionar outros fatores como a distribuição de chuvas, umidade do solo e temperatura do solo e ar, poderiam ser úteis para melhor esclarecer a parcela de contribuição dos microrganismos sobre a sobrevivência de saúveiros iniciais em formigas cortadeiras do gênero *Atta*.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As interações ecológicas dos organismos que vivem no solo, incluindo os microrganismos de solo e as formigas cortadeiras e seu fungo simbiote são muito ricas e complexas, com grande probabilidade de que surjam efeitos indiretos importantes no sistema, em razão dos diversos caminhos que essas interações podem tomar. Certos microrganismos podem reduzir ou dificultar a obtenção de alimento pela formiga e/ou seu fungo, ou ainda, competirem pelos mesmos substratos, afetando o seu desenvolvimento.

Este trabalho investigou o estabelecimento de saúveiros iniciais de *A. sexdens rubropilosa* em duas áreas de cultivo de cana-de-açúcar com solos de diferentes texturas (médio-argilosa e argilosa), comparando-se a influência dos fatores químicos e microbiológicos desses solos. Com os mesmos solos e seguindo a mesma metodologia o experimento foi também conduzido em laboratório.

Os resultados de laboratório demonstraram a importância dos microrganismos de ocorrência natural nos solos na sobrevivência dos saúveiros iniciais de *A. sexdens rubropilosa*. Em campo, todavia, os resultados de estabelecimento dos saúveiros iniciais não diferiram para ambas as áreas com textura médio-argilosa e argilosa, possivelmente, devido à ação de outros fatores que possam ter contribuído para este fim. Sendo assim, em condições de campo, fatores não avaliados como predadores, chuva, ressecamento do solo, mortalidade natural, manejo da cultura e fertilizantes podem ter contribuído para a não diferenciação da ação dos microrganismos do solo nas condições estudadas. Contudo, os resultados desse trabalho sugerem a contribuição dos microrganismos de ocorrência natural no solo como um importante agente na não sobrevivência e estabelecimento de saúveiros iniciais de *A. sexdens rubropilosa*.

REFERÊNCIAS

ABRIL, A.B.; BUCHER, E.H. Nutritional sources of the fungus cultured by leaf cutting ants. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 26, p. 243-247, 2004.

ALEF, K. Enrichment, isolation and counting of soil microorganisms In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P (ed) **Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry**, Academic Press, New York, 1995, p. 123-192.

ALVES, S.B. **Controle microbiano de Insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163 p.

ALVES, S.B.; SOSA GOMEZ, D.R. Virulência do *Metarhizium anisopliae* (METSCH) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Para duas castas de *Atta sexdens rubropilosa* (FOREL, 1908). **Poliagro**, Bandeirantes, v. 5, n. 1, p. 1-9, 1983.

AMADOR, J.A.; GÖRRES, J.H. Microbiological characterization of the structures built by earthworms and ants in an agricultural field. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 39, n. 8, p. 2070-2077, 2007.

ANDERSON, T.H.; DOMSCH, K.H. Applications of ecophysiological quotients (qCO₂ and qD) on microbial biomasses from soils of different cropping histories. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 22, n. 2, p. 251-255, 1990.

ARAÚJO, J.M. Estratégias para isolamento seletivo de actinomicetos In: MELO, I.S. de; AZEVEDO, J.L. de. (Org.). **Ecologia Microbiana**. Campinas: Embrapa, CNPNA, 1998. p. 351-367.

ARAÚJO, M.S.; DELLA LUCIA, T.M.C.; RIBEIRO, G.A.; KASUYA, M.C.M. Impacto da queima controlada da cana-de-açúcar na nidificação e estabelecimento de colônias de *Atta bisphaerica* Forel (Hymenoptera:Formicidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 32, n.4, p. 685-691, 2003.

AUTUORI, M. Contribuição para conhecimento da saúva (*Atta* spp) (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) I. Evolução do saúveiro (*Atta sexdens rubropilosa* FOREL, 1908) **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 12, p. 197-232, 1941.

AUTUORI, M. Contribuição para conhecimento da saúva (*Atta* spp) (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) II. O saueiro inicial (*Atta sexdens rubropilosa* FOREL, 1908). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 13, p. 67-97, 1942a.

AUTUORI, M. Contribuição para conhecimento da saúva (*Atta* spp) (HYMENOPTERA: FORMICIDAE). III. Escavação de um saueiro (*Atta sexdens rubropilosa* FOREL, 1908). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 13, p. 137-149, 1942b.

AUTUORI, M. Contribuição para conhecimento da saúva (*Atta* spp) (HYMENOPTERA: FORMICIDAE). IV. O saueiro depois da 1ª revoada (*Atta sexdens rubropilosa* FOREL, 1908). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 18, p. 39-69, 1947.

AUTUORI, M. Contribuição para conhecimento da saúva (*Atta* spp) (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) V. Número de formas aladas e redução dos saueiros iniciais (*Atta sexdens rubropilosa* FOREL, 1908). **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v. 19, p. 325-331, 1950.

BASSI, M.; CHERRET, J.M. Fungus garden structure in the leaf-cutting ant *Atta sexdens* (Formicidae, Attini). **Symbiosis**, Philadelphia, v. 21, p. 9-24, 1996.

BENTO, J.M. S.; DELLA LUCIA, T. M. C.; MUCHOVEJ, R. M. C; VILELA, E. F. Influência da composição química e da população microbiana de diferentes horizontes do solo no estabelecimento de saueiros iniciais de *Atta laevigata* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) em laboratório. **Anais da Sociedade Entomológica de Brasil**. Jaboticabal. v. 20, n. 2, p. 307-317. 1991.

BENTO, J.M.S.; DELLA LUCIA, T.M.C.; ARAÚJO, M.S.; VEIGA, C.E. O fungo simbiote de fêmeas de *Atta* spp. (FORMICIDAE, ATTINI) e sua relação com o sucesso no estabelecimento de colônias. **Acta Biologica Leopoldensia**, São Leopoldo, v. 24, n. 2, p. 199-203, 2002.

BOULTON, A.M.; AMBERMAN, K.D. How ants nests increase soil biota richness and abundance: A field experiment. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 15, p. 69-82, 2006.

CABELLO, M.; ARAMBARRI, A. Diversity in soil fungi from undisturbed and disturbed *Celtis tala* and *Scutia buxifolia* forests in the eastern Buenos Aires province (Argentina). **Microbiological Research**, Jena, v. 157, p. 115-125. 2002.

CARDOSO, E. J. B. N. Ecologia microbiana do solo.. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S. M.; NEVES, M.C.P. (Org.). **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992, p. 33-40.

CARDOSO, E. J. B. N. In: GALLI, F. (Org.). **Manual de fitopatologia**. 2 ed. São Paulo: Agronômica Ceres LTDA, 1978, v. 1, p. 26-51.

CARREIRO, S.C.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O.C.; BACCI, M.J.R.; HEBLING, M.J.A.; SILVA, A.O. Yeasts associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 71, n.3, p. 243–248. 1997.

CARROL, G.C.; WICKLOW, D.T. **The fungal community**: its organization and role in the ecosystem. 2 ed. New York Marcel Dekker, 1992. 975p.

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

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

CURRIE, C.R.; MUELLER, U.G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 96, n.14, p. 7998–8002, 1999b.

CURRIE, C.R. A community of ants, fungi and bacteria: A multilateral approach to studying of symbiosis. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 55, p. 357-380, 2001.

CURRY, J.P. **Grasslands invertebrates**: ecology, influence on soil fertility and effects on plant growth. London, Chapman and Hall, 1994. 437p.

CURY, J.C. **Atividade microbiana e diversidades metabólica e genética do solo de mangue contaminado com petróleo**. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 84p. 2002.

DAUBER, J.; WOLTERS, V. Microbial activity and functional diversity in the mounds of three different ant species. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.32, p.93-99, 2000.

DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.). **As formigas cortadeiras**. Viçosa. Folha de Viçosa, 262p. 1993.

DELLA LUCIA, T.M.C.; ARAÚJO, M.S. Fundação e estabelecimento de formigueiros. In: DELLA LUCIA, T. M. C. **As formigas cortadeiras**. Viçosa. Folha de Viçosa, p.60-83. 1993.

DELLA LUCIA, T.M.C.; BENTO, J.M.S.; Vôo nupcial ou revoada. In: DELLA LUCIA, T. M. C. **As formigas cortadeiras**. Viçosa. Folha de Viçosa, p. 54-59. 1993.

DELLA LUCIA, T.M.C.; MOREIRA, D.D.O.; Caracterização dos ninhos In: DELLA LUCIA, T.M.C. **As formigas cortadeiras**. Viçosa. Folha de Viçosa, p.32-42. 1993.

DELLA LUCIA, T.M.C.; FOWLER, H.G; As formigas cortadeiras In: DELLA LUCIA, T. M. C. **As formigas cortadeiras**. Viçosa. Folha de Viçosa, p. 1-3. 1993.

DELLA LUCIA, T. M. C.; MOREIRA, D. D. O.; OLIVEIRA, M. A.; ARAÚJO, M. S. Perdas de peso de rainhas de *Atta* durante a fundação e o estabelecimento das colônias. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos v. 55, n. 4, p. 533-536, 1995.

DIDHAM, R.K.; GHAZOUL, J.; STORK, N.E.; DAVIS, A.J.; Insects in fragmented forests: a functional approach. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 11, n. 6, p. 255-260, 1996.

EDWARDS, C.A.; BOHLEN, P.J. **The biology and ecology of earthworms**. London: Chapman and Hall, 1996, 426p.

ELSAS, J.D.; DUARTE, G.F.; ROSADO, A.S.; SMALLA, K. Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam. v. 32, p. 133-154, 1998.

FARJI BRENER, A.G.; SILVA, J. F. Leaf-cutting ant nests and soil fertility in a well-drained savanna in western Venezuela, **Biotropica**, Washington, v. 27, n. 2, p. 250-253, 1995.

FARJI BRENER, A.G.; ILLES, A.E. Do leaf-cutting ant nests make “bottom-up” gaps in neotropical rain forests: a critical review of the evidence. **Ecology Letters**, Oxford, v. 3, p. 219-227, 2000.

FERNÁNDEZ-MARÍN, H.; ZIMMERMAN, J.K.; WCISLO, W.T. Ecological traits and evolutionary sequence of nest establishment in fungus-growing ants (Hymenoptera, Formicidae, Attini) **Biological Journal of Linnean Society**, London, v. 81, p. 39-48. 2004.

FISHER P.J.; STRADLING, D.J.; SUTTON, B.C.; PETRINI, L.E. Microfungi in the fungus gardens of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*: a preliminary study. **Mycological Research**, Cambridge, v. 100, p. 541-546.1996.

FOWLER, H.G.S.; ROBINSON, S.W. Estimaciones acerca de la accion de *Acromyrmex landolti* Forel (Hymenoptera: Formicidae) sobre el pastoreo y la granaderia em el Paraguay, **Revista de la Sociedad Científica del Paraguay**, v. 15, p.64-71, 1975.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L; BATISTA, G.C. de; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**, Piracicaba; FEALQ, 2002, 920p.

GRAY, T.R.G. Soil bacteria. In DINDAL, D.L. **Soil biology guide**, New York: John Wiley & Sons, p.15-31. 1990.

HASSINK, J. LEBBINK, G. VANVEEN, J.A. Microbial biomass and activity of a reclaimed-polder soil under a conventional or a reduced-input farming system. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 23, n. 6, p. 507-513, 1991.

HEISEY, R. M.; PUTNAM, A. R. A survey of soil microorganism for herbicidal activity. In THOMPSON, A.C. (ed.) **The Chemistry of allelopathy: Biochemical interactions among plants**, Washington. American Chemical Society. p. 337-349. 1985.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E.O. **The Ants**. The Belknap Press of Harvard University Press. Cambridge, 1990. 732 p.

IAC, Interpretação de análises de solo. Disponível em:
<<http://www.iac.sp.gov.br/Centros/CSRA/AMOSTRAdeSOLO/InterpretacaoAnaliseSolo.htm>> Acesso em 07 de novembro de 2007.

JAHNEL, M.C.; CARDOSO, E.J.B.N.; DIAS, C.T.S. Determinação do número mais provável de microrganismos do solo pelo método de plaqueamento por gotas. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v. 23, p. 553-559, 1999.

JUSTI JUNIOR, J.; IMENES, S.L.; BERGMANN, E.C. **Formigas cortadeiras**: Boletim Técnico, Instituto Biológico, São Paulo, n. 4, 31p. 1996.

KENNEDY, A.C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 74, p. 65-76. 1999.

KENT, A.D.; TRIPLETT, E.W. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems, **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 56, p. 211-236. 2002.

LAMBAIS, M.R.; CURY, J.C.; MALUCHE-BARETTA, C. BULL, R.C. Diversidade Microbiana nos Solos: Definindo Novos paradigmas. In VIDAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L.R.F.; COOPER, M.; SILVA, A.P.; CARDOSO, E.J. (Ed.) **Tópicos em ciência do solo**, Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. v. 4, p. 43-84.

LANE, R.D.; BASSIRIRAD, H. Diminishing effects of ant mounds on soil heterogeneity across a chronosequence of prairie restoration sites. **Pedobiologia**, Jena, v. 49, p. 359-366, 2005.

LITTLE, A.E.F.; MURAKAMI, T.; MUELLER, U.G.; CURRIE, C.R. The infrabuccal pellet piles of fungus-growing ants. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 90, p. 558-562, 2003.

LOPEZ, E.; ORDUZ, S. *Metarhizium anisopliae* and *Trichoderma viride* for control of nests of the fungus-growing ant, *Atta cephalotes*. **Biological Control**, Orlando, v. 27, p. 194-200, 2003.

LOPEZ, E.; ROMERO, M.; ORTIZ, A. ORDUZ, S.; Primer registro de *Metarhizium anisopliae* infectando reinas de *Atta cephalotes* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) em Colombia. **Revista Colombiana de Entomologia**, Bogotá, v. 25, n. 1-2, p. 49-56, 1999.

LOUREIRO, E.de S.; MONTEIRO, A.C. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Paecilomyces farinosus*, patogênicos para operárias de *Atta sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 1, p. 35-40, 2004.

LYNCH, J.M. **The rhizosphere**. New York: Wiley-Interscience, 1990. 458 p.

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

MARICONI, F.A.M. Contribuição para o conhecimento do sauveiro inicial da saúva parda *Atta capiguara* Gonçalves, 1944 (Hymenoptera: Formicidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal. v. 3, p. 5-13, 1974.

MEHDIABADI, N.J.; HUGHES, B.; MUELLER, U.G. Cooperation, conflict, and coevolution in the attine ant-fungus symbiosis. **Behavioral Ecology**, Cary, v. 17, p. 291-296, 2006.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2002, 626p.

MUELLER, U.G.; POULIN, J.; ADAMS, R.M.M.; Symbiont choice in a fungus-growing ant (Attini, Formicidae). **Behavioral Ecology**, Cary. v. 15, n. 2, p. 357-364, 2004

MUELLER, U.G.; GERARDO, N.M.; AANEN, D.K.; SIX, D.L. SCHULTZ, T.R.; The evolution of agriculture in insects. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**. Palo Alto, v. 36, p. 563-595, 2005.

MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, New York. v.155, p.335-351. 1987.

MUYZER, G.; BRINKHOFF, T.; NUBEL, U.; SANTEGOEDS, C.; SCHAFER, H.; WAWER, C. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. In: AKKERMANS, A.D.L.; VAN ELSAS, J.D.; de BRUIJIN, F.J. (Ed) **Molecular microbial ecology manual**. Dordrecht: Kluwer Academic, p.1-23, 1998.

MYERS, R.M.; FISCHER, S.G.; LERMAN, L.S.; MANIATIS, T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.13, p.3131-3145, 1985.

OLIVEIRA, L.J.; HOFMANN-CAMPO, C.B.; GARCIA, M.A. Effect of soil management on the white grub population and damage in soybean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 5, p. 887-894, 2000.

ORTIZ, A.; MADRIGAL, A.; ORDUZ, S. Evaluación del comportamiento de las hormigas *Atta cephalotes* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) frente a la contaminación del jardín del hongo con *Trichoderma lignorum*. **Revista Colombiana de Entomología**, Bogotá, v. 25, n. 3, p. 169-177, 1999.

OVREAS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F.L.; TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 9, p. 3367-3373, 1997.

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

PRICE, W.P. An overview of organismal interactions in ecosystems in evolutionary and ecological time. **Agriculture Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 2, p. 369-377. 1988.

RIBEIRO, G.T. & WOESSNER, R.A. Estudo sobre a biologia de saúveiros iniciais de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758), (Hymenoptera: Formicidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 11, p. 49-56. 1982.

RODRIGUES, A. **Ocorrência de fungos filamentosos em ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) submetidos a tratamentos com iscas tóxicas**. 2004. 84p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Área de concentração: Microbiologia Aplicada). – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2004.

ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F. O uso de PCR na diagnose e caracterização de microrganismos. In: MELO, I.S. **Recursos genéticos e melhoramento**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 129-147, 2002 a.

ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F. Utilização de eletroforese em gel com gradiente de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura (TGGE) para estudar diversidade microbiana. In: MELO, I.S. **Recursos genéticos e melhoramento**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 97-128, 2002b.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. **Science**, Cambridge, v. 239, p. 487-491, 1988.

SAS Institute 1998 User's Manual, Version 7.0. SAS Institute, Cary, NC.

SHEFFIELD, V.C.; COX, D.R.; MYERS, R.M. Attachment of a 40 bp G+C rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, p. 232-236, 1989.

SILVA, A.; BACCI JUNIOR, M.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O.C.; HEBLING, M.J.A. Starch metabolism in *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. **Microbiological Research**, Jena, v. 161, p. 299-303, 2006a.

SILVA, A.; RODRIGUES, A.; BACCI JR, M.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.. Susceptibility of the ant-cultivated fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales: Basidiomycota) towards microfungi. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 162, p. 115-119, 2006b.

SILVA, F.A.M. **Seleção de microrganismos com potencial de produção de compostos alelopáticos para o controle de plantas daninhas**. 2004. 73p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

STOLP, H. **Microbial ecology**: organisms, habitats, activities. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. 308p.

STOTZKY, G. Activity, ecology and population dynamics of microorganisms in soil. **Critical Review in Microbiology**, Boca Raton, v. 2, p. 59-137, 1972.

VALINSKY, L.; VEDOVA, G.D.; SCUPHAM, A.; ALVEY, S.; FIGUEROA, A.; YIN, B.; HARTIN, R.J.; CHROBAK, M.; CROWLEY, D.E.; JIANG T.; BORNEMAN, J. Analysis of microbial community composition using oligonucleotide fingerprinting of ribosomal RNA genes, **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 3243–3250. 2002.

VALPASSOS, M.A.R.; CAVALCANTE, E.G.S.; CASSIOLATO, A.M.R.; ALVES, M.C. Effects of soil management systems on soil microbial activity, bulk density and chemical properties. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36 p. 1539-1545, 2001.

VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 19, p. 703-707, 1987.

VERCHOT, L.; V. MOUTINHO, P.R.; DAVIDSON, E.A. Leaf cutting ant (*Atta sexdens*) and nutrient cycling; deep soil inorganic nitrogen stocks, mineralization, and nitrification in Eastern Amazonia. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 35, p. 1219-1222, 2003.

VILLESEN, P.; GERTSCH, P.J.; FRYDENBERG, J.; MUELLER, U.G.; BOOMSMA, J. Evolutionary transition from single to multiple mating in fungus-growing ants. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, p. 1819-1825. 1999.

WAGNER, D.; JONES, J.B.; GORDON, D.M. Development of harvester ant colonies alters soil chemistry. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 36, p. 797-804. 2004.

WAKSMAN, S. A. **The actinomycetes**: their nature, occurrence activeness and importance. Massachusetts, Chronica Botanica Co., 230p. 1950.

WALLWORK, J.A. **The distribution and diversity of soil fauna**. London: Academic Press, 1976. 355p.

WARD, D.M.; BATESON, M.M.; WELLER, R.; RUFF-ROBERTS, A.L. Ribosomal RNA analysis of microorganisms as they occur in nature. **Advances in Microbial Ecology**, New York, v. 12, p. 219-286, 1992.

WARDLE, D.A. Impacts of disturbance on detritus food webs in agro-ecosystems of contrasting tillage and weed management practices. **Advances in Ecological Research**, London, v. 26, p. 105-185, 1995.

WEBER, N.A. Gardening ants, the Attines. **Memoirs of the American Philosophical Society**, Philadelphia, v. 92, p. 1-146. 1972.

ZIENTZ, E.; FELDHAAR, H.; STOLL, S.; GROSS, R. Insights into the microbial world associated with ants. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 184, p. 199-206, 2005.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)