

SYSTEMATICS, MORPHOLOGY AND PHYSIOLOGY

Efeito de Secreções da Glândula Mandibular de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) Sobre a Germinação de Conídios de *Botrytis cinerea* Pers. Fr.

ALBERTO L. MARSARO JÚNIOR¹, TEREZINHA M.C. DELLA LUCIA¹, LUIZ C.A. BARBOSA²,
LUIZ A. MAFFIA³ E MARCELO A.B. MORANDI³

¹Depto. de Biologia Animal, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa, MG

²Depto. de Química, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa, MG

³Depto. de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa, MG

Neotropical Entomology 30(3): 403-406 (2001)

Inhibition of the Germination of *Botrytis cinerea* Pers. Fr. Conidia by Extracts of the Mandibular Gland of *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae)

ABSTRACT - This research investigated the effect of mandibular gland secretions of *Atta sexdens rubropilosa* Forel on the germination of *Botrytis cinerea* Pers. Fr. conidia. This fungus attacks several species of cultivated plants of economic importance. From 20 mandibular glands of workers of the leaf-cutting ant (3.60-4.30 mm head capsule width) we obtained 9.4 mg of acetone soluble secretion. To this mass, sterile water and the dispersing agent Tween 20 were added to prepare four doses which composed the treatments of 0.94 mg/ml, 4.70 mg/ml, 9.40 mg/ml and 37.60 mg/ml. We also used a negative control (water), a solvent control (acetone) and a positive control (the Mancozeb fungicide at 1600 ppm). Five microliters of *B. cinerea* conidia suspension were added to excavated plates maintained at 20°C in the dark. Therefore the solution concentrations of the treatments were reduced to half, that is 0.47 mg/ml, 2.35 mg/ml, 4.70 mg/ml and 18.80 mg/ml. A total of 12 replicates were performed for each of four treatments. The percentage of conidia germination was obtained 8h after treatments. Results by Probit analysis of data indicated that higher gland concentrations led to higher inhibition of conidia germination. The concentration of 18.80 mg/ml had an inhibitory effect (94.2%) similar to that of Mancozeb (95.3%).

KEY WORDS: Insecta, leaf-cutting ants, antifungal activity, plant pathogenic fungus.

RESUMO - Estudou-se o efeito de secreções da glândula mandibular de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) sobre a germinação de conídios de *Botrytis cinerea* Pers. Fr., fungo fitopatogênico de várias plantas de importância econômica. De 20 glândulas mandibulares de operárias dessa formiga cortadeira, com cápsula cefálica entre 3,60 e 4,30 mm, obtiveram-se 9,40 mg de secreção, aos quais adicionaram-se 0,25 ml de água esterilizada, resultando em uma solução de concentração 37,60 mg/ml. Essa mistura foi utilizada para o preparo de soluções com diferentes concentrações de secreção (0,94 mg/ml, 4,70 mg/ml e 9,40 mg/ml). Foram também preparadas uma testemunha negativa (água), uma testemunha de acetona e outra positiva, o fungicida Mancozeb a 1600 ppm. A cada 5 ml de solução dos tratamentos, foram adicionados 5 ml de suspensão de conídios de *B. cinerea* em lâminas escavadas, as quais foram mantidas a 20°C, no escuro. Portanto as concentrações das soluções dos tratamentos foram reduzidas à metade, ou seja, 0,47 mg/ml, 2,35 mg/ml, 4,70 mg/ml e 18,80 mg/ml. Após 8h, determinou-se a porcentagem de germinação de conídios desse fungo. Os experimentos foram realizados em 12 repetições. A análise de Probit indicou que quanto maior a concentração das soluções, maior foi o efeito inibitório sobre a germinação de conídios de *B. cinerea*. A solução de concentração 18,80 mg/ml mostrou efeito inibitório de (94,2%) semelhante ao do fungicida Mancozeb (95,3%).

PALAVRAS-CHAVE: Insecta, formigas cortadeiras, atividade antifúngica, fungo fitopatogênico.

As formigas cortadeiras causam prejuízos elevados aos setores florestal e agrícola uma vez que utilizam fragmentos de vegetais para manterem a cultura de seu fungo simbiótico, do qual se alimentam. Essa associação mutualística é difícil de ser rompida, pois além de substrato adequado, envolve substâncias antifúngicas e antibacterianas secretadas pelas formigas na glândula da metapleura (Maschwitz *et al.* 1970, Schildknecht & Koob 1970) ou pelo próprio fungo simbiote (Kermarrec *et al.* 1986). Recentemente, Currie *et al.* (1999) constataram a presença, no corpo de operárias de *Attini*, de uma bactéria filamentosa simbiote do gênero *Streptomyces*. Essa bactéria produz antibióticos especificamente contra o fungo *Escovopsis*, parasita do jardim de fungo nas várias espécies dessas formigas. A bactéria é, portanto, um terceiro mutualista nessa simbiose antiga com as cortadeiras. As próprias formigas cortadeiras produzem várias substâncias químicas, podendo ser consideradas fontes de aleloquímicos e feromônios.

A glândula mandibular de espécies de *Atta* é conhecida pela produção do feromônio de alarme que desencadeia comportamento de alarme e defesa (Brown *et al.* 1970), mas as secreções dessa glândula têm sido mencionadas como causadoras de efeito fungicida. Com base nisso, neste trabalho investigou-se o efeito da secreção da glândula mandibular de *Atta sexdens rubropilosa* Forel sobre a germinação de conídios do fungo *Botrytis cinerea* Pers. Fr., patógeno responsável por perdas na produção e qualidade pós-colheita em várias plantas de importância econômica (Redmond *et al.* 1987).

Material e Métodos

Vinte glândulas mandibulares de *A. sexdens rubropilosa* foram extraídas (com auxílio de pinça), de operárias com cápsula cefálica de 3,60 mm a 4,30 mm. Tais operárias foram obtidas de formigueiros do laboratório do Insetário da Universidade Federal de Viçosa (UFV). As condições de manutenção das salas do laboratório eram iguais às condições sugeridas por Della Lucia *et al.* (1993), ou seja, $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 70 a 85% de U.R.

A seguir, as glândulas mandibulares foram maceradas em 400 ml de acetona p.a. A solução obtida foi filtrada para remoção dos fragmentos das mandíbulas e da membrana que envolve a glândula mandibular, e em seguida evaporou-se o solvente sob fluxo de nitrogênio, o que resultou em 9,40 mg de extrato como um resíduo pastoso. A esse extrato adicionou-se 0,25 ml de água esterilizada, resultando em uma solução de concentração 37,60 mg/ml. A partir dessa solução foram estabelecidas três concentrações adicionais, mediante sucessivas diluições, que resultaram nas concentrações de 0,94 mg/ml, 4,70 mg/ml e 9,40 mg/ml. Além desses tratamentos, incluiu-se uma testemunha negativa (água), uma testemunha de acetona e outra positiva (fungicida Mancozeb – Manzate 800 - a 1600 ppm).

A suspensão de conídios de *B. cinerea* foi preparada em água esterilizada contendo Tween 20 (100 ml de água para 5µl de Tween), a qual foi agitada para evitar a aglomeração desses conídios. Essa suspensão foi calibrada para se obter a contagem de, pelo menos, 100 esporos no campo visual de um microscópio ótico, com objetiva de 40x (Dhingra &

Sinclair 1995). Em seguida, 5 µl de cada uma das soluções dos extratos foram adicionados a 5 µl de suspensão de conídios do fungo sobre lâminas escavadas. Portanto, as concentrações das soluções dos tratamentos foram reduzidas à metade, ou seja, 0,47 mg/ml, 2,35 mg/ml, 4,70 mg/ml e 18,80 mg/ml.

Posteriormente, as lâminas foram acondicionadas em caixas de plástico (gerbox) com papel úmido no fundo, para manter a umidade, após o que incubou-se o material por oito horas a 20°C no escuro conforme metodologia descrita por Tatagiba (1996) para realização de ensaios biológicos utilizando *B. cinerea*. A testemunha negativa, de acetona, e a positiva foram submetidas às avaliações nessas mesmas condições.

Quando a testemunha em água apresentava germinação de conídios de *B. cinerea* próxima a 80%, contaram-se, com auxílio de microscópio ótico (objetiva de 40x), 100 conídios aleatoriamente, e computou-se o número dos germinados por tratamento. Os conídios considerados germinados eram os que possuíam tubo germinativo maior que a maior dimensão do conídio. Todos os experimentos foram repetidos 12 vezes e os resultados obtidos foram analisados através de Probit utilizando-se o procedimento PROC PROBIT do SAS (SAS 1989).

Resultados e Discussão

No tratamento com acetona, os conídios apresentaram porcentagem de germinação de 81,0%, semelhante àquela da testemunha negativa (água), que foi de 80,3%, mostrando que a acetona não interferiu na germinação dos mesmos. A solução com a concentração de 0,47 mg/ml já foi suficiente para causar pequeno efeito inibitório na germinação dos conídios (22,3%) quando comparada com a testemunha água (19,7%). À medida em que se aumentaram as concentrações dos tratamentos, verificou-se maior efeito inibitório sobre a germinação dos conídios conforme observa-se na Fig. 1. Ressalta-se que a concentração máxima utilizada (18,80 mg/ml) mostrou efeito semelhante ao do fungicida Mancozeb inibindo 94,2%, comparados com 95,3% de inibição pelo referido fungicida. Pode-se inferir, ainda na Fig.1, que a concentração necessária para inibir 50,0% da germinação de conídios de *B. cinerea* é de 7,21 mg/ml (IC 95%: 6,83-7,60). Os valores de inibição de germinação preditos pelo modelo Probit não diferiram significativamente dos valores realmente observados no bioensaio (baixo c^2 e $P > 0,05$), portanto o modelo de Probit foi adequado à análise de concentração x resposta.

Os resultados obtidos evidenciam que soluções de secreções da glândula mandibular de *A. sexdens rubropilosa* mesmo em pequenas concentrações já têm a capacidade de inibir a germinação de conídios de *B. cinerea*; e em altas concentrações têm efeito semelhante ao do fungicida Mancozeb que reconhecidamente apresenta efeito contra a germinação desses conídios.

Efeito inibitório sobre a germinação de conídios de fungos patogênicos de plantas foi também observado por Akino *et al.* (1995). Esses autores mostraram que o composto 3-formyl-7,11-dimethyl-(2E,6Z,10)-dodecatrienal, isolado da glândula mandibular da formiga *Lasius fuliginosus* Latreille

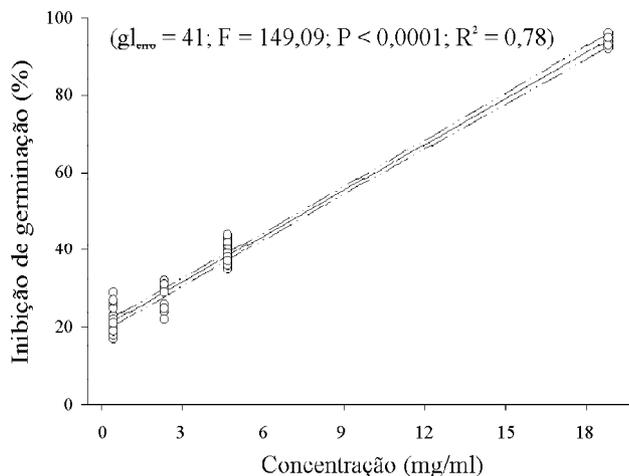


Figura 1. Curva de inibição da germinação de conídios do fungo *B. cinerea*, sob diferentes concentrações das soluções de secreção da glandular mandibular (mg/ml de água) de *A. sexdens rubropilosa* (e curvas de intervalo de confiança a 95%), a 20°C em escuridão total. (Probit: GL do $c^2 = 2$, $c^2 = 4,23$ e $P = 0,12$).

(Hymenoptera:Formicidae), inibiu completamente a germinação de esporos do fungo fitopatogênico *Colletotrichum lagenarium* (Pass.) Ell. & Haslst, a partir de 1 ppm e de quatro fungos entomopatogênicos, *Verticillium lecanii* (Zimmerman) Viegas, *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metharhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., a partir de 10 ppm. Ressalta-se também que Mackintosh *et al.* (1995) constataram que secreções obtidas da glândula metapleural de *Myrmecia gulosa* Fabricius (Hymenoptera: Formicidae), além de afetarem o desenvolvimento de células de protoplastos do fungo *Candida albicans* (Robin) Berkh, também apresentaram atividade antibacteriana contra *Bacillus cereus* Frankland & Frankland, *Escherichia coli* (Migula) Castellani & Chalmers e *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula. Esses últimos resultados reforçam a atribuição de função antibacteriana das secreções da glândula metapleural por Maschwitz *et al.* (1970) e Schildknecht & Koob (1970).

Atividade antibacteriana de secreções de glândulas de formigas foi também verificada por Brough (1983). Essa autora constatou que a concentração de seis glândulas mandibulares de *Calomyrmex* sp. (Hymenoptera: Formicidae)/ml de água esterilizada apresentou atividade inibitória equivalente a 51, 154, 378 e 154 unidades do antibiótico streptomomicina, para as bactérias A-4, A-5, B-6 e C-8, respectivamente, todas elas isoladas do solo. Além disso, a autora constatou que essa mesma concentração de glândulas mandibulares também inibiu o crescimento micelial do fungo *Trichoderma* sp.

Atividades antifúngica e antibacteriana, semelhante àquelas causadas por substâncias provenientes de formigas, também têm sido relatadas em outros grupos de insetos, como por exemplo em moscas (Alvarez-Bravo *et al.* 1994). Esses autores verificaram atividade antimicrobiana contra

Staphylococcus aureus Rosenbach, *E. coli* e antifúngica contra *C. albicans*, a partir de peptídios sintetizados de sapecin B (proteína antibacteriana da hemolinfa larval) da mosca varejeira *Sarcophaga peregrina* (Robineau – Desvoidy). Em abelhas *Bombus pascuorum* (Scopoli), Rees *et al.* (1997) verificaram que peptídeos produzidos na hemolinfa exerceram atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Há evidências de que o fungo simbiótico de *Atta* spp. e *Acromyrmex* spp. secreta o ácido fenilacético, que suprime o crescimento bacteriano; o ácido D-3-hidroxicaproico (o mirmicacina), que inibe a germinação de esporos de outros fungos, e o ácido indol-3-acético, que estimula o crescimento micelial conforme citação de Della Lucia & Araújo (1993). Fowler *et al.* (1991) afirmaram que as bactérias coexistem em equilíbrio com as formigas e são reguladas pelas mesmas mediante a acidificação do substrato e pelo uso de secreções glandulares.

Constata-se que a secreção da glândula mandibular de *A. sexdens rubropilosa* é capaz de inibir a germinação de conídios de fungos fitopatogênicos, como evidenciado para *B. cinerea*. Embora ainda não esclarecido, isso pode ter sido ocasionado pelos compostos cetônicos em maior quantidade nas glândulas mandibulares de *A. sexdens rubropilosa*, como a 5-metileptan-3-ona (Butenandt *et al.* 1959) e a 4-metileptan-3-ona (Blum *et al.* 1968). Essa capacidade de inibição, possivelmente característica defensiva das formigas cortadeiras, pode ser utilizada para se obterem compostos antifúngicos e antibacterianos que poderão vir a ser utilizados para o controle de patógenos de plantas cultivadas. Permanece, portanto, a necessidade de estudos mais detalhados sobre essas substâncias para que se possa definir o seu potencial e uso pelo homem.

Agradecimentos

À CAPES e ao CNPq pelas bolsas de iniciação científica, de pesquisa e de mestrado concedidas. Ao Professor José Cola Zanuncio pelas sugestões no manuscrito e ao Professor Raul N. C. Guedes pelo auxílio nas análises estatísticas.

Literatura Citada

- Akino, T., T. Turushima & R. Yamaoka. 1995. 3-Formyl-7,11-dimethyl-(2E,6Z,10)-dodecatrienal: antifungal compound in the mandibular gland of the ant *Lasius fuliginosus* Latreille. Nippon Nogeikagaku Kaishi 69: 1581-1586.
- Alvarez-Bravo, J., S. Kurata & S. Natori. 1994. Novel synthetic antimicrobial peptides effective against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Biochem. J. 302: 535-538.
- Blum, M.S. 1968. Alarm pheromones. Annu. Rev. Entomol. 14: 157-180.
- Brough, E.J. 1983. The antimicrobial activity of the mandibular gland secretion of a Formicine ant, *Calomyrmex* sp. (Hymenoptera: Formicidae). J. Invertebr. Pathol. 42: 306-311.
- Brown Jr., W.L., T. Eisner & R.H. Whittaker. 1970. Allomones and kairomones: transpecific chemical

messengers. *Bioscience* 20: 21-22.

- Butenandt, A., B. Linzen & M. Lindauer. 1959.** Über einen dufts toff aus dre mandibeldrüse der blastscheneiderameise *Atta sexdens rubropilosa* Forel. *Arch. Anat. Micros. Morphol. Exper.* 48: 13-19.
- Currie, C.R., J.A. Scott, R.C. Summerbell & D. Malloch. 1999.** Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature* 398: 701-704.
- Della Lucia, T.M.C., E.F. Vilela, N. Anjos & D.O. Moreira. 1993.** Criação de formigas cortadeiras em laboratório, p. 151-162. In T.M.C. Della Lucia (ed.), *As formigas cortadeiras*. Viçosa, Editora Folha de Viçosa, 262p.
- Della Lucia, T.M.C. & M.S. Araújo. 1993.** Fundação e estabelecimento de formigueiros, p. 60-83. In T.M.C. Della Lucia (ed.), *As formigas cortadeiras*. Viçosa, Editora Folha de Viçosa, 262p.
- Dhingra, O.D. & J.B. Sinclair. 1995.** Basic plant pathology methods. London, CRC Lewis Publishers, 439p.
- Fowler, H.G., L.C. Forti, C.R.F. Brandão, J.C. Delabie & H.L. Vasconcelos. 1991.** Ecologia nutricional das formigas, p. 131-223. In A.P. Panizzi & J.R.P. Parra (eds.), *Ecologia nutricional de insetos*. São Paulo, Manole, 359p.
- Kermarrec, A., M. Decharme & G.Febvay. 1986.** Leaf-cutting ant symbiotic fungi: a synthesis of recent research, p. 231-246. In C.S. Lofgren & R.K. Vander Meer (eds.), *Fire ants and leaf-cutting ants: biology and management*. Boulder, Westview Press, 435p.
- Mackintosh, J.A., J.E. Trimble, M.K. Jones, P.H. Karuso, A.J. Beattie & D.A. Veal. 1995.** Antimicrobial mode of action of secretions from the metapleural gland of *Myrmecia gulosa* (Australian bull ant). *Can. J. Microbiol.* 41: 136-144.
- Maschwitz, U., K. Koob. & H. Schildknecht. 1970.** Ein beitrage zur funktion der methato racaldriise der ameison. *J. Insect Physiol.* 16: 387-404.
- Redmond, J.C., J.J. Marois & J.D. Mac Donald. 1987.** Biological control of *Botrytis cinerea* on roses with epiphytic microorganisms. *Plant. Dis.* 71: 799-802.
- Rees, J.A., M. Moniate & P. Bulet. 1997.** Novel antibacterial peptides isolated from an European bumblebee, *Bombus pascuorum* (Hymenoptera, Apidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27: 413-422.
- SAS Institute SAS/STAT. 1989.** User's guide, Version 6, Fourth Edition, SAS Institute, Cary, N.C.
- Schildknecht, H. & K. Koob. 1970.** Plant bioregulators in the metathoracic glands of myrmicine ants. *Angew. Chem., Int. Ed. Eng.* 9: 173-178.
- Tatagiba, J. S. 1996.** Avaliação de microorganismos para o controle biológico de *Botrytis cinerea* em roseira. (Dissertação de Mestrado). Viçosa, UFV, 58p.

Received 04/XI/1999. Accepted 20/VI/01.