
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CAIO FELIPE CAVICCHIA ZAMUNÉR

**BIOCONTROLE DE FORMIGAS-CORTADEIRAS
UTILIZANDO O FUNGO *ESCOVOPSIS***

CAIO FELIPE CAVICCHIA ZAMUNÉR

BIOCONTROLE DE FORMIGAS-CORTADEIRAS UTILIZANDO O
FUNGO *ESCOVOPSIS*

Orientador: Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca

Coorientador: Prof. Dr. Odair Correa Bueno

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio
Claro, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas

Rio Claro
2015

595.796 Zamunér, Caio Felipe Cavicchia
Z26b Biocontrole de formigas-cortadeiras utilizando o fungo Escovopsis /
Caio Felipe Cavicchia Zamunér. - Rio Claro, 2015
38 f. : il., gráfs., tabs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Fernando Carlos Pagnocca
Coorientador: Odair Correa Bueno

1. Formiga. 2. Formigas-cortadeiras. 2. Controle biológico. 3. Atta
sexdens. 4. Conídios. I. Título.

Aos meus pais Fausto e Nicéia e minha
irmã Mariana, pelos ensinamentos,
confiança e apoio incondicional.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por firmar meus pés e iluminar meus passos;

Ao meu orientador Dr. Fernando Carlos Pagnocca, pela oportunidade, orientação, paciência, apoio e todo o conhecimento passado;

Ao Dr. Odair Correa Bueno, pelo apoio e grande aprendizado proporcionado;

À agência FAPESP pelo financiamento durante a realização deste projeto;

À toda minha família, pela confiança, “puxões de orelha” e grande apoio em todos os momentos da minha vida;

Ao Pedrão e Mariana e nossa nova companheira de jornada Ana Beatriz, pela alegria proporcionada;

A todos os meus professores que fizeram minha formação possível;

À minha grande companheira Carolina, principalmente pela paciência, companheirismo, carinho e amor;

Ao meu grande irmão Arthur, pela amizade e conselhos trocados que sempre me fizeram seguir em frente;

A todos os meus amigos: Marin, Bigo, Branca, Rapunzel, Ébão, Bafo, Jigsaw, Aveia, Ina, Mack, Porteira, Gaga, Cobra, por todos os momentos que fizeram esses anos na universidade muito valiosos e inesquecíveis;

Aos companheiros de laboratório, Dani, Daiane, Maria, Renan (Bolha), Paixão, Vir, Ana Paula, Ranieri, Samuel e Lídia.

A Dr. Weilan Paixão por todos os ensinamentos, ajuda e inúmeras risadas;

A Dr. Virgínia pela grande ajuda e conhecimento passado;

Ao grande apoio das meninas do Laboratório de Formigas Cortadeiras e Laboratório de Formigas Urbanas Marcela, Ita e Thais;

E a todos que fizeram parte desse trabalho e desses anos em minha vida, contribuindo direta ou indiretamente, meus humildes agradecimentos.

The greatest obstacle to discovery is not
ignorance - it is the illusion of knowledge.

Daniel J. Boorstin

RESUMO

As formigas-cortadeiras (gêneros *Atta* e *Acromyrmex*) compõem o grupo mais derivado dentre as formigas cultivadoras de fungo, sendo consideradas os maiores herbívoros dos Neotrópicos. Elas vivem em mutualismo obrigatório com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* (Basidiomycota: Agaricales), ao qual fornecem partes frescas de vegetais como substrato, consumindo-o posteriormente como alimento. Além disso, essas formigas promovem a dispersão do fungo e ainda o protegem contra parasitas e micro-organismos competidores através de estratégias mecânicas e químicas de higienização. Apesar desses cuidados, uma grande variedade de grupos e espécies microbianas (leveduras, bactérias filamentosas, microfungos) vive em seus ninhos e em seu exoesqueleto. Um desses micro-organismos é o fungo do gênero *Escovopsis*, considerado um potente antagonista do fungo mutualista. O *Escovopsis* é encontrado na maioria dos jardins de fungo das espécies de formigas da tribo Attini e pode causar um total colapso do ninho, devido ao seu rápido crescimento e a suposta ação necrotrófica que possui sobre o fungo mutualista. Neste trabalho estudamos o comportamento das formigas frente as diferentes linhagens desse fungo, buscando selecionar linhagens de *Escovopsis*, de acordo com a taxa de germinação de conídios, que pudessem ser testadas em um método de biocontrole das formigas-cortadeiras. Foram observados os efeitos do *Escovopsis* sobre colônias e sub-colônias da formiga cortadeira da espécie *Atta sexdens rubropilosa*. Os resultados mostraram que a incorporação das linhagens selecionadas (EAS e Esc II) em iscas atrativas, visando provocar uma infestação na colônia, não ocasionou a morte das colônias e precisa ser melhor estudada. O uso do fungo *Escovopsis* como agente de biocontrole é uma abordagem nova, sendo necessário que sejam realizados mais estudos do comportamento das formigas quanto aos seus hábitos de forrageamento e de interação com este antagonista, para a busca de uma metodologia eficaz.

Palavras-chave: Controle biológico. *Atta sexdens*. Conídios.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 As formigas-cortadeiras e a necessidade de seu controle.....	10
1.2 O fungo mutualista das formigas-cortadeiras.....	11
1.3 Outros micro-organismos associados.....	11
1.4 O fungo antagonista.....	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivos gerais.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Seleção das linhagens do fungo antagonista baseada na taxa de germinação.....	15
3.1.1 Preparo do inóculo para os testes de viabilidade.....	15
3.1.2 Preservação das culturas.....	16
3.2 Crescimento massal do <i>Escovopsis</i> em grãos de arroz com sorgo.....	16
3.3 Crescimento massal do <i>Escovopsis</i> em flocos de aveia.....	17
3.4 Preparo das iscas peletizadas.....	17
3.5 Ensaio com sub-colônias.....	18
3.6 Ensaio com colônias integrais.....	19
3.7 Fornecimento das íscas	19
3.7.1 Ensaio em sub-colônias.....	19
3.7.2 Ensaio em colônias integrais.....	20
3.7.3 Íscas peletizadas.....	20
3.8 Sub-colônias inoculadas com suspensão de conídios.....	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 Seleção de linhagens do fungo antagonista (<i>Escovopsis</i>).....	22
4.2 Crescimento massal do <i>Escovopsis</i> em grãos de arroz com sorgo.....	25
4.3 Crescimento massal do <i>Escovopsis</i> em aveia.....	25
4.4 Fornecimento dos substratos e iscas às formigas.....	26
4.5 Sub-colônias inoculadas com suspensão de conídios.....	28

5 CONCLUSÃO.....	30
-------------------------	-----------

REFERÊNCIAS.....	31
-------------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

As formigas da tribo Attini (Hymenoptera: Formicidae) compõem um grupo monofilético, com mais de 296 espécies (BRANDÃO et al., 2011) descritas e de distribuição restrita ao Novo Mundo – maior parte Neotropical (SCHULTZ; MEIER, 1995; MAYHÉ-NUNES; JAFFÉ, 1998; WETTERER et al., 1998). Elas são agrupadas dessa forma porque todas mantêm um mutualismo obrigatório, cultivando fungos utilizados como base alimentar da colônia. Em contra partida, fornecem ao fungo substrato para seu crescimento, dispersão para novos locais e o protegem contra competidores e parasitas (WEBER, 1972; QUINLAN; CHERRETT, 1977; BASS; CHERRETT, 1994; CURRIE; STUART, 2001). A fungicultura tem uma única origem antiga, provavelmente na Região Amazônica, por volta de 50 milhões de anos atrás, depois da separação da América do Sul e da África (SCHULTZ; MEIER, 1995; SCHULTZ; BRADY, 2008).

A tribo abriga 17 gêneros (BRANDÃO et al., 2011; SOSA-CALVO et al., 2013) de formigas cultivadoras de fungos: *Apterostigma*; *Attaichnus*, *Cyatta*, *Cyphomyrmex*; *Kalathomyrmex*; *Mycetagoicus*; *Mycetarotes*; *Mycocepurus* *Mycetophylax*; *Mycetosoritis*; *Myrmicocripta*; *Paramycetophylax*; *Trachymyrmex*; *Sericomyrmex*; *Pseudoatta*; *Atta* e *Acromyrmex*. (SCHULTZ; MEIER, 1995; BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES, 2001; KLINGENBERG; BRANDÃO, 2009).

São identificados tipos diferentes de fungicultura entre os representantes atuais das Attini, relacionados com a evolução do cultivo, (SCHULTZ; BRADY, 2008): agricultura basal, observada na maioria das espécies da tribo, onde o fungo é menos especializado, sendo semelhante às espécies de vida livre; cultivo de fungos “corais” (Pterulaceae), realizado, secundariamente, por alguns gêneros como *Apterostigma*; agricultura de leveduras, encontrada apenas no gênero *Cyphomyrmex* (restrita ao grupo *rimosus*); agricultura superior (incluindo as formigas-cortadeiras), na qual o fungo encontra-se em alto grau de domesticação – provavelmente incapaz de levar uma vida livre – e produz uma estrutura especializada na extremidade da hifa que acumula nutrientes (gongilídio) (WEBER, 1972; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990) e é consumido, preferencialmente, pelas larvas. Na fungicultura são oferecidos como substrato ao fungo fezes de insetos, partes mortas de plantas e carcaças de vertebrados (MEHDIABADI; SCHULTZ, 2009). Entretanto, as formigas-cortadeiras utilizam

partes frescas de plantas, como folhas, flores e brotos como substrato (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

1.1 As formigas-cortadeiras e a necessidade de seu controle

Os gêneros *Acromyrmex* e *Atta* compõem o grupo mais derivado filogeneticamente dentro da tribo Attini, o das formigas-cortadeiras (SCHULTZ; MEIER, 1995; SCHULTZ; BRADY, 2008). Essa denominação é dada para esses insetos, pois cortam o material vegetal com suas mandíbulas fornecendo-o como substrato para o cultivo do fungo mutualista (MÖLLER, 1893; WHEELER, 1907).

Por esse comportamento, as formigas-cortadeiras são consideradas os herbívoros dominantes dos Neotrópicos (HÖLLDOBLER; WILSON, 2010) e podem ser responsáveis pelo corte de 12 a 17% da produção de folhas em florestas tropicais (CHERRETT, 1986). O desfolhamento realizado por elas pode trazer inúmeros prejuízos à agricultura, danos no manejo de áreas de restauração e às pastagens naturais e cultivadas; muitas vezes, nesses casos, as formigas são consideradas pragas. Os danos econômicos e ambientais podem incluir ainda a erosão no solo (provocado pelos ninhos em desenvolvimento), diminuição no valor da propriedade infestada e danos físicos a animais e equipamentos (FOWLER et al. 1990; DELLA LUCIA, 1999). Estimativas do dano econômico em plantações de pinheiros sob constante desfolhações provocadas por populações de *Atta laevigata* e *Atta sexdens* (L.) , indicam que a perda de volume de madeira alcança 14% em áreas com 5 ninhos/ha e em áreas com mais de 15 ninhos/ha a perda pode chegar a 50% (HERNÁNDEZ & JAFFÉ, 1995).

Por conta disso, produtos químicos (geralmente a base de sulfluramida ou diflubenzuron) são utilizados como uma forma de controle das formigas-cortadeiras (SANTOS et al., 2007). Todavia, esta estratégia pode acarretar em riscos ambientais devido à contaminação do solo, da água e efeitos cumulativos nas teias alimentares. Além disso, as iscas inseticidas que são utilizadas para o controle das formigas não possuem especificidade, são comumente rejeitadas e a colônia é reestabelecida após a aplicação, resultando em baixa eficiência e custo elevado (CHERRETT; PEREGRINE, 1976; LOFGREN, 1986).

Nesse contexto, é imprescindível que se busquem métodos de biocontrole que substituam os pesticidas atualmente utilizados, oferecendo maior eficiência e menor impacto ambiental. O uso de inimigos naturais no controle biológico é interessante, já que tais organismos evoluíram para utilizar a praga em questão e, muitas vezes, superar as defesas desse

hospedeiro (FOLGARAIT et al., 2011). A utilização de métodos alternativos, como o biocontrole por fungos, pode ser uma estratégia a ser desenvolvida, pois esses micro-organismos possuem mecanismos únicos de ação, alta especificidade, baixo custo relativo e representam pequeno risco ao ambiente (DEBACH, 1974; CHARNLEY, 1997).

1.2 O fungo mutualista das formigas-cortadeiras

O fungo cultivado pelas formigas-cortadeiras pertence à espécie *Leucoagaricus gongylophorus* (Basidiomycota: Agaricales: Agaricaceae: Lecocoprineae) (SINGER, 1986; CHAPPELLA et al., 1994; MUELLER et al., 1998; SILVA-PINHATI et al., 2004; MIKHEYEV et al., 2006). As operárias possuem diversas estratégias para promover o crescimento do fungo e estratégias de higiene para evitar a proliferação de micro-organismos contaminantes (MARTIN, 1992; MUELLER et al., 2001; DINIZ; BUENO 2009). A coevolução entre o fungo e as formigas resultou em um alto grau de interdependência, de maneira que um organismo não pode viver sem o outro (MARTIN, 1992; MUELLER et al., 2001).

Além do fungo *L. gongylophorus*, outros micro-organismos podem ser encontrados em associação com as formigas (CRAVEN et al., 1970; CARREIRO et al., 2004; RODRIGUES et al., 2005; PINTO-TOMÁS et al., 2009; BARKE et al., 2010; PAGNOCCA et al., 2012), sendo que grande parte da função dessa microbiota ainda é desconhecida. Durante o desenvolvimento da agricultura do fungo mutualista, outros micro-organismos coevoluíram na simbiose, como o fungo do gênero *Escovopsis*, considerado antagonista específico do jardim de formigas (CURRIE et al., 2003).

1.3 Outros micro-organismos associados

Já foram isolados vários micro-organismos das câmaras de fungo, dos depósitos de descarte e do exoesqueleto das formigas. Por muito tempo considerados contaminantes ou organismos transitórios, vários deles tem mostrado importantes papéis nos ninhos de formiga. Por exemplo, as bactérias filamentosas do gênero *Pseudonocardia*, isoladas do exoesqueleto das operárias (CURRIE et al., 1999b; CAFARO; CURRIE, 2005), além de outros gêneros de bactérias, parecem ter um importante papel na inibição do parasita *Escovopsis* e de outros

microfungos, sendo consideradas como o quarto membro da simbiose. Leveduras também podem ser encontradas associadas às formigas e seus ninhos. O primeiro relato com esse grupo de micro-organismos foi realizado por Craven et al. (1970) sem um caráter sistemático, porém, Pagnocca et al. (2008) em estudos com içás virgens de *Atta leavigata* e *A. capiguara*, isolaram leveduras da cavidade infrabucal e de várias partes do corpo desses insetos, indicando que, além do fungo simbiote, ocorre a dispersão de vários micro-organismos durante a revoada reprodutiva.

Little e Currie (2007, 2008) relataram a ocorrência de uma levedura negra de gênero *Phialophora* nas fôveas da cutícula das formigas. Tal levedura parece estar associada à bactéria *Pseudonocardia*, nutrindo-se à custa dela e inibindo seu crescimento, sugerindo a presença de um quinto organismo participante da simbiose. Recentemente, duas novas espécies de leveduras negras, *Phialophora capiguarae* e *P. attae* foram descritas, as quais foram isoladas de formas aladas de formigas cortadeiras da espécie *Atta capiguara* e *A. laevigata* (ATILLI-ANGELIS et al., 2014)

1.4 O fungo antagonista

Escovopsis é um microfungo anamórfico, ascomiceto, pertencente à ordem Hypocreales (CURRIE et al., 2003) com 7 espécies descritas atualmente: *Escovopsis weberi* (MUCHOVEJ; DELLA LUCIA, 1990), *E. aspergilloides* (SEIFERT et al., 1995), *E. lentecrenciae*, *E. microspora* e *E. moelleri* (AUGUSTIN et al., 2013), *E. trichodermoides* (MASIULIONIS et al., 2015) e *E. Kreiselii* (MEIRELLES et al., 2015). Apesar de algumas diferenças morfológicas, a maioria deles possui micélio de coloração inicialmente branca e, à medida que os conídios amadurecem, adquirem cor marrom. Tal fungo parece estar obrigatoriamente associado à interação formiga-fungo mutualista, uma vez que foram encontrados, naturalmente, apenas nos jardins de fungo e depósitos de lixo dos ninhos de formigas Attini (SEIFERT et al., 1995; CURRIE et al., 1999a; BOT et al., 2001; AUGUSTIN et al., 2013).

A patogenicidade de *Escovopsis* foi observada por Currie et al. (1999a), demonstrando que ele obedece a todos os postulados de Koch. Entretanto, a natureza da patogenicidade ainda é incerta. O estudo de Reynolds e Currie (2004) mostrou que o *Escovopsis* cresce muito bem em placas contendo apenas cultivo do fungo mutualista e sugere que ele é um micoparasita, que sobrevive pela ação lítica das hifas do fungo. Ele possui um rápido crescimento –

podendo ocupar todo o espaço disponível nas câmaras de fungo em 72 horas - e provoca infecções persistentes, causando a diminuição na taxa de crescimento dos jardins de fungo (CURRIE, 2001). Uma vez detectada a infecção, as operárias procuram se livrar das partes contaminadas, retirando-as para os depósitos de descarte. Contudo, o rápido crescimento e a ação deletéria do *Escovopsis* sobre o fungo mutualista pode levar ao total colapso do ninho em poucos dias (Figura 1).

Figura 1 – Jardim de fungo em colônia de laboratório de *Atta sexdens rubropilosa* tomado completamente pelo *Escovopsis* (em destaque: micélio branco, saindo pela câmara central do ninho).



Foto cedida pelo Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

A presente proposta teve como objetivo geral selecionar uma linhagem de fungo do gênero *Escovopsis* que pudesse ser utilizada para o desenvolvimento de um método de biocontrole de formigas-cortadeiras.

2.2 Objetivos específicos

(i) Avaliar a viabilidade (taxa de germinação) dos conídios produzidos; (ii) avaliar o crescimento em diferentes substratos e (iii) eficácia da linhagem selecionada como agente de biocontrole sobre a formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção das linhagens do fungo antagonista baseada na taxa de germinação dos conídios.

Foi realizada uma triagem com cinco linhagens EAH, EAS, EAB, Esc II e Esc III do fungo *Escovopsis*, previamente isoladas em nosso laboratório, para verificar a produção de conídios e determinar a viabilidade dos mesmos. As linhagens EAH, EAS, Esc II e Esc III foram sequenciados e identificadas como sendo *Escovopsis weberi*. Já EAB trata-se de uma nova espécie descrita por nosso laboratório: *E. trichodermoides*, isolado de um ninho de *Mycocepurus goeldii*. A linhagem EAH foi isolada do jardim de um ninho de *Atta sexdens rubropilosa* ao qual havia sido aplicado o pesticida hidrametilnona; no caso de EAS, o isolado foi também obtido de um ninho de *Atta sexdens rubropilosa* ao qual havia sido aplicado sulfluramida. Os isolados Esc II e Esc III foram obtidos de dois ninhos de *Acromyrmex lobicornis*.

3.1.1 Preparo do inóculo para os testes de viabilidade

Os inóculos de conídios foram preparados de duas maneiras: numa delas, a suspensão foi preparada com solução de NaCl 0,85% esterilizada; a outra suspensão foi preparada com a mesma solução salina, com adição do agente tensoativo Tween 80[®] 0,05% (v/v) para tentar melhorar a dispersão dos conídios. As linhagens foram incubadas em meio PDA (*Potato Dextrose Agar*) por sete dias a 25°C. A concentração inicial de conídios foi ajustada para 10⁶ conídios.mL⁻¹ com auxílio de câmara de Neubauer. As suspensões foram diluídas até a concentração de 10⁴ conídios.mL⁻¹ e alíquotas de 100 µL foram semeadas em cinco placas de Petri contendo meio PDA durante quatro dias a 25°C, para a determinação da viabilidade dos conídios. Para os ensaios com adição de Tween 80[®] foram realizadas cinco repetições e para os ensaios com salina apenas, foram realizadas 15 repetições.

3.1.2 Preservação das culturas

Os isolados foram conservados no meio PDA e preservados na forma de *plugs* de ágar em água destilada esterilizada a 4°C (CASTELLANI, 1967), a fim de manter as características das linhagens originais.

3.2 Crescimento massal do *Escovopsis* em grãos de arroz com sorgo

Grãos de arroz e sorgo umedecidos e esterelizados foram previamente fornecidos as formigas para verificarmos se os mesmos eram aceitos e utilizados para o forrageamento dos ninhos. Uma vez confirmada a aceitação, começamos os testes para o crescimento do *Escovopsis* na mistura de grãos de arroz e sorgo (15:1 m/m).

Foram testados cinco protocolos (A, B, C, D e E) para o crescimento das linhagens de *Escovopsis* nos grãos de arroz com sorgo visando a seleção de um protocolo que oferecesse um maior crescimento massal.

O protocolo A descrito a seguir, foi adaptado da empresa Ballagro Agro Tecnologia, a qual utiliza o mesmo para produção massal de conídios de fungos dos gêneros *Trichoderma* e *Metarhizium*, agentes de controle biológico de pragas agrícolas. Uma mistura contendo 1.5 kg de quirera de arroz + 200 g de sorgo foi preparada, subdividida (embalada) em sacos plásticos de polipropileno (300 g/saco) e umedecida com a adição de 20 mL uma solução de ácido cítrico 0,05% (m/v), pH 4,7. O protocolo B seguiu os mesmos parâmetros exceto pela hidratação da mistura, a qual foi feita com 20 mL de água destilada esterilizada. As embalagens foram, então, autoclavadas durante 30 minutos.

Para os outros protocolos, foi preparada um mistura de 200g sorgo (hidratado por 3 horas) e 1,5 kg de arroz parboilizado polido tipo 1, hidratado de diferentes formas: (C) 50 minutos em água fria (adaptado de REZENDE, 2009); (D) 2 horas em água fria e (E) 40 minutos em água quente (adaptado de ALVAREZ, 2013). Após o processo de hidratação, o arroz foi coado e a água da hidratação foi coletada e esterilizada. A mistura de sorgo e arroz foi dividida em sacos plásticos (300 g/cada) e autoclavada durante 30 minutos.

As linhagens EAS, Esc II e Esc III foram, então, cultivadas em meio PDA e incubadas a 25°C durante sete dias para produção e amadurecimento dos conídios. Após a incubação, foi feita uma suspensão de 10^9 conídios.mL⁻¹ de cada.

Para o método A, a suspensão de conídios foi feita em solução de ácido cítrico 0,05% e pH 4,7. Para o método B, o inóculo foi preparado em solução de NaCl 0,85% esterilizada, a fim de verificar se o ácido cítrico influenciaria o crescimento do fungo. No caso dos métodos C, D e E, a suspensão foi preparada na água da hidratação do arroz, para recuperar qualquer nutriente perdido durante o período de hidratação. Em todos os casos foram inoculados 20 mL de suspensão de conídios. A inoculação nas embalagens ocorreu em até 24 horas após a esterilização.

3.3 Crescimento massal do *Escovopsis* em flocos de aveia

Flocos de aveia, que normalmente são bem aceitos pelas formigas e são incorporados no jardim de fungos, foram testados para verificar o crescimento de *Escovopsis*. As linhagens que apresentaram as maiores taxas de germinação (6.1) foram cultivadas em meio PDA e incubadas a 25°C durante sete dias para a produção e amadurecimento dos conídios. Os conídios foram raspados da placa e foi preparada uma suspensão de 20 mL (ajustada a 10^9 conídios/mL.⁻¹) em NaCl 0,85%. Também foram testadas suspensões preparadas em solução de ácido cítrico 0,05% (m/v), pH 4,7. Sacos plásticos transparentes de polipropileno contendo 200 g de grãos de aveia umedecidos com 20 mL de água destilada foram autoclavados durante 30 minutos. Após 24 horas de resfriamento, as suspensões de conídios (em NaCl ou ácido cítrico) foram inoculadas e os sacos incubados durante 15 dias a 25°C, no escuro.

3.4 Preparo das iscas peletizadas

As iscas foram confeccionadas de duas maneiras: (i) utilizando a linhagem EAS crescida em aveia e (ii) utilizando conídios da linhagem Esc II.

No primeiro caso, a linhagem EAS foi utilizada para a confecção de iscas por apresentar um elevado crescimento em flocos de aveia. Os flocos de aveia com *Escovopsis* foram triturados e pesados, sendo 200 g misturados com 760 g de polpa cítrica e 40 mL de óleo vegetal, para serem peletizados.

Para confecção das iscas peletizadas com a linhagem Esc II, o fungo foi cultivado em placas de PDA durante sete dias à 25°C. O micélio, juntamente com os conídios maduros, foram

raspados das placas para a obtenção de 10 g de material fúngico. Essa biomassa foi misturada com 86 g de polpa cítrica e 4 mL de óleo vegetal e a mistura foi peletizada.

3.5 Ensaios com sub-colônias

O ninho de *Atta sexdens rubropilosa* utilizado para a preparação das sub-colônias foi coletado na Fazenda Corumbataí, município de Corumbataí – São Paulo e vem sendo mantido por vários anos em laboratório. Deste ninho foram retiradas doze porções da região superior do jardim de fungo, contendo operárias de vários tamanhos, larvas e pupas. As porções, pesando entre 2,0 – 2,5 g foram utilizadas na preparação de sub-colônias (JACCOUD et al., 1999). Estas consistem em um recipiente central, de plástico transparente, de 100 mL de volume, contendo uma camada com espessura de 1 cm de gesso, no fundo, para manter a umidade. Posteriormente, outros dois recipientes laterais, idênticos, foram interligados ao primeiro por tubos plásticos transparentes (Figura 2). Um dos frascos laterais foi usado para fornecimento do substrato vegetal e o outro para deposição do material de descarte (debris vegetais, micélio velho do fungo mutualista, formigas mortas).

A estas doze sub-colônias foram fornecidas folhas de *Hibiscus* sp., em dias alternados, durante uma semana, para estabilização dos ninhos, permitindo às formigas reorganizarem o jardim de fungo. Após este período, o material de descarte dos ninhos foi esvaziado, suspendeu-se a alimentação dos ninhos por um período de 48 horas e então o tratamento com o substrato contendo conídios do fungo *Escovopsis* teve início.

Figura 2 – Sub-colônia utilizada nos bioensaios. No recipiente central encontra-se o jardim de fungos, com larvas, pupas e operárias; no recipiente da esquerda é colocado o material de forrageamento. A seta vermelha indica o material de descarte.



Fonte: Foto por Caio Zamunér

3.6 Ensaio com colônias integrais

Neste tipo de ensaio, foram utilizadas seis colônias pequenas, porém integrais, de *Atta sexdens rubropilosa* coletadas na Fazenda Corumbataí, município de Corumbataí, São Paulo e mantidas nos nossos laboratórios. Tais colônias, além da rainha, continham operárias de diversos tamanhos, larvas e pupas. Essas colônias foram acondicionadas em recipiente plástico transparente de 1000 mL, com uma camada de gesso no fundo para manter a umidade do jardim de fungo. A montagem desses ninhos foi semelhante à das sub-colônias (Figura 3).

Figura 3 – Modelo das colônias completas utilizadas nos ensaios (seta verde = câmara de descarte; seta azul = câmara contendo o jardim de fungo; seta roxa = câmara de forrageamento).



Fonte: Foto por Caio Zamuner

As colônias foram mantidas em sala climatizada a 25°C e foram abastecidas diariamente com folhas de *Hibiscus* sp. A alimentação das colônias foi suspensa 48 horas antes do início do fornecimento.

3.7 Fornecimento das iscas

3.7.1 Ensaio em sub-colônias

Foram realizados quatro tipos de fornecimento de acordo com o estágio de crescimento do fungo no substrato em questão: (i) flocos de aveia com conídios maduros; (ii) flocos de aveia apenas com hifas; (iii) arroz com conídios maduros e (iv) arroz apenas com hifas.

Para cada sub-colônia foram fornecidos 10 grãos dos substratos (i-iv) nos quais haviam se desenvolvido as linhagens de *Escovopsis* selecionadas (EAS, Esc II e Esc III). Foram utilizadas três sub-colônias para cada linhagem e três como controle (ao qual foi fornecido apenas os substratos) em um total de 12 ninhos.

O carregamento, incorporação e devolução foi registrado nas 24 horas subsequentes.. As colônias foram monitoradas diariamente, durante 7 dias, para verificar a ocorrência da infecção por *Escovopsis* nos jardins de fungo.

3.7.2 Ensaio em colônias integrais

Para os ensaios com as colônias integrais, 3 colônias receberam 1,5 g de substrato contendo a linhagem Esc II (selecionada por apresentar a maior taxa de germinação) e outras 3 receberam 1,5 g de substrato sem fungo (controle). Nesse caso, foram utilizados apenas grãos de aveia e arroz com o desenvolvimento de conídios. Os substratos foram fornecidos uma única vez e o carregamento e incorporação foi monitoradas após 1, 2, 3 e 24 horas.

3.7.3 Iscas peletizadas

Para estes ensaios, foram utilizadas seis colônias integrais sendo que para três delas foi fornecido 1,5 g de iscas contendo fungo e as outras três receberam apenas iscas (controle).

O carregamento e incorporação foram registrados durante 1, 2, 3 e 24 horas após o fornecimento das iscas. Foram atribuídos índices de 0 a 4 para estimativa do carregamento, incorporação e descarte das iscas, sendo o número zero indicativo de nenhuma atividade, “1” indicando carregamento e incorporação de até de 25%; “2” indicando carregamento e incorporação de até 50%, “3” para carregamento e icorporação de 75% e “4” indicando 100% de carregamento e incorporação. As colônias foram monitoradas diariamente, durante 7 dias. Uma amostra das iscas foi semeada em cinco placas com meio PDA (5 iscas/placa) e incubadas durante 4 dias a 25°C para verificar se ocorreria o desenvolvimento de *Escovopsis*.

3.8 Sub-colônias inoculadas com suspensão de conídios

Doze sub-colônias foram preparadas do mesmo modo descrito no item 5.3. Após a estabilização das sub-colônias foi adicionado diretamente sobre o jardim de fungo 1 mL de

uma suspensão ajustada a 10^6 conídios.mL⁻¹ das linhagens EAS, Esc II e Esc III (três sub-colônias para cada linhagem). O controle foi feito com 1 mL de água destilada esterilizada (para as três sub-colônias restantes) das sub-colônias. Todas foram mantidas em sala climatizada a 25°C e analisadas logo após o inóculo para verificar o comportamento das formigas e também durante as 48 horas subsequentes para analisar o efeito da adição de *Escovopsis* aos jardins de fungo (adaptado de ELIZONDO, 2014).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção de linhagens do fungo antagonista (*Escovopsis*)

As cinco linhagens (EAS; EAH; EAB; Esc II e Esc III) foram analisadas para determinar: (i) tempo necessário para a obtenção de uma quantidade considerável de conídios; e (ii) o tempo de incubação necessário para permitir verificar a formação e contagem de colônias a partir da suspensão padronizada (10^4 conídios.mL⁻¹) dos conídios. Verificamos que o tempo ideal de incubação para a contagem de colônias em placa foi de quatro dias, enquanto que foram necessários sete dias para a obtenção de conídios. Esses parâmetros foram aplicados em todos os ensaios subsequentes.

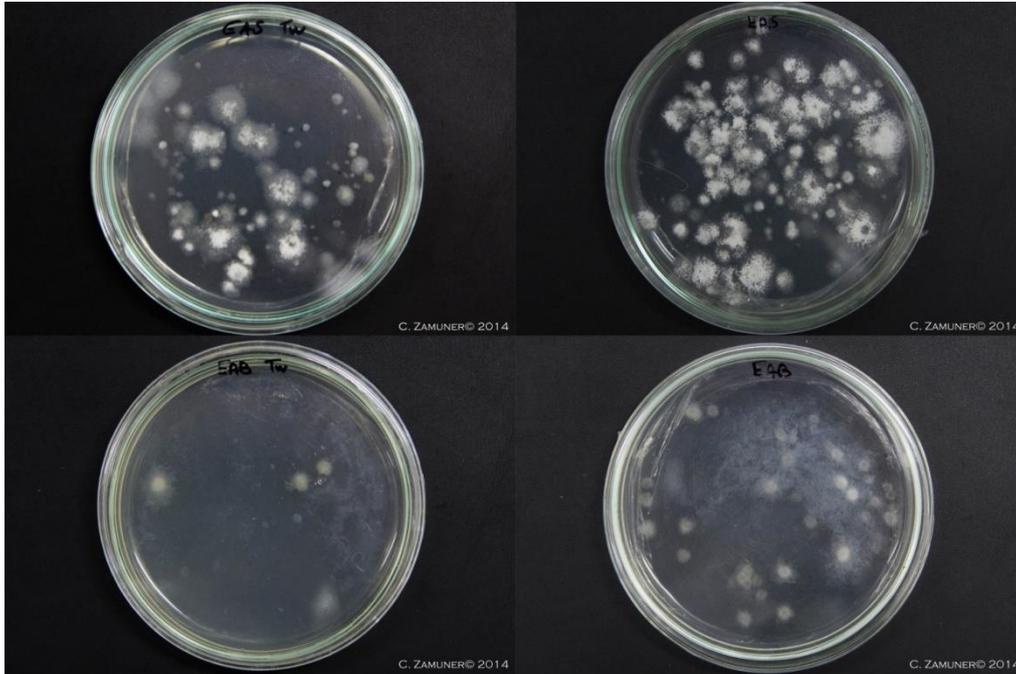
Tabela 1 –Viabilidade (%) de conídios em suspensão preparada em solução de NaCl 0,85% (v/v) na presença e ausência de Tween 80[®] (0,05% v/v) .

Linhagens	Viabilidade (%)	
	Tween 80 [®]	NaCl 0,85%
EAS	5,8	13,1
EAH	1,8	2,7
EAB	1,4	3,4
Esc II	16,5	27,1
Esc III	10,8	12,8

Fonte: Dados do trabalho.

As análises da Tabela 1 e da Figura 4 mostraram que, invariavelmente, a taxa de germinação dos conídios foi maior nas suspensões livres do agente tensoativo; isso ficou mais evidente no caso das linhagens EAS e Esc II.

Figura 4 - Linhagens EAS e EAB: a esquerda, placas inoculadas com suspensão de conídios em solução de NaCl 0,85% + Tween 80[®] (0,05%v/v) incubação: 4 dias; 25°C.; a direita as placas com suspensões preparadas apenas em solução de NaCl 0,85% - incubação: 4 dias; 25°C.



Fonte: Foto por Caio Zamunér

Após esta constatação, os testes de viabilidade seguiram sem o uso de Tween 80[®] na preparação dos conídios, atentando-se sempre para que houvesse uma boa homogeneização dos mesmos com o auxílio do vórtex.

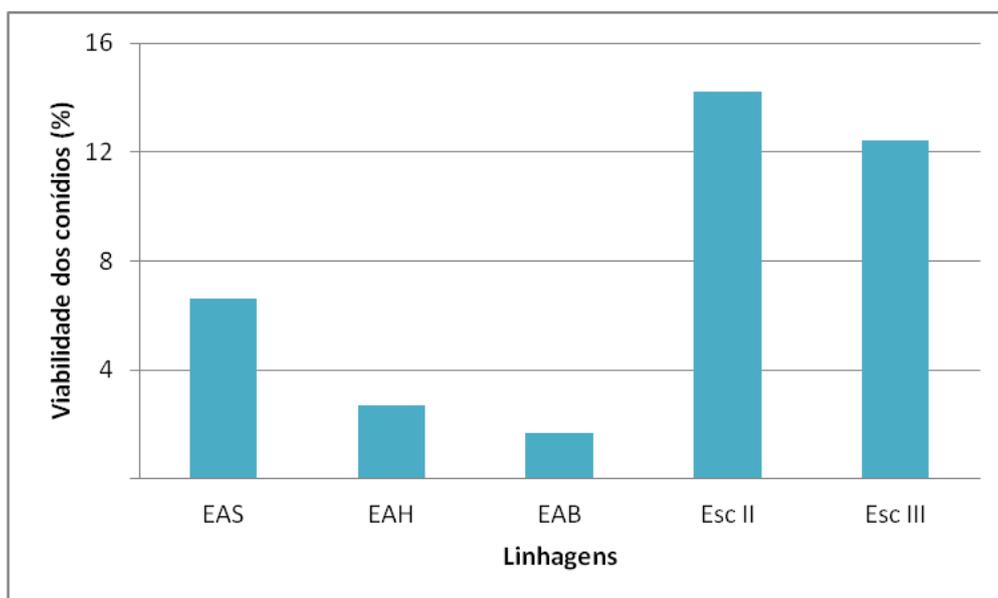
Comumente os testes de germinação para fungos descritos na literatura (JACCOUD et al., 1999; SANTOS et al., 2007; RODRIGUES et al., 2008) são realizados na presença do Tween 80[®] 0,05% v/v, porém nossos resultados mostram que seu uso deve ser evitado no caso do *Escovopsis* visto sua influência negativa na germinação, mesmo quando em baixa concentração.

Os ensaios realizados a partir desta etapa (sem agente tensoativo) revelaram que as estirpes EAS, Esc II e Esc III apresentaram a maior taxa de viabilidade dos conídios dentre as cinco testadas (Gráfico 1) e foram selecionadas para serem utilizadas para os ensaios subsequentes. Quando comparada a germinação dos conídios preparados em solução salina na primeira etapa (Tabela 1) com o mesmo tipo de preparo para os ensaios subsequentes (Gráfico 1), observamos uma diferença entre as taxas de germinação, fato que pode ser atribuído a um

maior número de repetições nos ensaios para a segunda etapa de testes, onde foi verificado, através de uma análise estatística, um desvio padrão elevado (dados não apresentados) entre os ensaios. A contagem dos conídios, realizada em Câmara de Neubauer, pode ter contribuído para o desvio elevado, já que muitos conídios ficavam aglutinados - tanto em solução salina após agitação, como na presença do agente tensoativo - o que dificultava a contagem precisa para o inóculo inicial.

Ainda assim, a variação observada na viabilidade dos conídios talvez seja uma característica de cada linhagem, fato que precisa ser melhor investigado, com um maior número de linhagens. Vários fatores podem estar envolvidos na germinação de conídios, tais como: composição do meio de cultivo, pH, temperatura e fotoperíodo (GRIFFIN, 1996). Nesse contexto, são necessários mais estudos para se conhecer melhor os fatores químicos e fisiológicos que podem influenciar a germinação dos conídios de *Escovopsis* já que ainda existem poucos trabalhos sobre o assunto. Currie et al. (1999a), Cafaro & Currie (2005), Little & Currie (2008) e Haeder et al. (2009), analisaram a virulência do fungo *Escovopsis* nos jardins das formigas cultivadoras de fungo e demonstraram a inibição do crescimento dele (*Escovopsis*) em sua interação com outros micro-organismos, porém não existem ensaios quanto a germinação dos conídios.

Gráfico 1 - Viabilidade dos conídios suspensos em solução de NaCl 0,85% após incubação quatro dias a 25°C. Suspensões de 10^4 conídios.mL⁻¹.



Fonte: Dados do trabalho

4.2 Crescimento massal do *Escovopsis* em grãos de arroz com sorgo

Inicialmente os protocolos A e B (adaptados da empresa Ballagro) foram testados para o crescimento massal das linhagens selecionadas e mostraram-se pouco eficientes, sendo que nenhuma delas apresentou elevado crescimento. Por conta disso, buscamos modificar alguns dos parâmetros, bem como testamos um substrato alternativo (flocos de aveia).

Nos protocolos C, D e E (com os grãos de sorgo hidratados por 3 horas) a variação na hidratação do arroz foi avaliada, buscando-se a melhor condição de umidade do meio para o crescimento das linhagens. Dentre os protocolos testados, o protocolo D (com o arroz hidratado por 2 horas) foi o que proporcionou o maior crescimento do fungo. Nesse substrato, as linhagens apresentaram uma grande produção de micélio e tempo de crescimento e maturação de conídios semelhante ao observado em placas com meio PDA (7 dias). No caso do protocolo C (com apenas 50 minutos de hidratação dos grãos de arroz) e do protocolo E (com um tempo de hidratação menor e utilizando água quente) o crescimento do fungo foi menor (não cresceu sobre todo o substrato) e mais lento. No protocolo E (com arroz hidratado com água quente), as embalagens apresentaram grande condensação de água, indicando alto teor de umidade no substrato.

Esses resultados mostraram que para o cultivo do *Escovopsis* os grãos de arroz devem ser mais hidratados à temperatura ambiente, diferentemente dos fungos *Metarhizium* e *Trichoderma*, os quais apresentam um grande desenvolvimento com o protocolo A (utilizado pela empresa Ballagro para o desenvolvimento massal desses fungos).

A partir desses resultados, selecionamos o protocolo D para ser utilizado no desenvolvimento das linhagens de *Escovopsis* nos grãos de arroz a serem fornecidos às formigas nos bioensaios.

4.3 Crescimento massal do *Escovopsis* em aveia

Frente às dificuldades iniciais encontradas no desenvolvimento do fungo com o protocolo utilizado pela empresa Ballagro para grãos de arroz, tentamos utilizar flocos de aveia para desenvolver *Escovopsis*. A aveia foi o substrato de escolha por ser utilizada para a alimentação das formigas nos ninhos mantidos no laboratório, sendo um substrato bem aceito por elas.

Os inóculos preparados em solução salina apresentaram um melhor desenvolvimento nos grãos de aveia do que aqueles preparados com ácido cítrico. Ainda, o tempo de maturação dos conídios foi semelhante ao observado nas placas com meio PDA e no arroz (preparado conforme o protocolo C), com 7-10 dias para o desenvolvimento completo.

Desse modo, os flocos de aveia mostraram ser um bom substrato para o desenvolvimento do *Escovopsis* e também foram selecionados para uso nos bioensaios. Nesse caso, apenas com o uso de inóculos preparados em solução salina.

4.4 Fornecimento dos substratos e iscas às formigas

No ensaios com sub-colônias utilizando os grãos de arroz com o desenvolvimento completo do *Escovopsis* verificamos o carregamento e incorporação completo do substrato controle após 24 h. Nas sub-colônias as quais foram fornecidos grãos de arroz com a linhagem EAS, todo o substrato foi levado para a câmara de descarte após 24 h. Com a linhagem Esc II, em duas das sub-colônias, não houve carregamento e em uma delas o destino do arroz também foi o descarte. No caso de Esc III, não houve carregamento em nenhuma das três sub-colônias.

Após esses resultados, testamos o fornecimento de grãos de aveia com conídios maduros – já que a aveia é um substrato bem aceito pelas formigas. Nesse caso, para as linhagens EAS e Esc III, nas 24 h seguintes, não foi observado carregamento em duas sub-colônias e em uma delas, todo substrato foi encontrado no descarte. Para a linhagem Esc II, não houve carregamento em uma sub-colônia e nas outras duas sub colonias os grãos de aveia contaminados foram encontrados no descarte. Os flocos utilizados como controle foram todos carregados e incorporados nos jardins de fungo após 24 h do fornecimento.

Em resumo, no fornecimento dos dois tipos de substrato, a rejeição das formigas foi semelhante (não havendo o carregamento ou então com o material sendo levado para a câmara de descarte). Em ambos os casos as formigas utilizavam suas antenas para tocar os grãos, demonstrando que elas detectaram a presença do fungo parasita e o rejeitaram. O mesmo comportamento foi descrito por Currie et al. (2001) onde as operárias tocavam suas antenas nos jardins de fungo pulverizados com uma suspensão de *Escovopsis*, identificando a presença dos conídios e retirando as partes do jardim infectadas.

O reconhecimento dos conídios nos substratos fornecidos provavelmente foi o fator que resultou no não carregamento dos grãos ou na sua destinação para o descarte, pois os

substratos controles (sem a presença do *Escovopsis*) foram carregados e incorporados normalmente.

Após esta constatação, uma nova alternativa foi utilizar grãos de aveia e arroz com *Escovopsis* na fase inicial de desenvolvimento, sem a presença de conídios maduros. Entretanto, os resultados observados foram semelhantes aos descritos, sendo que em todas as sub-colônias os grãos não foram carregados ou foram destinados ao descarte. O carregamento e incorporação dos substratos controles mantiveram-se normais.

Esses resultados podem indicar que as formigas são capazes de identificar a presença do patógeno ainda na fase de pré-esporulação, sendo a presença do micélio suficiente para a rejeição.

Nos ensaios realizados com as colônias integrais, o fornecimento do arroz ou aveia com conídios resultou em um rápido carregamento dos grãos para a câmara de descarte em todas as colônias (logo após a primeira hora de fornecimento). Isso pode ter ocorrido devido ao maior número de operárias presente nestes ninhos, resultando em uma rápida identificação do microfungo. Após os fornecimentos, os ninhos foram monitorados nos 20 dias subsequentes, com o retorno da alimentação normal para cada ninho entre os tratamentos, até a normalização do corte das folhas pelas formigas. Durante o período nenhum tipo de comportamento alterado ocorreu.

Através dessas análises, decidimos pela confecção de iscas peletizadas contendo polpa cítrica como um agente atrativo, esperando que a atratividade das iscas permitisse o carregamento e incorporação nos ninhos, mesmo com a presença dos conídios de *Escovopsis*. Quando fornecido às formigas, as iscas confeccionadas com a linhagem EAS em aveia, foi observado um carregamento e incorporação no jardim de fungos em todos os ninhos logo após as primeiras horas do fornecimento. Apesar do rápido carregamento e incorporação das iscas, não houve infecção visível por *Escovopsis* nos jardins de fungo e também não foi observado aumento do material descartado pela colônia. Entretanto, uma amostra dessas iscas foi semeada em placas de PDA e não foi observado desenvolvimento da linhagem EAS em nenhuma delas, mas ocorreu o desenvolvimento de outros micro-organismos.

A partir desses resultados, confeccionamos iscas contendo apenas a massa micelial e conídios da linhagem Esc II (que apresentou maior germinação) raspados de placas de PDA, na tentativa de obter uma grande proporção de fungo nas iscas. As iscas com Esc II foram então fornecidas aos ninhos e os resultados de carregamento, incorporação e devolução foram semelhantes aos observados anteriormente.

Mesmo com uma proporção de conídios muito maior nessas iscas, não houve o desenvolvimento do *Escovopsis* nos jardins de fungo. As iscas confeccionadas foram, simultaneamente, inoculadas em placas de PDA para verificar a germinação do *Escovopsis*. Mais uma vez, em nenhuma das placas foi possível identificar o crescimento da linhagem utilizada, mas ocorreu o desenvolvimento de outros fungos que tomaram a placa em menos de 72 horas de incubação. Em seu trabalho analisando a presença fúngica nas polpas cítricas, Carlos et al. (2009) identificou a presença de diferentes fungos filamentosos nas polpas que utilizou para a confecção das iscas, sugerindo que tais fungos foram adquiridos durante o processo de peletização. Essas observações podem indicar que: (i) o fungo *Escovopsis* pode não resistir ao processo de peletização das iscas; (ii) que a presença de outros fungos na polpa cítrica pode inibir o seu desenvolvimento ou ainda que (iii) uma proporção ainda maior de material fúngico seja necessária para iniciar a infecção dos ninhos. Todas essas hipóteses precisam ser verificadas.

4.5 Sub-colônias inoculadas com suspensão de conídios

O inóculo da suspensão de conídios nas sub-colônias não resultou na infecção dos ninhos com as linhagens testadas. Logo após o inóculo, as formigas começaram a tocar suas antenas sobre a superfície do jardim de fungo, retirando as partes que continham conídios e levando-as para a câmara de lixo como descrito por Currie et al. (2001) em seus experimentos com colônias pulverizadas com suspensões de conídios. O micélio infectado era retirado da matriz do fungo mutualista por operárias menores e, dependendo do tamanho do pedaço de jardim infectado, entregue às operárias médias e maiores para serem descartados. Numa das sub-colônias foi possível verificar o desenvolvimento do *Escovopsis* (linhagem EAS) junto ao material descartado, após 72 horas do início dos experimentos bem como a presença de muita umidade na câmara de descarte (Figura 5). Esta observação, ao menos aparentemente, confirma que a preparação das iscas pode ter interferido com o posterior desenvolvimento dos fungos, fato que deve ser levado em consideração em etapas futuras, ou seja, novos métodos de apresentação do parasita às formigas devem ser buscados para evitar que elas o reconheçam prematuramente e também para evitar perda da viabilidade.

Figura 5 – Câmara contendo partes do jardim de fungo contaminado com *Escovopsis* - seta verde indica a linhagem EAS crescendo no material de descarte.



Fonte: Foto por Caio Zamunér

Enquanto estávamos desenvolvendo esses ensaios, uma publicação de autoria de Elizondo et al. (2014) demonstrou que há diferenças no grau de virulência de diferentes linhagens de *Escovopsis*. Segundo esses autores ocorreu infecção das sub-colônias com 7 das 10 linhagens testadas, porém as sub-colônias continham apenas operárias pequenas e 50 operárias médias. O inóculo realizado no trabalho de Elizondo et al. (2014) também foi de 10^6 conídios.mL⁻¹, sendo 20 µL da suspensão espalhados pelo jardim de fungo até atingir 1 mL de inóculo. Assim, a não ocorrência da infecção dos jardins de fungos pelas linhagens EAS, Esc II e Esc III pode significar que essas linhagens sejam menos virulentas ou pode ter ocorrido devido ao maior número e variedade de castas de formigas presentes, permitindo que os comportamentos de proteção aos ninhos fossem mais eficientes e suficientes para evitar o início da infecção. Outra possibilidade é a de que a virulência das linhagens não esteja relacionada com a taxa de germinação de conídios, uma vez que as linhagens testadas, ou seja, as que apresentaram as maiores taxas de germinação, não foram capazes de provocar infecção nos jardins de fungo. Esta é mais uma hipótese a ser testada.

5 CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que os métodos de proteção utilizados pelas formigas cortadeiras para defender sua fungicultura são muito eficazes, mesmo frente a um gênero de fungo que se especializou em infectar esses ninhos. A utilização de substratos, como aveia e arroz contendo o fungo, mostrou-se ineficaz como veículo para deflagrar a infecção dos ninhos.

Será preciso pesquisar mais sobre a maneira pela qual o fungo parasita deve ser introduzido nos ninhos, pois a incorporação em iscas peletizadas aparentemente inviabilizou a germinação posterior dos conídios. Nesse contexto, estudos quanto a proporção de conídios no preparo das iscas e resistência dos mesmos ao processo de peletização devem ser realizados.

Ainda, a seleção de linhagens mais virulentas independente da taxa de germinação dos conídios, deve ser buscada.

Nossos resultados não permitiram associar virulência com a taxa de germinação dos conídios – um número maior de linhagens precisa ser testada, pois pode ocorrer de não haver relação entre a taxa de germinação dos conídios e grau de virulência.

A linhagem EAS, não tendo apresentado a maior taxa de germinação, foi a única capaz de se desenvolver nos ninhos, ainda que sobre o micélio descartado do fungo mutualista, vindo a ser interessante para estudos futuros no desenvolvimento do biocontrole.

Vale ressaltar que o complexo comportamento desses insetos sociais continua sendo um grande desafio a ser superado para seu controle e a busca por métodos alternativos ao controle químico é essencial frente aos perigos oferecidos por ele.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, S. E. **Produccion artesanal de Trichoderma**. 1^aed. San Salvador de Jujuy: Universidade Nacional de Jujuy, Faculdade de Ciências Agrárias. 48p. 2013.
- ATTILI-ANGELIS, D.; DUARTE, A. P. M.; PAGNOCCA, F. C.; NAGAMOTO, N. S.; de VRIES, M.; STIELOW, J. B.; de HOOG, G. S. Novel *Phialophora* species from leaf-cutting ants (tribe Attini). **Fungal Diversity**, n. 65 p. 65–75, 2014.
- AUGUSTIN, J. O.; GROENEWALD, J. Z.; NASCIMENTO, R. J.; MIZUBUTI, E. S. G.; BARRETO, R. W.; ELLIOT, S. L.; EVANS, H. C. Yet more “weeds” in the garden: fungal novelties from nests of leaf-cutting ants. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1-17, 2013.
- BASS, M.; CHERRETT, J. M. The role of leaf-cutting ant workers (Hymenoptera: Formicidae) in fungus garden maintenance. **Ecological Entomology**, Oxford, v. 19, n. 3, p. 215-220, 1994.
- BARKE, J.; SEIPKE, R. S.; GRÜSCHOW, S.; HEAVENS, D.; DROU, N.; BIBB, M. J.; GOSS, R. J. M.; YU, D. W.; HUTCHINGS, M. I. A mixed community of actinomycetes produce multiple antibiotics from the fungus farming ants *Acromyrmex octospinosus*. **BMC Biology**, v. 8, p. 109, 2010.
- BOT, A. N. M.; CURRIE, C. R.; HART, A. G., BOOMSMA, J. J. Waste management in leaf-cutting ants. **Ethology Ecology and Evolution**. v. 13, p. 225-237, 2001.
- BRANDÃO, C. R. F.; MAYHÉ-NUNES, A. J. . A new genus of fungus-growing ant genus, *Mycetagroicus* gen. n., with the description of three new species and comments on the monophyly of the Attini (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, California, EUA, v. 38, n. 3B, p. 639-665, 2001.
- BRANDÃO, C. R. F.; MAYHÉ-NUNES, A. J.; SANHUDO, C. E. D. Taxonomia e Filogenia das Formigas-Cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. **Formigas Cortadeiras - da Biologia ao Manejo**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2011, p. 27-48.
- CAFARO, M. J.; CURRIE, C. R. Phylogenetic analysis of mutualistic filamentous bacteria associated with fungus-growing ants. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 51, n. 6, p. 441-446, 2005.
- CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI, M; LACHANCE, M. A.; BUENO, O.C.; HEBLING, M. J. A.; RUIVO, C. C. C.; ROSA, C. A. *Sympodiomyces attinorum* sp. nov., a yeast species associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, n. 54, n. 5, p. 1891-1894, sep. 2004.
- CARLOS, A. A. Influência da polpa cítrica, do óleo e de fungo filamentosos na atratividade de iscas tóxicas à *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera, Formicidae). 2008. 82 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu. 2009.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi in distilled water. Further Researches. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 42 p. 181-184, 1967.

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

CHARNLEY, A. K. Entomopathogenic fungi and their role in pest control. In: WICKLOW, D. T.; SÖDERSTRÖM, M., editors. **The mycota IV – environmental and microbial relationships**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag: 1997, p. 185-201.

CHERRETT, J. M. History of the leaf-cutting ant problems. In: LOFGREN, C.S.; VANDER MEER, R. K. editors. **Fire ants and leaf-cutting ants: biology and management**. Boulder: West View Press, 1986. p. 10-17.

CHERRETT, J. M.; PEREGRINE, D. J. A review of the status of leaf-cutting ants and their control. **Annals of Applied Biology**, v. 84 p. 124-128, 1976.

CRAVEN, S. E.; DIX, M. W.; MICHAELS, G. E. Attine fungus gardens contains yeasts. **Science**, Washington, v. 169, n. 3941, p. 184-186, 1970.

CURRIE, C. R. Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. **Oecologia**, Berlin, v. 128, n. 1, p. 99-106, 2001.

CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **PNAS of the United States of America**. v. 96, n. 14, p. 7998-8002, 1999a.

CURRIE, C. R.; SCOTT, J. A. ; SUMMERBELL, R. C.; MALLOCH, D. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, London, v. 398, n. 6729, p. 701-704, 1999b

CURRIE, C. R.; STUART, A. E., Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. **Proceedings Biological sciences / The Royal Society**, v. 268, n. 1471, p. 1033-1039, 2001.

CURRIE, C. R.; WONG, B.; STUART, A. E.; SCHULTZ, T. R.; REHNER, S. A.; MUELLER, U. G.; SUNG, G.; SPATAFORA, J. W.; STRAUS, N. A. Ancient tripartite coevolution in the attine ant-microbe symbiosis. **Science**, 299:386-388. 2003.

DELLA LUCIA, T. M. C., **Atta bisphaerica: uma ilustre desconhecida**. Naturalia, São Paulo, v. 24, p. 53-59, 1999. Número especial.

DEBACH, P. **Biological control by natural enemies**. London: Cambridge University Press; 1974, 323p.

DINIZ, E. A.; BUENO, O. C. Substrate preparation behaviors for the cultivation of the symbiotic fungus in leaf-cutting ants of the genus *Atta* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, California, v. 53, n. 3, p. 651-666, 2009.

ELIZONDO, D. W. E.; ASENSIO, J. G. V.; TOMÁS, A. P. Correlation between virulence and genetic structure of *Escovopsis* strains from leaf cutting ant colonies in Costa Rica. **Microbiology**. n. 160, p. 1727- 1736, 2014.

FOLGARAIT, P.; GOROSITO, N.; POULSEN, M.; CURRIE, C. R. Preliminary in vitro insights into the use of natural fungal pathogens of leaf-cutting ants as biocontrol agents. **Current Microbiology**. n. 63, p. 250-258, 2011.

FOWLER, H. G.; BERNARDI, J. V. E.; DELABIE, J. C.; FORTI, L. C.; PEREIRA SILVA, V.. In: VANDER MEER, R. K.; JAFFE, K.; CEDENO, A. (eds) Major ant problems of South America, p.3-14. **Applied Myrmecology: A World Perspective**. Oxford, Westview Press, 1990, 741 p.

GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology**. 2 ed. New Jersey, John Wiley & Sons, 472 p. 1996.

HAEDER, S.; WIRTH, R.; HERZ, H.; SPITELLER, D. Candicidin-producing *Streptomyces* support leaf-cutting ants to protect their fungus garden against the pathogenic fungus *Escovopsis*. **PNAS of the United States of America**, v. 106, n. 12, p. 4742-4746, 2009.

HERNÁNDEZ, J. V.; JAFFÉ, K. Dano econômico causado por populações de formigas *Atta laevigata* (F. Smith) em plantações de *Pinus caribaea* Mor. e elementos para o manejo da praga. **An. Soc. Entomol. Brasil**, v. 24, n. 2, p. 287 – 298, 1995.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants**. Cambridge: Harvard University Press, 1990. 732p.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The leafcutter ants: civilization by instinct**. Norton & Company, New York, NY, 2010. 160p.

JACCOUD, D. B.; HUGHES, W. O. H.; JACKSON, C. W. The epizootiology of a *Metarhizium* infection in mini-nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 93, n. 1, p. 51-61, 1999.

KLINGENBERG, C.; BRANDÃO, R. F. Revision of the fungus-growing ant genera *Mycetophylax* Emery and *Paramycetophylax* Kusnezov rev. stat., and description of *Kalathomyrmex* n. gen. (Formicidae: Myrmicinae: Attini). **Zootaxa**, New Zealand, v. 2052, p. 1-31, 2009.

LITTLE, A. E. F.; CURRIE, C. R. Black yeast symbionts compromise the efficiency of antibiotic defenses in fungus-growing ants. **Ecology**, Washington, v. 89, n. 5, p. 1216-1222, 2008.

LITTLE, A. E. F.; CURRIE, C. R. Symbiotic complexity: discovery of a fifth symbiont in the attine-microbe symbiosis. **Biology Letters**, London, v. 3, n. 5, p. 501-504, 2007.

- LOFGREN, C. S. The search for chemical bait toxicants. In: LOFGREN, C. S.; VANDER MEER, R. K., editors. **Fire ants and leaf-cutting ants: biology and management**. Colorado, USA: Westview Press; 1986, p. 369-377.
- MALIUSIONIS, V. E.; CABELLO, M. N.; SEIFERT, K. A.; RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F. C. *Escovopsis trichodermoides* sp. nov., isolated from a nest of the lower attine ant *Mycocepurus goeldii*. **Antonie van Leeuwenhoek**. p. 1-2, 2015.
- MARTIN, M. M. The evolution of insect-fungus associations from contact to stable symbiosis. **American Zoology**, v. 32, p. 593-605, 1992.
- MAYHÉ-NUNES, A. J.; JAFFÉ, K. On the biogeography of Attini (Hymenoptera: Formicidae). **Ecotropicos**, Venezuela, v.11, p.45–54, 1998.
- MEHDIABADI, N. J.; SCHULTZ, T. R. Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini). **Myrmecology News**, n. 13, p. 37-55, 2009.
- MEIRELLES, L. A.; MONTOYA, Q. V.; SOLOMON, S. E.; RODRIGUES, A. New light on the systematics of fungi associated with Attine ant gardens and the description of *Escovopsis kreiselii* sp. nov. **PLoS One**. v. 10, n. 1, p. 1-14, 2015.
- MIKHEYEV, A. S. et al. Cryptic sex and many-to-one coevolution in the fungus-growing ant symbiosis. **PNAS of the United States of America**, v. 103, n. 28, p. 10702–10706, 2006.
- MÖLLER, A. Die Pilzgärten einiger Südamerikanischer Ameisen. **Botanische Mitteilungen aus den Tropen**, v. 6, p. 1-127, 1893.
- MUCHOVEJ, J. J.; DELLA LUCIA, T. M. C. *Escovopsis*, a new genus from leaf-cutting ant nests to replace *Phialocladus* nomem invalidum. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 37, n. 1, p. 191-195, 1990.
- MUELLER, U. G.; REHNER, S. A.; SCHULTZ, T. R. The evolution of agriculture in ants. **Science**, Washington, v. 281, n. 5385, p. 2034-2038, 1998.
- MULLER, U. G.; SCHULTZ, T. R.; CURRIE, C. R.; ADAMS, R. M. M.; MALOCH, D. The origin of the attine ant-fungus mutualism. **Q. Rev. Biol.** n. 76, p. 169-197, 2001.
- PAGNOCCA, F. C.; MASIULIONIS, V. E.; RODRIGUES, A. Specialized fungal parasites and opportunistic fungi in gardens of attine ants. **Psyche**, Stuttgart, v. 2012.
- PAGNOCCA, F. C.; RODRIGUES, A.; NAGAMOTO, N. S.; BACCI JR, M. Yeasts and filamentous fungi carried by gynes of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 94, n. 4, p. 517-526, 2008.
- PINTO-TOMÁS, A. A. et al. Symbiotic nitrogen fixation in the fungus gardens of leaf-cutter ants. **Science**, n. 326, p. 1120–1123, 2009.

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

REYNOLDS, T. H.; CURRIE, C. R. Pathogenicity of *Escovopsis weberi*: The parasite of the attine ant-microbe symbiosis directly consumes the ant-cultivated fungus. **Mycologia**, v. 96, n. 5, p. 955-959, 2004.

REZENDE, J. M. Influência da qualidade de diferentes tipos de arroz e inibidores de proteínases no rendimento e na virulência de conídios do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (Mestch.) Sorokin (Ascomycota: Hypocreales). 2009. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. 2009.

RODRIGUES, A.; CARLETTI, C. D.; BUENO, O. C., PAGNOCCA, F. C. Leaf-cutting ant faecal fluid and mandibular gland secretion: effects on microfungi spore germination. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 64-67, 2008.

RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI, M.; HEBLING, M. J.A.; BUENO, O. C.; PENNING, L. H. Variability of non-mutualistic fungi associated with *Atta sexdens rubropilosa* nests. **Folia Microbiologica**, Prague, v. 50, n. 5, p. 421-425, 2005.

SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G., Major evolutionary transitions in ant agriculture. **PNAS of the United States of America**, v. 105, n. 14, p. 5435-40, 2008.

SCHULTZ, T. R.; MEIER, R. A Phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. **Systematic Entomology**, Oxford, v.20, n.4, p. 337-370, 1995.

SEIFERT, K. A.; SAMNISON, R. A.; CHAPELA, I. H. *Escovopsis aspergilloides*, a rediscovered hyphomycete from leaf-cutting ant nests. **Mycologia**, New York, v. 87, n. 3, p. 407-413, 1995.

SANTOS, A. V.; OLIVEIRA, B. L.; SAMUELS, R. I. Selection of entomopathogenic fungi for use in combination with sub-lethal doses of imidacloprid: perspectives for the control of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). **Mycopathologia**, New York, v. 163, p. 233 – 240, 2007.

SILVA-PINHATI, A. C.; BACCI, M.; HINKLE, G.; SOGIN, M. L.; PAGNOCCA, F. C.; MARTINS, V. G.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. Low variation in ribosomal DNA and internal transcribed spacers of the symbiotic fungi of leaf-cutting ants (Attini: Formicidae). **Brazil J. Med. Biol. Res.** n. 37, p. 1463-1472, 2004.

SINGER, R. **The Agaricales in modern taxonomy**. 4 ed., Koeltz Scientific Books, Koenigstein, Alemanha. 1986, 981 p.

SOSA-CALVO, J.; SCHULTZ, T. R.; BRANDÃO, C. R. F.; KLINGENBERG, C.; FEITOSA, R. M.; RABELING, C.; BACCI Jr., M.; LOPES, C. T.; VASCONCELOS, H. L. *Cyatta abscondita*: Taxonomy, Evolution and Natural history of a new fungus-farming ant genus from Brazil. **PLoS One**. v. 8, n. 11, p. 1-20, 2013.

WEBER, N. A., **Gardening Ants: The Attines**. Philadelphia: American Philosophical Society. 146 p. 1972.

WETTERER, J. K. et al. Phylogeny of fungus-growing ants (Tribe Attini) based on mtDNA sequence and morphology. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 9, n. 1, p. 42-7, 1998.

WHEELER, E. O. The fungus-growing ants of North America. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, New York, v. 23, p. 669- 807, 1907.

Aluno: Caio Felipe Cavicchia Zamunér

Orientador: Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca

Coorientador: Prof. Dr. Odair Correa Bueno