



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE RIO CLARO



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

KARINA BUENO DE OLIVEIRA

METABÓLITOS DO FUNGO MUTUALISTA DAS FORMIGAS ATÍNEAS COMO
MEDIADORES DA INTERAÇÃO COM O PARASITA *ESCOVOPSIS*

Rio Claro – SP
Fevereiro – 2020

KARINA BUENO DE OLIVEIRA

**METABÓLITOS DO FUNGO MUTUALISTA DAS FORMIGAS ATÍNEAS COMO
MEDIADORES DA INTERAÇÃO COM O PARASITA *ESCOVOPSIS***

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências do Câmpus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia
Aplicada).

Orientador: Prof. Dr. André Rodrigues

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira

Rio Claro – SP
Fevereiro – 2020

O48m

Oliveira, Karina Bueno de

Metabólitos do fungo mutualista das formigas atíneas como mediadores da interação com o parasita Escovopsis / Karina Bueno de Oliveira. -- Rio Claro, 2020

66 f. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientador: André Rodrigues

Coorientador: Paulo Cezar Vieira

1. Microbiologia. 2. Crescimento. 3. Escovopsis. 4. Metabólitos. 5. Crescimento microbiano. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: METABÓLITOS DO FUNGO MUTUALISTA DAS FORMIGAS ATÍNEAS
COMO MEDIADORES DA INTERAÇÃO COM O PARASITA *ESCOVOPSIS*

AUTORA: KARINA BUENO DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: ANDRÉ RODRIGUES

COORIENTADOR: PAULO CÉZAR VIEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA), área: Microbiologia Aplicada pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. ANDRÉ RODRIGUES
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro

Prof. Dr. FERNANDO CARLOS PAGNOCCA
CEIS / IB Rio Claro



Profa. Dra. CAMILA RAQUEL PALUDO
ICBS - Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde / Universidade Federal de Mato Grosso, Câmpus
Universitário do Araguaia

Rio Claro, 28 de fevereiro de 2020

“A ciência nunca resolve um problema sem criar, pelo menos, outros dez.”

George Bernard Shaw

Dedico este trabalho aos meus pais, que me deram a vida, e ao meu noivo, que dela comigo compartilha.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de, em sua imensa grandeza, permitir-me desvendar parte dos mistérios que envolvem Suas obras. Traduzir em palavras as maravilhas de Sua natureza é um desafio o qual não poderia aceitar se não fosse por Ti capacitada.

Agradeço aos meus pais que, mesmo em meio às tantas dificuldades nessa vida, e na simplicidade de seus conhecimentos, me ajudaram a concluir este trabalho.

Aos meus irmãos (Eric, Jô e Samuca), muito obrigada pelo amor. Vocês são parte do melhor que há em mim! Ao Eric, um agradecimento especial por sempre me socorrer com meu computador que, nos momentos de maior necessidade, simplesmente deixou de funcionar e você o consertou!

Ao meu noivo, Victor, agradeço imensamente o amor e a paciência dedicados neste período em que fui mestranda. Sua compreensão e tempo investido em mim foram determinantes na conclusão deste trabalho. Em você me apoio e no seu sorriso, ganho forças...

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Rodrigues, agradeço por ter me dado a oportunidade de trabalhar em seu laboratório desde 2013. Mesmo diante de minha inexperiência com relação a ciência e os assuntos que a compreendem, foi paciente. Dedicou boa parte do seu escasso tempo para me auxiliar na compreensão do meu trabalho e na escrita desse. Foi também um exemplo para mim em sala de aula durante o estágio docência. Um verdadeiro mestre, ao qual eu certamente irei me recordar e, quem sabe algum dia, possa espelhar.

Agradeço também ao meu coorientador, Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira, por todo o suporte fornecido para a realização deste estudo. Sem ele, certamente não haveríamos avançado as fronteiras do conhecimento nas áreas de abrangência deste trabalho, como o fizemos.

Nesse contexto, aproveito para agradecer ao Airton. Eu seria incapaz de mensurar as horas e o imenso trabalho que você dedicou a este trabalho. Apenas os nossos resultados talvez possam sugerir, dado o sucesso que obtivemos, tamanha a sua dedicação!

Carinhosamente, agradeço meus amigos do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF), tanto aqueles presentes, como aqueles que já deixaram o laboratório. Foi neles que me apoiei sempre que precisei enquanto dividíamos o mesmo espaço de trabalho. Com vocês, ri muito, chorei e aprendi. Aprendi sobre ciência e sobre a vida. Morgana, Tati, Rodolphinho, Enzo, Aryel, Quimi e Maria (os atuais). De cada um de vocês, eu poderia citar uma particularidade. No entanto, o que torna o ambiente do LESF tão especial não são essas particularidades. Mas sim, o todo de si que cada um doa diariamente ao trabalho que

desempenha e ao próximo para que o ambiente funcione perfeitamente bem. Isso fez toda diferença em minha vida e na conclusão deste trabalho.

Aos amigos de “fora” do LESF (Raíssa, Luciana e Mirella), agradeço imensamente o carinho que têm por mim. Com palavras e por vezes abraços, me ajudaram muito nessa caminhada. Me deram força quando precisei e, principalmente, esperança de que “tudo passa”. À Mirella, um agradecimento especial pela parceria em sala de aula e também fora dela, a qual resultou em uma grande amizade!

A Daiane do CEIS e ao Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca, deixo um agradecimento especial. Vocês que sempre me atenderam fornecendo, em boa parte do meu projeto, material e equipamentos para que eu pudesse trabalhar. Muito obrigada!

Agradeço também aos colegas (alunos, professores e técnicos) do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, pela amizade e os socorros prestados sempre que necessário. Agradeço principalmente à Prof^a Dr^a Daiane Cristina Sass e seus alunos que me atenderam todas as vezes em que precisei, seja de uma orientação relacionada a parte química de meus experimentos ou por liofilizarem os extratos orgânicos. Também agradeço ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada), por fornecer o apoio acadêmico necessário para concluir o mestrado.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de mestrado concedida (Processo nº 2018/12481-7). O presente estudo está vinculado ao Projeto Temático (Processo nº 2012/25299-6), coordenado pelo Prof. Dr. João Batista Fernandes (Departamento de Química, UFSCar – São Carlos). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

O jardim de fungo das formigas atíneas abriga uma microbiota diversa, que contempla interações microbianas mediadas por compostos químicos. Embora estudos investigaram os metabólitos produzidos pelos fungos cultivados (*Leucoagaricus* spp.) por esses insetos, nada se sabe a respeito dos compostos químicos que atuam na interação com *Escovopsis* sp., um fungo considerado parasita do parceiro fúngico das atíneas. Neste trabalho investigamos os metabólitos produzidos por três fungos mutualistas cultivados por diferentes formigas atíneas, para responder as seguintes perguntas: a) os metabólitos produzidos pelos fungos mutualistas medeiam a interação com *Escovopsis* sp.?; b) o dia de crescimento e a concentração dos metabólitos dos fungos mutualistas interferem na resposta de *Escovopsis* sp.?; c) compostos solúveis e voláteis estão envolvidos na interação? Para tanto, foram realizados bioensaios (i) com os filtrados dos três fungos mutualistas nas concentrações 1:1 e 1:10, obtidos em diferentes dias de cultivo; (ii) com a fração orgânica e subfrações desses filtrados frente a *Escovopsis* sp., (iii) de volatilidade entre os fungos mutualistas e *Escovopsis* sp.; além (iv) do estudo químico das frações e subfrações orgânicas. Como resultado, demonstramos que a interação *Escovopsis*-fungo mutualista é mediada por compostos químicos solúveis e voláteis, pois observamos uma maximização do crescimento micelial do parasita na presença tanto dos filtrados de cultivo dos fungos mutualistas, suas frações e subfrações, quanto nos experimentos de volatilidade. Além disso, identificamos duas substâncias da classe das dicetopiperazinas (subfrações $\Theta 3$ e $\Theta 5$) e o 5-hidroximetilfurfural. A dicetopiperazina da subfração $\Theta 5$ e o 5-hidroximetilfurfural atuam como sinalizadores envolvidos na interação *Escovopsis*-fungo mutualista, pois o parasita maximiza o crescimento na presença dessas substâncias. Tais compostos foram obtidos dos filtrados do 12º dia de crescimento de *Leucoagaricus* sp. AR04; no entanto, a resposta de crescimento maximizado do parasita independe das fases de crescimento do fungo mutualista, sendo tal fenômeno observado para os filtrados obtidos em todos os dias de cultivo desse micro-organismo. A antiga história evolutiva compartilhada entre esses dois fungos, talvez seja a responsável pela complexa interação química entre esses micro-organismos, especialmente à habilidade de reconhecimento de *Escovopsis* sp. para os compostos produzidos pelos fungos cultivados pelas formigas.

Palavras chave: Reconhecimento químico. Biossinalização. Interação química. Crescimento.

ABSTRACT

The fungus garden of attine ants harbors a diverse microbiota, whose members interact by chemical compounds. Although studies unraveled the metabolites produced by fungi cultivated (*Leucoagaricus* spp.) by these insects, little is known regarding the chemical compounds involved in the interaction with *Escovopsis* sp., a fungus known as a parasite of the ant fungal cultivars. Here, we investigated the metabolites produced by three mutualistic fungi cultivated by different attine ants to answer the following questions: a) Do the metabolites produced by the mutualistic fungi mediate the interaction with *Escovopsis* sp.?; b) Do the day of growth and the concentration of the metabolites interfere in the *Escovopsis* sp. response?; c) Are soluble and volatile compounds involved in this interaction? We addressed these questions by carrying out bioassays: (i) with culture filtrates of the three mutualistic fungi at two concentrations (1:1 and 1:10), obtained on different days of incubation; (ii) with the organic fraction and subfractions of these filtrates towards *Escovopsis* sp.; (iii) to determine volatile compounds are involved in the interaction; in addition to (iv) the chemical study of the organic fractions and subfractions. We demonstrated that the interaction between *Escovopsis* sp. and the mutualistic fungi of attine ants is mediated by soluble and volatile compounds, since we observed a maximization of the parasite's growth in the presence of both the mutualistic fungal culture filtrates, their fractions and subfractions, as well as in the volatility experiments. Also, we identified two substances from the class of diketopiperazines and the 5-hydroxymethylfurfural (subfractions 63 e 65). The diketopiperazine 65 and the 5-hydroxymethylfurfural act as signaling agents involved in the interaction *Escovopsis* sp. and the mutualistic fungus, because the parasite maximizes its growth in the presence of these substances. Such compounds were obtained from culture filtrates of the 12th day of growth of *Leucoagaricus* sp. AR04. However, the maximized growth response of the parasite did not depend on the growth phases of mutualistic fungi, because this response was observed in culture filtrates obtained on all days of cultivation of the mutualistic fungi. The ancient evolutionary history shared between these two fungi is likely responsible for the complexity of this chemical interaction, especially the ability of *Escovopsis* sp. to recognize the compounds produced by the ant fungal cultivars.

Keywords: Chemical recognition. Biosignaling. Chemical interaction. Growth.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Fungos mutualistas e <i>Escovopsis</i> sp.	14
3.2 Bioensaios de incorporação dos filtrados no meio de cultivo	14
3.3 Validação dos bioensaios de incorporação dos filtrados no meio de cultivo.....	16
3.4 Bioensaios de tempo e concentração dos filtrados dos fungos mutualistas em relação a <i>Escovopsis</i> sp. LESF 315.....	16
3.5 Determinação da atividade da fração orgânica dos filtrados	17
3.6 Ensaios para determinação da influência dos <i>Volatile Organic Compounds</i> (VOCs).....	19
3.7 Perfil químico do extrato bruto dos filtrados	20
3.8 Cultivo em escala ampliada para obtenção do extrato bruto do filtrado de <i>Leucoagaricus</i> sp. AR04	21
3.9 Obtenção das subfrações dos filtrados de <i>Leucoagaricus</i> sp. AR04	22
3.10 Ensaios biológicos com as subfrações	22
3.11 Fracionamento das subfrações B e C	23
3.12 Ensaios biológicos com as subfrações $\delta 5$ e $\delta 7$	23
4 RESULTADOS	25
4.1 Bioensaios de incorporação dos filtrados no meio de cultivo.....	25
4.2 Validação dos bioensaios de incorporação dos filtrados no meio de cultivo.....	25
4.3 Efeito do tempo e concentração dos filtrados no crescimento de <i>Escovopsis</i> sp. LESF 315	27
4.4 Determinação da atividade biológica dos extratos brutos dos três fungos mutualistas	30
4.5 Ensaios de volatilidade	32
4.6 Análise do perfil químico dos extratos brutos dos filtrados	33
4.7 Cultivo em escala ampliada para obtenção dos extratos brutos do filtrado de <i>Leucoagaricus</i> sp. AR04	34
4.8 Obtenção das subfrações dos filtrados de <i>Leucoagaricus</i> sp. AR04	34
4.9 Ensaios biológicos das subfrações	35
4.10 Fracionamento da subfração B	37
4.11 Fracionamento da subfração C	39
4.12 Ensaios biológicos com as subfrações $\delta 5$ e $\delta 7$ (5-hidroximetilfurfural)	42
5 DISCUSSÃO	44
6 CONSIDERAÇÕES	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXO	52

1 INTRODUÇÃO

Interações entre micro-organismos envolvem compostos químicos. São com eles que micro-organismos de uma espécie podem afetar o crescimento, o vigor e as populações de outra espécie microbiana (WHITTAKER; FEENY, 1971). No caso dos fungos, as interações químicas são fundamentais para a ecologia desses micro-organismos. Há casos que fungos micoparasitas ramificam as hifas em uma reação quimiotrófica à presença do fungo hospedeiro (CHET; BAKER, 1981). É também sabido que micoparasitas podem selecionar seus hospedeiros a partir do reconhecimento de compostos químicos liberados pelos mesmos (CHET; BENHAMOU, 1998). O entendimento dessa linguagem química das interações entre fungos constitui um importante marco para pesquisa e desenvolvimento, especialmente, a procura de eventuais alvos para controle biológico.

Considerando ambientes complexos, o jardim de fungo das formigas da subtribo Attina (i.e. as atíneas) constitui um sistema bastante interessante para o estudo de interações químicas. O jardim de fungo é o local no qual as formigas atíneas cultivam fungos como alimento (SCHULTZ; BRADY, 2008; WEBER, 1972). Estima-se que o mutualismo formiga-fungo originou há 53,6–66,7 milhões de anos, quando as formigas atíneas desenvolveram sua própria versão de agricultura (no caso, fungicultura), sendo capazes de cultivar o próprio alimento (JEŠOVNIK; GONZÁLEZ; SCHULTZ, 2016; BRANSTETTER et al., 2017).

Os gêneros que compreendem a subtribo Attina são classicamente agrupados em “atíneas basais” e “atíneas derivadas”, sendo *Atta*, *Acromyrmex*, *Trachymyrmex* e *Sericomyrmex*, os gêneros pertencentes ao último grupo (MEHDIABADI; SCHULTZ, 2010; SCHULTZ; BRADY, 2008). Os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* são conhecidos popularmente como saúvas e quenquéns, respectivamente. Essas formigas incorporam ao jardim de fungo folhas e flores frescas, muitas vezes de espécies vegetais importantes economicamente. Por esse motivo, são também chamadas de formigas cortadeiras de folhas, sendo consideradas pragas e responsáveis por onerosas perdas agrícolas e florestais no Neotrópico (DELLA LUCIA; GANDRA, GUEDES, 2014).

Na subtribo Attina, é possível encontrar uma diversidade de fungiculturas, que variam desde a espécie de fungo que as formigas cultivam, o tipo de substrato que coletam para nutrição do fungo, até aspectos comportamentais das operárias (MEHDIABADI; SCHULTZ, 2010). A fungicultura praticada pelos gêneros *Trachymyrmex* e *Sericomyrmex* (não-cortadeiras de folhas) é considerada uma forma mais derivada da subtribo, pois o fungo cultivado provavelmente originou-se daqueles cultivados pelas atíneas basais (CHAPELA et al., 1994). Até o momento esse fungo é tratado como pertencente ao gênero *Leucoagaricus*

(Basidiomycota: Agaricales, MUELLER et al., 2017). As formigas cortadeiras de folhas cultivam majoritariamente a espécie, *Leucoagaricus gongylophorus*, a qual possivelmente derivou-se dos fungos cultivados por *Trachymyrmex* e *Sericomyrmex* (MUELLER et al., 2017).

Após adaptar-se ao sistema, o fungo mutualista das atíneas derivadas tornou-se incapaz de apresentar uma vida fora da simbiose com as formigas (SCHULTZ et al., 2005). Muller e colaboradores (2017) apontaram que esses fungos pertencem a dois clados filogenéticos (A e B). O clado A compreende um grupo geneticamente homogêneo de *L. gongylophorus*, cultivado pelas formigas *Atta sexdens*, *Atta laevigata* e algumas espécies do gênero *Trachymyrmex* (MUELLER et al., 2018). O clado B corresponde a um grupo mais diverso de fungos (*Leucoagaricus* spp.), subdividido em pelo menos seis subclados. São também cultivados por *A. laevigata*, mas predominantemente por *Trachymyrmex* sp. e *Sericomyrmex* sp. (MUELLER et al., 2018).

Além do fungo mutualista, o jardim de fungo das formigas atíneas também abriga uma rica microbiota, composta por fungos filamentosos, leveduras e bactérias (PAGNOCCA; MASIULIONIS; RODRIGUES, 2012). Dentre os fungos filamentosos aí presentes, destaca-se o gênero *Escovopsis* (Ascomycota: Hypocreales), considerado parasita do fungo cultivado pelas formigas (CURRIE et al., 1999a). Até o momento, esse fungo não foi encontrado fora do ambiente das atíneas, o que apoia a ideia que esse parasita seja específico da associação das formigas atíneas-fungo mutualista (CURRIE, 2001; CURRIE et al., 2003).

Diversas interações químicas entre micro-organismos ocorrem no jardim das atíneas. Um exemplo é a produção de antibióticos pelas bactérias do gênero *Pseudonocardia* (localizadas na cutícula das formigas e também no jardim), capaz de afetar negativamente o crescimento do parasita *Escovopsis* sp. (CURRIE et al., 1999b; SEN et al., 2009). Em contrapartida, quando confrontado com essas bactérias, o parasita produz compostos secundários de defesa denominados de shearinina (BOYA et al., 2017; HEINE et al., 2018). A shearinina D também é capaz de prejudicar as defesas comportamentais das operárias, sendo letal, se acumulada nos tecidos das formigas (HEINE et al., 2018). Além das shearininas, também foram identificados os compostos cicloartroposona e emodina, também produzidos pelo parasita frente a *L. gongylophorus* (DHODARY et al., 2018). Tais moléculas estão associadas às atividades inseticidas, tremorgênicas (STAUB et al., 1993) e são também antifúngicas frente ao fungo mutualista (DHODARY et al., 2018).

Embora medeiem as interações no jardim das atíneas, os compostos químicos também estão envolvidos no processo de degradação de substratos para a obtenção de nutrientes pelo

fungo mutualista. De Fine Licht e colaboradores (2010) identificaram nos fungos das atíneas basais um perfil enzimático semelhante ao de fungos sapróbios e que são capazes de degradarem celulose, hemicelulose, pectina e amido. O sequenciamento do genoma de *L. gongylophorus* revelou que esse fungo pode codificar cerca de 145 enzimas lignocelulolíticas, sendo muitas pectinases, xilanases e amilases (AYWARD et al., 2013).

Entre outros metabólitos produzidos pelos fungos mutualistas, estão também aqueles relacionados à própria defesa, como antimicrobianos (AYLWARD et al., 2012). Dois compostos, 7-cloro-4,6-dimetoxi-1(3H)-isobenzofuranona e basidalina, foram elucidados de *Leucoagaricus carneifolia* (um parente relacionado à *L. gongylophorus*). Ambos demonstraram bioatividade frente a várias espécies bacterianas e fúngicas *in vitro* (HUFF et al., 1994). Em épocas diferentes, Hervey e Nair (1979) e Angeli-Papa (1984) relataram ter descoberto moléculas com ação antibacteriana produzidas por fungos cultivados pelas atíneas basais e derivadas. Angeli-Papa (1984) não chegou à identificação das moléculas encontradas. Todavia, o antibiótico encontrado por Hervey e Nair (1979) foi denominado de Lepioclorina.

Apesar dos compostos citados, são poucos os estudos que avaliaram o potencial antifúngico dos fungos mutualistas (WANG; MUELLER; CLARDY, 1998) e o perfil metabólico. Em um estudo recente com a interação *Escovopsis*-fungo mutualista, Folgarait e colaboradores (2011) observaram uma maior esporulação e crescimento do parasita na presença do hospedeiro. Esse fenômeno foi observado em experimentos *in vitro*, ou seja, em placas de Petri contendo meio de cultivo. Segundo os autores, esses resultados indicam que *Escovopsis* sp. é capaz de detectar compostos solúveis produzidos pelo fungo mutualista, os quais modificam o crescimento do parasita. Todavia, não se sabe quais são os compostos envolvidos nessa interação. Nesse contexto, o presente trabalho realizou o estudo dos metabólitos produzidos pelos fungos mutualistas das atíneas derivadas. Buscamos responder as seguintes perguntas: a) os metabólitos produzidos pelos fungos mutualistas medeiam a interação com *Escovopsis* sp.?; b) o dia de crescimento e a concentração dos metabólitos dos mutualistas interferem na resposta de *Escovopsis* sp.?; c) compostos solúveis e voláteis estão envolvidos na interação?

Nossos resultados demonstraram que a interação parasita-fungo mutualista é complexa do ponto de vista químico, pois foi encontrada uma diversidade de metabólitos nos extratos brutos e subfrações dos filtrados. A obtenção de dois metabólitos das subfrações, os quais são bioativos frente ao parasita, confirmou o envolvimento dessas substâncias na resposta maximizada de crescimento de *Escovopsis* sp.

2 OBJETIVOS

- Descrever se a resposta de crescimento de *Escovopsis* sp. frente aos fungos mutualistas cultivados pelas formigas atíneas é mediada por metabólitos solúveis e voláteis.
- Descrever se o dia de crescimento e a concentração dos filtrados de cultivo dos fungos mutualistas interferem na resposta do parasita.
- Identificar os metabólitos produzidos pelo fungo mutualista e que são possivelmente responsáveis pela resposta de crescimento de *Escovopsis* sp.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Fungos mutualistas e *Escovopsis* sp.

No presente estudo foram utilizados três isolados de fungos mutualistas e seis isolados de *Escovopsis* sp., provenientes de jardins de fungo de diferentes espécies de formigas atíneas derivadas (Tabela 1). Os fungos estão depositados no acervo do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF), UNESP – Câmpus de Rio Claro, SP. Os fungos mutualistas utilizados pertencem a dois clados filogenéticos (Tabela 1) e estão preservados sob repique contínuo, a cada 21 dias, em meio de cultivo contendo: 10 g de glicose, 5 g de NaCl, 5 g de Bacto Peptona, 15 g de Bacto-ágar e 50 g de flocos de aveia para 1 L de água deionizada (PAGNOCCA et al., 1990; SILVA-PINHATI et al., 2005).

Os isolados de *Escovopsis* sp. (Tabela 1) estão mantidos em suspensão de conídios, em glicerol 10%, a -80 °C. Os seis isolados do parasita foram reativados em meio *Potato Dextrose Agar* (PDA, Neogen Culture Media, previamente esterilizado em autoclave a 121 °C e 1 atm, durante 15 minutos) e incubados a 25 °C, no escuro, durante sete dias. A pureza de todos os fungos foi avaliada após a reativação.

Tabela 1. Culturas axênicas de *Escovopsis* sp. e de fungos mutualistas utilizadas no presente estudo. Os fungos foram obtidos de formigas atíneas derivadas em estudos prévios e estão depositados no acervo do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF), UNESP – Câmpus de Rio Claro, SP.

Código	Clado ¹	Identificação	Formiga de origem	Cidade de coleta
LESF 037		<i>Escovopsis</i> sp. 1	<i>Atta cephalotes</i>	Parauapebas, SP
LESF 046		<i>Escovopsis</i> sp. 2	<i>Trachymyrmex tucumanus</i>	Rio Claro/SP
LESF 050		<i>Escovopsis</i> sp. 3	<i>Acromyrmex</i> sp.	Campo Novo/RO
LESF 055		<i>Escovopsis</i> sp. 4	<i>Acromyrmex</i> sp.	Camacan, BA
LESF 315		<i>Escovopsis</i> sp. 5	<i>Atta sexdens</i>	Botucatu/SP
LESF 324		<i>Escovopsis</i> sp. 6	<i>Atta laevigata</i>	Santa Bárbara, SP
AR04	B	<i>Leucoagaricus</i> sp.	<i>Atta laevigata</i>	Botucatu/SP
FF2006	A	<i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	<i>Atta sexdens</i>	Corumbataí/SP
IJ2016	B	<i>Leucoagaricus</i> sp.	<i>Trachymyrmex tucumanus</i>	Rio Claro/SP

¹ Segundo Mueller et al. (2017).

3.2 Bioensaios de incorporação dos filtrados no meio de cultivo

Este experimento teve por objetivo avaliar os efeitos dos filtrados dos fungos mutualistas no crescimento de *Escovopsis* sp. Para tanto, os fungos mutualistas foram semeados em meio PDA e incubados a 25 °C, durante 21 dias. Em seguida, quatro fragmentos de micélio (com 5 mm de diâmetro cada) foram retirados e inoculados em frascos Erlenmeyers, contendo 40 mL de *Potato Dextrose Broth* (PDB, Neogen Culture Media, previamente autoclavado nas mesmas condições que PDA), e incubados sob agitação (120 rpm), nas mesmas condições.

Após incubação, os cultivos foram filtrados em papel de filtro e o líquido obtido, filtrado novamente em membrana de acetato de celulose com 0,45 µm de porosidade.

As placas de Petri (90 x 15 mm) denominadas de “tratamento” receberam 10 mL do filtrado, o qual foi incorporado a 10 mL de meio PDA pela técnica de *pour plate*. O meio PDA foi acrescido com ágar bacteriológico na proporção 7,5 g para cada 500 mL de meio. Já as placas “controle” receberam 20 mL de PDA, também acrescido de 7,5 g de ágar bacteriológico para cada 500 mL de meio (sem o filtrado). Para cada grupo (tratamento e controle), foram preparadas cinco placas. Cada tratamento consistiu nas combinações dos filtrados dos três fungos mutualistas com os seis isolados de *Escovopsis* sp.

Suspensões de conídios foram preparadas a partir de culturas de *Escovopsis* sp. mantidas em meio PDA, a 25 °C, durante sete dias. Para tanto, a superfície da colônia foi raspada com o auxílio de uma agulha e os conídios foram suspensos em 10 mL de água deionizada esterilizada. A suspensão foi agitada durante dois minutos e filtrada segundo o método de Newmeyer (1990), para separar os conídios dos fragmentos de hifas presentes na suspensão. Após filtração, 200 µL da suspensão foram transferidos em placas de Petri contendo 20 mL de meio PDA e semeados em superfície, com o auxílio da alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 25 °C, no escuro, durante sete dias. Dessas placas, fragmentos de micélio com 5 mm de diâmetro foram retirados e dispostos próximo à borda da placa de cada tratamento (i. e. placas com o filtrado dos fungos mutualistas). Essas placas foram incubadas a 25 °C, no escuro, durante 14 dias.

O crescimento das colônias de *Escovopsis* sp. foi registrado diariamente com a digitalização das placas de Petri em *scanner* HP Deskjet F2050 (600 dpi de resolução). As áreas de crescimento micelial (em cm²) de *Escovopsis* sp. na presença e na ausência dos filtrados foram mensuradas no *software* ImageJ v. 1.6.0_24 (ABRAMOFF; MAGALHÃES; RAM, 2004). A fim de verificar se existem diferenças de crescimento entre os tratamentos, utilizamos a seguinte proporção: $P1 / A1$ (cm²), onde “P1” é a média das réplicas do crescimento micelial do parasita no primeiro dia de incubação na presença do filtrado; “A1” é a média do crescimento micelial do parasita no primeiro dia de incubação na ausência do filtrado. Tal proporção foi calculada para os 14 dias de crescimento de *Escovopsis* sp. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para comparar o crescimento de *Escovopsis* sp. na ausência e na presença dos filtrados. As análises foram realizadas no *software* R v3.5.2 (R for Windows GUI front-end, 2019).

3.3 Validação dos bioensaios de incorporação dos filtrados no meio de cultivo

Após a realização dos bioensaios de incorporação dos filtrados no meio de cultivo, os micro-organismos ficaram armazenados na coleção durante oito meses antes da continuidade do estudo. Dado esse período em que *Escovopsis* sp. e os fungos mutualistas estiveram armazenados, foi necessário verificar a reprodutibilidade dos resultados obtidos, ou seja, se os fungos mutualistas ainda produziam compostos que estimulam o crescimento do parasita. Portanto, a partir dos resultados obtidos nos bioensaios de incorporação dos filtrados no meio de cultivo (item 3.2), selecionamos três isolados de *Escovopsis* sp. para a validação, a saber: LESF 046, LESF 050 e LESF 315. Os bioensaios de validação foram realizados e avaliados conforme descrito no item 3.2.

3.4 Bioensaios de tempo e concentração dos filtrados dos fungos mutualistas em relação a *Escovopsis* sp. LESF 315

O objetivo desses bioensaios foi avaliar se o tempo (dia) de crescimento dos três fungos mutualistas e a concentração dos filtrados poderiam afetar o crescimento micelial de *Escovopsis* sp. Devido o volume de filtrado requerido para esses experimentos, dos três isolados avaliados nos bioensaios de validação, somente *Escovopsis* sp. LESF 315 foi utilizado.

A partir de placas de Petri contendo meio de cultivo com aveia (descrito no item 3.1), os fungos mutualistas foram semeados em meio PDA e incubados a 25 °C, durante 21 dias. Em seguida, o micélio foi raspado com agulha de inoculação e 10,5 mg pesados em balança analítica. Tal biomassa foi inoculada em Erlenmeyers de 125 mL contendo 40 mL de PDB e incubados a 25 °C, no escuro, durante 27 dias, sob agitação (120 rpm). A cada três dias, três Erlenmeyers foram retirados da incubadora e os cultivos foram então filtrados, conforme descrito no item 3.2.

Os filtrados assim produzidos foram avaliados conforme o item 3.2. Para cada filtrado obtido foram preparadas placas “tratamento” em duas concentrações, a saber: 1:1 (sendo 10 mL de filtrado e 10 mL de meio PDA acrescido de ágar bacteriológico na concentração 7,5 g para cada 500 mL de meio e 1:10 (1 mL de filtrado em 10 mL de meio PDA também acrescido de ágar na mesma proporção). Foram preparadas cinco placas para cada concentração. O mesmo número de placas também foi empregado para cada grupo controle, que seguiu o mesmo padrão de volume final dos tratamentos, a saber: 20 mL e 11 mL de meio PDA acrescido da mesma proporção de ágar utilizada nas placas “tratamento”. O isolado *Escovopsis* sp. LESF 315 foi semeado nessas placas conforme descrito no item 3.2. Todas as placas foram incubadas a 25

°C, no escuro, durante sete dias. A área de crescimento das colônias do parasita na presença e na ausência dos filtrados foi registrada, mensurada e analisada como descrito no item 3.2.

Com o objetivo de determinar com mais clareza se existe uma correlação entre a resposta de *Escovopsis* sp. LESF 315 na presença dos filtrados obtidos em diferentes dias de cultivo dos fungos mutualistas, foi gerada uma curva de crescimento de cada fungo mutualista. Para tanto, de cada Erlenmeyers filtrado em seus respectivos dias, obtivemos um valor de biomassa seca (a 100 °C). As curvas foram construídas a partir da média de seis pontos, ou seja, além dos três Erlenmeyers retirados a cada três dias para a filtração, outros três Erlenmeyers foram preparados, nas mesmas condições, somente para obtenção da biomassa seca.

3.5 Determinação da atividade da fração orgânica dos filtrados

Com o objetivo de iniciar o processo de identificação dos compostos presentes nos filtrados dos fungos mutualistas, este experimento teve a intenção de determinar, primeiramente, se tais compostos estavam ou não presentes na fração orgânica dos filtrados. Nesse sentido, foi necessário ampliar a escala de produção dos filtrados para obtenção de uma massa suficiente para o estudo biomonitorado. Para tanto, modificamos a forma de cultivo dos fungos mutualistas descrita no item 3.2. Passamos a cultivá-los em frascos “Schott” de um litro (contendo 500 mL de meio PDB cada) e em cultivo estacionário. A inoculação dos micélios dos fungos mutualistas seguiu a proporção descrita no item 3.2. Foram preparadas as seguintes quantidades de meio de cultivo para cada mutualista: um litro e meio para *Leucoagaricus* sp. AR04 e *Leucoagaricus* sp. IJ2016; e três litros para *L. gongylophorus* FF2006. Os frascos foram incubados a 25 °C, no escuro, e no 12º dia de incubação o cultivo foi interrompido para obtenção dos filtrados.

O filtrado de cada fungo mutualista foi submetido à partição líquido-líquido entre água e acetato de etila, para a extração da fase orgânica. Para cada 200 mL de filtrado foram adicionados 3 x 200 mL de acetato de etila, em funil de separação. Após esse processo, foi realizado o *clean up* da fase orgânica, também por partição líquido-líquido, utilizando 600 mL de água destilada. A fase orgânica foi então recolhida e o solvente evaporado a 35 °C à secura, utilizando rotaevaporador. Após secagem, o extrato bruto resultante foi pesado em balança analítica.

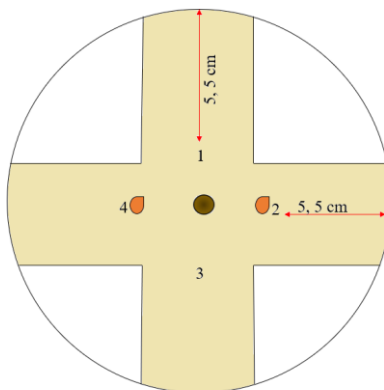
A triagem de atividade dos compostos foi realizada de duas formas: (i) incorporação do extrato bruto dos filtrados no meio de cultivo e (ii) uma junção de dois métodos descritos na literatura como: “chance de escolha” (GERARDO et al., 2006) e “teste de difusão em disco”

(KARAMAN et al., 2003; OSTROSKY et al., 2008). Com relação ao método “i”, adicionamos por placa, 5 mg do extrato bruto de cada fungo mutualista diluído em acetona na proporção de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Inicialmente, foram preparadas soluções estoques de cada extrato na concentração de 100 mg mL^{-1} . De cada extrato, foram incorporados $50 \text{ }\mu\text{L}$ ao meio de cultivo. Foram utilizadas cinco placas de Petri ($60 \times 15 \text{ mm}$), com 10 mL de meio PDA cada. Controles positivos (contendo $50 \text{ }\mu\text{L}$ acetona em 10 mL de meio PDA) e negativos (contendo somente 10 mL de meio PDA) também foram preparados, cada um com cinco placas. Utilizamos acetona como solvente, pois essa se mostrou mais eficiente na solubilidade dos extratos.

Quanto ao método de “chance de escolha”, em placas de Petri ($150 \times 15 \text{ mm}$) foram vertidos 60 mL de meio PDA fundido e, após solidificação, o meio foi recortado em formato de “cruz” (Figura 1). Esse método teve por objetivo verificar se haveria diferentes respostas de *Escovopsis* sp. LESF 315 frente aos extratos adicionados diretamente no meio de cultivo (OSTROSKY et al., 2008). No presente estudo, empregamos $0,1 \text{ mg}$ de extrato do filtrado (ou $2 \text{ }\mu\text{L}$ na concentração de 50 mg mL^{-1}), perfurando o ágar (adaptado de MODY et al., 2004) em duas partes da “cruz” (Figura 1, partes 2 e 4). Nas partes 1 e 3 (Figura 1), alíquotas de mesmo volume, porém de acetona, foram adicionadas como controle. As alíquotas foram dispostas a uma distância de $5,5 \text{ cm}$ da borda da placa de Petri (Figura 1). Para cada tratamento foram preparadas cinco placas. Adicionalmente, foram preparadas cinco placas contendo apenas 60 mL de meio PDA recortado em “cruz”, sendo essas consideradas o controle negativo do experimento (sem adição do extrato ou de acetona).

Em seguida, um disco de micélio de 5 mm de diâmetro de *Escovopsis* sp. LESF 315 foi disposto no centro da cruz (Figura 1). Do experimento (i), esperava-se observar um maior crescimento do parasita nas placas contendo o extrato incorporado ao meio. No experimento (ii), era esperado que *Escovopsis* sp. LESF 315 crescesse mais em direção ao extrato obtido de cada fungo mutualista, quando comparado à extremidade com solvente e às placas de controle negativo.

Figura 1. Esquema ilustrativo do bioensaio “ii”. Os números de 1 a 4 indicam as posições da “cruz” que receberam as alíquotas. Nas partes 2 e 4 foram adicionados 2 μL dos extratos brutos (na concentração 50 mg mL^{-1}) obtidos dos filtrados de cultivo dos fungos mutualistas. Nas partes 1 e 3 foram adicionados 2 μL de acetona (controle positivo). O mesmo método de recorte do meio de cultivo foi utilizado nas placas consideradas controle negativo, as quais continham somente meio PDA. No centro da cruz: *Escovopsis* sp. LESF 315.



As placas de ambos os experimentos foram incubadas durante sete dias, a 25°C e o crescimento micelial de *Escovopsis* sp. LESF 315 foi registrado em *scanner* HP Deskjet F2050. Com relação ao experimento (i), foram mensuradas as áreas de crescimento micelial da colônia (em cm^2). Para o experimento (ii), foi mensurada a distância (raio, em cm) entre o micélio de *Escovopsis* sp. LESF 315 e o final de cada uma das extremidades. Tanto a área, quanto o raio de crescimento micelial foram mensurados no *software* ImageJ v. 1.6.0_24 e as análises estatísticas realizadas conforme descrito no item 3.2.

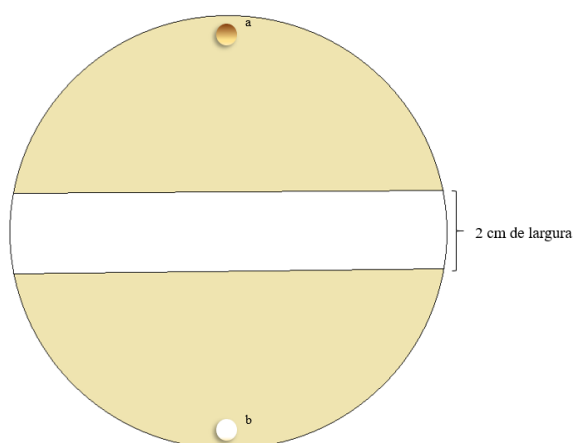
3.6 Ensaios para determinação da influência dos *Volatile Organic Compounds* (VOCs)

A partir dos resultados obtidos nos bioensaios com o extrato bruto, cogitou-se a possibilidade de que os compostos responsáveis pelo reconhecimento e resposta de *Escovopsis* sp. LESF 315 poderiam também serem de natureza volátil (ou seja, VOCs). Portanto, realizamos ensaios para verificar tal possibilidade utilizando os três fungos mutualistas e *Escovopsis* sp. LESF 315. O experimento baseou-se no método descrito por Strobel et al. (2001), com modificações. Uma tira de 2 cm de largura foi removida do meio PDA na região central da placa de Petri (90 x 15 mm, Figura 2). Em seguida, em um lado do meio, foi semeado um disco de micélio (5 mm de diâmetro) do fungo mutualista. As placas foram incubadas a 25°C , durante 11 dias, no escuro. Após o período de incubação, as placas foram abertas e no lado oposto ao mutualista, foi semeado um disco de micélio de *Escovopsis* sp. LESF 315 (previamente cultivado conforme o item 3.2).

A interrupção do meio PDA permitiu desconectar os micro-organismos, impedindo assim que compostos solúveis produzidos pelos fungos mutualistas alcançassem *Escovopsis* sp. LESF 315. Dessa forma, qualquer alteração no crescimento do parasita poderia ser atribuída

aos compostos voláteis. Placas controles foram preparadas do mesmo modo, entretanto, apenas *Escovopsis* sp. LESF 315 foi semeado. Para cada grupo tratamento e controle, foram preparadas cinco placas, as quais foram seladas com Parafilm® e incubadas durante sete dias, a 25 °C, no escuro. O crescimento do parasita foi registrado e as áreas de crescimento micelial (em cm²) mensuradas.

Figura 2. Bioensaio de volatilidade. Uma tira de meio PDA de 2 cm de largura foi removida do centro da placa. A letra “a” indica a posição na qual *Escovopsis* sp. LESF 315 foi semeado. A letra “b” representa a posição na qual os fungos mutualistas foram semeados.



3.7 Perfil químico do extrato bruto dos filtrados

Uma vez observado que os filtrados de cultivo e também compostos voláteis dos três fungos mutualistas foram capazes de estimular o crescimento de *Escovopsis* sp. LESF 315, inferimos que a interação entre esses micro-organismos é mediada por compostos químicos. Tal informação nos levou à determinação dos prováveis compostos envolvidos.

Iniciamos nossas buscas analisando por RMN de ¹H o extrato bruto de cada fungo mutualista, obtido pelo método descrito no item 3.5. Nosso objetivo com essa técnica foi obter de cada filtrado um *fingerprinting* capaz de nos mostrar se havia características comuns no perfil químico dos três fungos mutualistas, visto que *Escovopsis* sp. LESF 315 cresceu mais na presença de todos eles.

As análises de RMN de ¹H dos extratos brutos foram realizadas utilizando-se acetona-d₆ (Sigma-Aldrich) como solvente, visto que conferiu maior solubilidade às amostras. Estas foram preparadas dissolvendo-se 9 mg ou menos (massa disponível) do extrato em 500 µL de solvente deuterado. As análises foram adquiridas com janela espectral de 17 ppm e 128 scans e a partir de um espectrômetro Bruker Avance III de 400 MHz. Tubos de RMN Bruker de 5 mm foram utilizados. A mesma análise foi também realizada somente do meio de cultivo no

qual os fungos mutualistas foram cultivados, ou seja, PDB. Essa análise foi considerada controle, visto que seria possível encontrar nos *fingerprints* dos filtrados dos fungos mutualistas, a presença de substâncias originadas do meio de cultivo.

Para análise do meio PDB, o extrato orgânico do mesmo foi obtido tal como aqueles dos fungos mutualistas. Um total de 500 mL de meio foi preparado em frascos “Schott” de um litro e incubados durante 12 dias, a 25 °C, no escuro e de forma estacionária. Em seguida, o meio foi submetido à partição líquido-líquido entre água e acetato de etila e posterior secagem conforme descrito no item 3.5

A análise dos perfis químicos dos três fungos mutualistas, bem como os bioensaios dos extratos frente a *Escovopsis* sp. LESF 315 (itens 4.4 e 4.5) permitiram selecionar um, dentre os três fungos mutualistas para a continuidade com o estudo dos metabólitos mediadores da interação com *Escovopsis* sp. LESF 315.

3.8 Cultivo em escala ampliada para obtenção do extrato bruto do filtrado de *Leucoagaricus* sp. AR04

Até essa parte do estudo, os cultivos para obtenção dos filtrados dos fungos mutualistas foram realizados em pequenas quantidades. No entanto, os volumes finais obtidos foram suficientes para realizar somente os bioensaios com os filtrados e também com o extrato bruto. Entretanto, para os experimentos seguintes foram necessárias quantidades maiores de extrato bruto. Assim, ampliamos a escala de cultivo de *Leucoagaricus* sp. AR04 (mutualista selecionado a partir do experimento anterior).

Para tanto, 44 frascos “Schott” de um litro cada foram preparados com 500 mL de cultivo desse micro-organismo. Um frasco contendo 500 mL de meio PDB foi preparado como controle para as análises de RMN e também nos ensaios biológicos do item 3.10. Os frascos foram incubados durante 12 dias, a 25 °C, no escuro. Após esse período, o extrato bruto foi obtido conforme item 3.5.

Uma pequena parte desse extrato foi destinada para análise de RMN de ^1H , a fim de comparar com a análise já realizada (item 3.7). O objetivo foi comparar o perfil metabólico de *Leucoagaricus* sp. AR04 expresso em cultivo de menor e maior escala, para verificar a reprodutibilidade química nos experimentos biológicos. A técnica de RMN foi aplicada ao extrato tal como descrita no item 3.7. e também ao meio de cultivo PDB, utilizado como controle nesse experimento.

3.9 Obtenção das subfrações dos filtrados de *Leucoagaricus* sp. AR04

Dando sequência ao experimento anterior, fracionamos o extrato bruto obtido do cultivo em escala ampliada de *Leucoagaricus* sp. AR04. O método utilizado no fracionamento foi o de Cromatografia por Exclusão. Nessa modalidade de cromatografia foi utilizada como fase estacionária Sephadex® LH-20 (GE Healthcare) e suportes de vidro de diferentes tamanhos.

Primeiramente, o extrato foi suspenso em 2 mL de acetona e filtrado em seringa de vidro (Analítica) de 3 mL, por um filtro PTFE hidrofóbico de 0,22 µm de porosidade e 13 mm de diâmetro. Após evaporado o solvente, o extrato foi novamente suspenso em 1,750 mL de acetona. Esse volume representa 0,29 % do volume da coluna de Sephadex® LH-20 cuja altura e diâmetro são, respectivamente: 85 x 1,5 cm. A coluna foi empacotada em 600 mL de leito cromatográfico e a eluição foi realizada com acetona utilizando-se 2 L de solvente (um pouco mais que 3 volumes da coluna - 1,8 L).

O perfil químico de cada subfração coletada foi analisado por RMN de ¹H. Quando semelhantes, as subfrações foram reunidas e agrupadas por letras do alfabeto. No final, as subfrações resultantes foram então destinadas aos ensaios biológicos com *Escovopsis* sp. LESF 315.

3.10 Ensaios biológicos com as subfrações

Para avaliar quais as subfrações seriam as responsáveis pelo estímulo de crescimento de *Escovopsis* sp. LESF 315, aplicamos o experimento “ii” (item 3.5). Nas partes 2 e 4 da “cruz”, foram inseridas alíquotas de 2 µL de cada subfração (50 mg mL⁻¹). Nas demais partes da cruz (1 e 3), 2 µL do solvente (acetona) foram adicionados como controle (Figura 1). Foram preparadas cinco placas do grupo “tratamento” e cinco placas para os seguintes controles: (a) controle negativo (placas somente com meio de cultivo PDA); (b) controle positivo (placas que receberam 2 µL do extrato orgânico do meio PDB nas partes 2 e 4, e nas demais partes, alíquotas de mesmo volume de acetona); (c) controle do extrato bruto [placas que receberam 2 µL do extrato bruto (50 mg mL⁻¹) de *Leucoagaricus* sp. AR04 nas partes 2 e 4 e, nas demais partes, alíquotas de mesmo volume de acetona].

As placas tratamentos e controles foram incubadas durante sete dias, a 25 °C, no escuro, e o crescimento micelial de *Escovopsis* sp. LESF 315 foi registrado em *scanner* HP Deskjet F2050. A distância (raio, em cm) entre o micélio de *Escovopsis* sp. LESF 315 e o final de cada uma das extremidades da placa foi mensurada no *software* ImageJ v. 1.6.0_24.

3.11 Fracionamento das subfrações B e C

Uma vez constatada a bioatividade dessas subfrações, ambas foram novamente fracionadas. O objetivo foi isolar as substâncias majoritárias dessas subfrações. O fracionamento se iniciou com 85,27 mg e 144,47 mg das subfrações B e C, respectivamente. O método utilizado foi novamente a Cromatografia por Exclusão. A amostra foi suspensa em 0,250 mL de uma solução acetona:metanol (1:1) e aplicada na coluna de Sephadex® LH20 de altura e diâmetros $\alpha \times 2,5$ cm. A eluição foi realizada com acetona:metanol (1:1) utilizando-se 500 mL de solvente (um pouco mais que 3 volumes da coluna - 210 mL).

O perfil químico de cada subfração coletada foi analisado por RMN de ^1H . Quando semelhantes, as subfrações foram reunidas e agrupadas, sendo posteriormente denominadas com os símbolos de β (para a subfração B) e δ (para a subfração C), seguido de um número.

3.12 Ensaios biológicos com as subfrações $\delta 5$ e $\delta 7$

Como resultado do fracionamento da subfração C, foram obtidas três subfrações $\delta 3$, $\delta 5$ e $\delta 7$, as quais apresentaram pureza espectral. O Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira, do Laboratório de Produtos Naturais (UFSCar) caracterizou essas subfrações (dados não amostrados). Dessas, foi somente possível realizar os ensaios biológicos com as subfrações $\delta 5$ e $\delta 7$, pois apresentaram massa suficiente (5 mg cada). O intuito foi o mesmo dos ensaios anteriores, ou seja, o de verificar se essas subfrações estimulariam o crescimento de *Escovopsis* sp. LESF 315 nos experimentos de “chance de escolha”.

Adicionalmente, realizamos um experimento para verificação de VOCs conforme item 3.6. De um lado da placa, foi semeado um fragmento de micélio (5 mm de diâmetro) de *Escovopsis* sp. LESF 315. Do lado oposto, após perfurar o ágar, adicionamos 2 μL das subfrações (concentração de 50 mg mL^{-1}). Resolvemos utilizar esse método, pois no experimento de “chance de escolha” utilizado nos ensaios com as subfrações B e C, observamos uma certa orientação do crescimento de *Escovopsis* sp. LESF 315 em direção às alíquotas. Não foi possível identificar se essa orientação ocorreu devida a atividade das subfrações ou por inibição ocasionada pelo solvente (acetona), ou por ambos. Entretanto, quando comparamos as placas contendo as subfrações com aquelas do controle negativo (somente meio PDA), observamos um maior crescimento de *Escovopsis* sp. LESF 315 nas primeiras. Isso sugeriu a possibilidade de que parte das alíquotas pudessem ser voláteis, motivo pelo qual realizamos o experimento de VOCs.

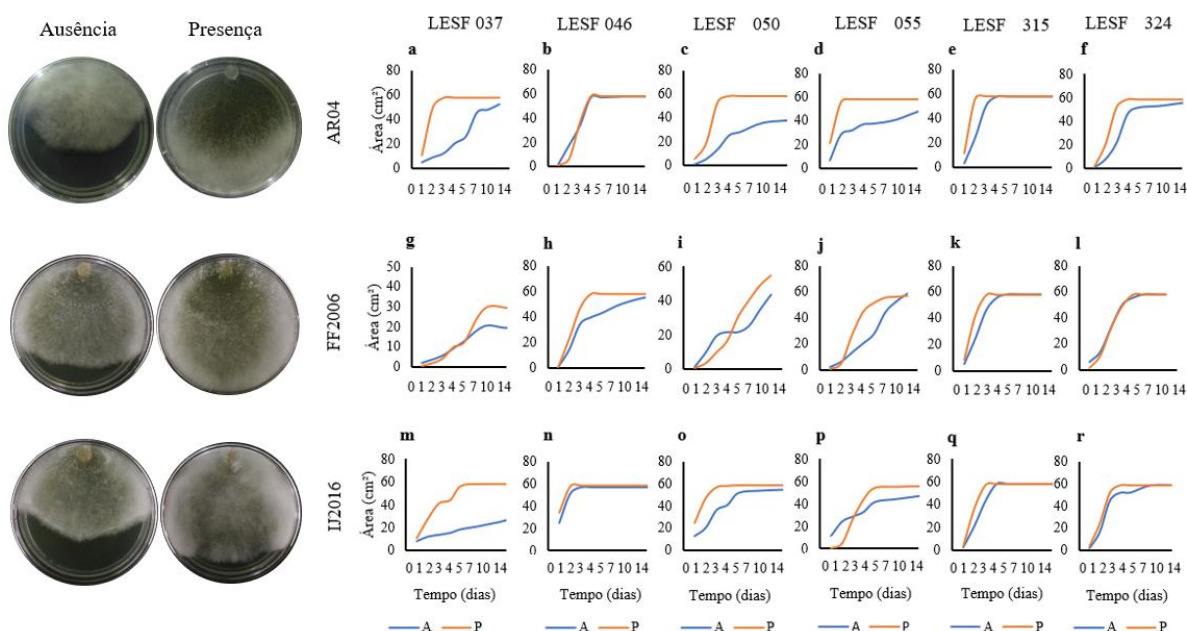
Foram preparadas cinco placas tratamento para cada subfração e dez placas controles; sendo cinco de controle negativo (onde somente *Escovopsis* sp. LESF 315 foi semeado) e cinco de controle positivo. Nessas, uma alíquota de 2 µL do solvente (metanol) foi adicionada no lado oposto ao parasita. Dessa vez o metanol (e não mais a acetona) foi utilizado como solvente, pois as amostras solubilizaram melhor nele. As placas foram vedadas com Parafilm® e incubadas a 25 °C, durante quatro dias, no escuro. O crescimento de *Escovopsis* sp. LESF 315 foi registrado e as áreas de crescimento micelial (em cm²) mensuradas conforme o item 3.2.

4 RESULTADOS

4.1 Bioensaios de incorporação dos filtrados no meio de cultivo

No geral, os seis isolados de *Escovopsis* sp. apresentaram um maior crescimento micelial na presença dos filtrados de cultivo dos fungos mutualistas, quando comparado com o controle sem o filtrado (Mann-Whitney, $P < 0,05$, Figura 3). Já no primeiro dia de experimento, três isolados do parasita (LESF 046, LESF 050 e LESF 315) apresentaram um crescimento micelial médio 1,23 vezes maior na presença dos filtrados, quando comparado com o crescimento na ausência desses. Ainda nesse mesmo dia de experimento, os demais isolados (LESF 037, LESF 055 e LESF 324) foram inibidos na presença do filtrado, pois apresentaram um crescimento, em média, 2,87 vezes menor do que o controle (Tabelas A1 a A3). Entretanto, com base no resultado geral de crescimento de *Escovopsis* sp. na presença dos filtrados (Figura 3), inferiu-se que esse micro-organismo é capaz de responder aos filtrados dos fungos mutualistas.

Figura 3. Crescimento micelial (em cm²) de seis isolados de *Escovopsis* sp. (LESF 037, LESF 046, LESF 050, LESF 055, LESF 315 e LESF 324), na ausência (A) e presença (P) dos filtrados de *Leucoagaricus* sp. AR04 (gráficos a, b, c, d e f), *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006 (gráficos g, h, i, j, k e l) e *Leucoagaricus* sp. IJ2016 (gráficos m, n, o, p, q e r). As fotos à esquerda ilustram o crescimento de *Escovopsis* sp. na ausência e presença dos filtrados dos três fungos mutualistas.

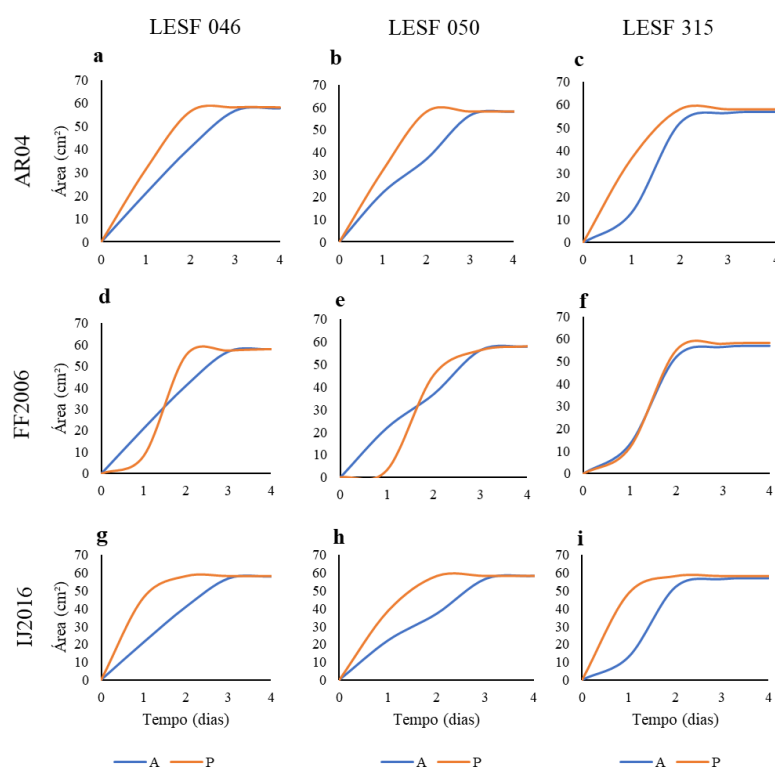


4.2 Validação dos bioensaios de incorporação dos filtrados no meio de cultivo

Devido ao período de oito meses de estocagem de todos os fungos, realizamos um experimento de validação dos efeitos dos filtrados sobre *Escovopsis* sp. Nesse sentido, foram

selecionados os isolados LESF 046, LESF 050 e LESF 315, pois foram os que melhor responderam aos filtrados. No bioensaio de validação, esses isolados apresentaram um maior crescimento micelial na presença dos filtrados de *L. gongylophorus* AR04 e *Leucoagaricus* sp. IJ2016, quando comparado com o controle (Mann-Whitney, $P < 0,05$, Figura 4, Tabelas A4 e A5). Por outro lado, o crescimento dos isolados *Escovopsis* sp. LESF 050 e LESF 315 foi inibido na presença do filtrado de *L. gongylophorus* FF2006 (Tabela A6). O isolado LESF 046 foi o único que apresentou um maior crescimento micelial na presença do filtrado de *L. gongylophorus* FF2006 (1,35 vezes mais), quando comparado com o controle, no segundo dia de incubação.

Figura 4. Crescimento micelial (em cm²) de *Escovopsis* sp. (LESF 046, LESF 050 e LESF 315), na ausência (A) e presença (P) dos filtrados de *Leucoagaricus* sp. AR04 (gráficos a, b e c), *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006 (gráficos d, e e f) e *Leucoagaricus* sp. IJ2016 (gráficos g, h e i).



O isolado LESF 315 foi aquele que apresentou as maiores respostas de crescimento frente aos filtrados de *Leucoagaricus* sp. AR04 e *Leucoagaricus* sp. IJ2016 (Tabelas A4 e A6). Nos três primeiros dias de experimento, esse isolado cresceu, em média, 1,21 vezes mais na presença do filtrado, quando comparado ao controle (Tabelas A4 a A6). Neste mesmo período, LESF 046 cresceu, em média, 0,59 vezes mais e o isolado LESF 050 foi inibido em 0,05 vezes que o controle (Tabelas A4 a A6). Apenas no primeiro dia de incubação na presença dos

filtrados de *Leucoagaricus* sp. AR04 e *Leucoagaricus* sp. IJ2016 (Tabelas A4 a A6), LESF 315 cresceu 2,81 e 3,74 vezes mais do que o controle, respectivamente (Mann-Whitney, $P < 0,05$).

Com esses bioensaios foi possível determinar que os fungos mutualistas preservados no acervo ainda mantiveram a produção dos compostos que estimulam o crescimento de *Escovopsis* sp. Também foi possível validar que os isolados de *Escovopsis* sp. mantiveram os padrões de reconhecimento dos filtrados, mesmo após o longo período de preservação no acervo da coleção. Dado o melhor crescimento de *Escovopsis* sp. LESF 315 frente aos filtrados de *Leucoagaricus* sp. AR04 e *Leucoagaricus* sp. IJ2016, esse isolado foi selecionado para continuar os estudos do presente trabalho.

4.3 Efeito do tempo e da concentração dos filtrados no crescimento de *Escovopsis* sp. LESF 315

O crescimento de *Escovopsis* sp. LESF 315 foi bastante variável na presença das duas concentrações e nos tempos de obtenção dos filtrados dos três fungos mutualistas (Figura 5 e Tabelas A7 a A9). No primeiro dia de incubação, nas concentrações 1:1 e 1:10 do filtrado de *Leucoagaricus* sp. AR04, *Escovopsis* sp. LESF 315 foi inibido na presença dos filtrados obtidos do terceiro ao 12º dia de cultivo desse fungo mutualista. Entretanto, a partir do segundo dia de incubação do bioensaio, *Escovopsis* sp. LESF 315 cresceu significativamente mais na presença dos filtrados avaliados, do que no controle (Figura 5a e 5b, Tabela A7). No terceiro dia de bioensaio, tal crescimento maximizado persistiu para todos os filtrados desse fungo mutualista, porém, somente para a concentração 1:10. Já na concentração 1:1, no terceiro dia de bioensaio, não houve diferenças significativas no crescimento do parasita, em relação ao controle (Tabela A7).

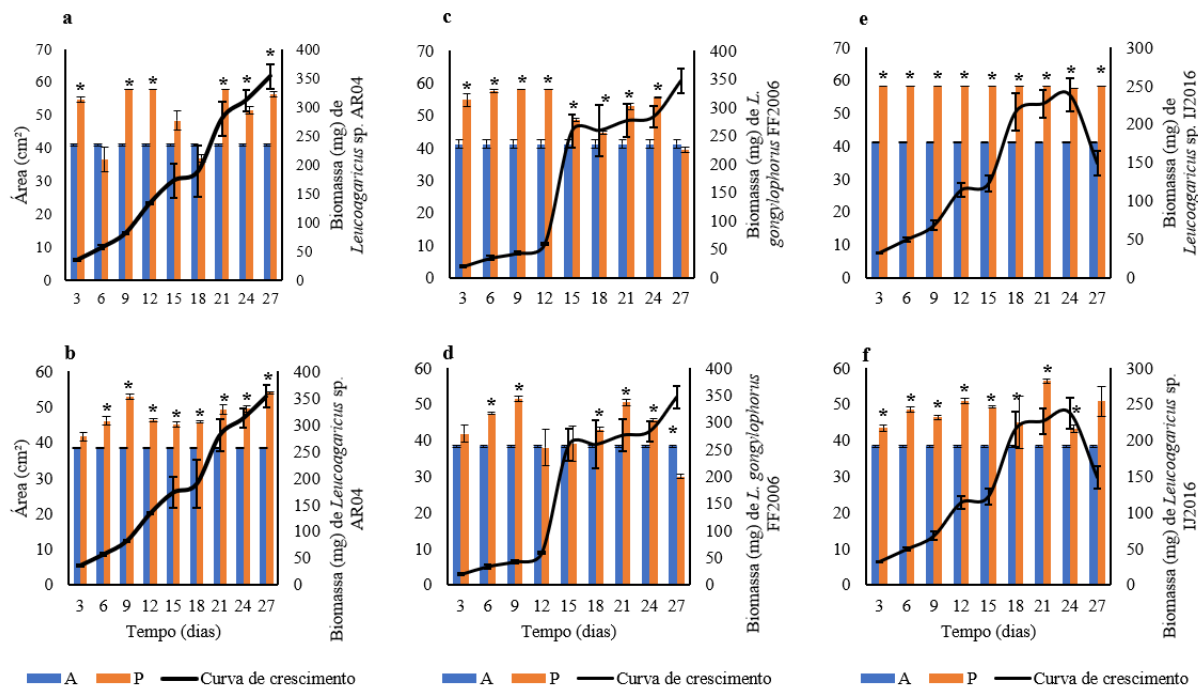
Quanto aos filtrados obtidos de *L. gongylophorus* FF2006, *Escovopsis* sp. LESF 315 cresceu significativamente mais em sua presença, em ambas as concentrações, desde o primeiro dia de ensaio (Mann-Whitney, $P < 0,05$, Figura 5, Tabela A8). Esse resultado também foi observado no segundo dia de ensaio, para ambas as concentrações (Figura 5c e 5d). Também observamos inibição no crescimento de *Escovopsis* sp. LESF 315 na presença do filtrado obtido do 27º dia de cultivo de *L. gongylophorus* FF2006. Tal inibição ocorreu no terceiro dia de ensaio para a concentração 1:1 e do primeiro ao terceiro dia para a concentração 1:10 (Mann-Whitney, $P < 0,05$, Tabela A8).

Na presença do filtrado de *Leucoagaricus* sp. IJ2016, os resultados do crescimento de *Escovopsis* sp. LESF 315 foram bastante semelhantes àqueles obtidos frente aos filtrados de

Leucoagaricus sp. AR04. No primeiro dia de ensaio na presença do filtrado de *Leucoagaricus* sp. IJ2016, foi observado uma inibição de *Escovopsis* sp. LESF 315, quando comparado ao controle (Mann-Whitney, $P < 0,05$, Figura 5 e Tabela A9). Essa inibição aconteceu no primeiro dia de incubação do parasita na presença dos filtrados obtidos no sexto ao 24º dia, e do terceiro ao 27º dia de *Leucoagaricus* sp. IJ2016 na concentração 1:1 e 1:10, respectivamente. Contudo, a partir do segundo dia de ensaio, *Escovopsis* sp. LESF 315 cresceu significativamente mais que o controle na maioria dos dias dos filtrados avaliados (Figura 5e e 5f, Tabela A9). No terceiro dia de ensaio, o crescimento maximizado persistiu do sexto ao 27º dia de filtrado desse fungo mutualista somente na concentração 1:10. Nesse mesmo dia de ensaio, na concentração 1:1, não houve diferença significativa no crescimento de *Escovopsis* sp. LESF 315 em relação ao controle (Tabela A9).

No geral, se considerarmos o crescimento de *Escovopsis* sp. LESF 315 apenas no segundo dia de ensaio, em ambas as concentrações, foi possível notar que os filtrados obtidos nos diferentes dias de cultivo dos três fungos mutualistas pouco influenciou no crescimento do parasita (Figura 5). No segundo dia de ensaio (Figura 5), o crescimento de *Escovopsis* sp. LESF 315 foi maior em quase todos os filtrados, exceto na presença do filtrado obtido no 27º dia de cultivo de *L. gongylophorus* FF2006. Nesse filtrado, *Escovopsis* sp. LESF 315 foi inibido em relação ao crescimento observado no controle (Figura 5). Além disso, no segundo dia de ensaio, a menor concentração utilizada (de 1:10) foi aquela na qual observamos o maior número de respostas significativas de crescimento maximizado de *Escovopsis* sp. LESF 315 na presença dos filtrados dos três fungos mutualistas, em relação ao controle. Nessa concentração, foram observadas 54 respostas significativas de *Escovopsis* sp. LESF 315 enquanto que, na concentração de 1:1, o número de respostas significativas foi de 35 (Tabelas A7 a A9).

Figura 5. Crescimento micelial (em cm²) de *Escovopsis* sp. LESF 315, no segundo dia de incubação, na ausência (A) e na presença (P) dos filtrados de: *Leucoagaricus* sp. AR04 nas concentrações de 1:1 e 1:10 (gráficos a e b, respectivamente); *L. gongylophorus* FF2006 nas concentrações de 1:1 e 1:10 (gráficos c e d, respectivamente) e *Leucoagaricus* sp. IJ2016 nas concentrações de 1:1 e 1:10 (gráficos e e f, respectivamente). Os * sinalizam diferenças significativas entre os tratamentos (ausência e presença dos filtrados). Linha preta corresponde à biomassa micelial seca (em mg) dos fungos mutualistas.



Apesar da semelhança observada na resposta de *Escovopsis* sp. LESF 315 frente aos filtrados dos três fungos mutualistas no segundo dia de ensaio, é interessante notar que as curvas de crescimento dos três fungos mutualistas diferiram (Figura 5 e Tabela 2). Por exemplo, *Leucoagaricus* sp. AR04 apresentou um crescimento contínuo do terceiro ao 27º dia (Figuras 5a e 5b). Já *L. gongylophorus* FF2006, apresentou baixo crescimento do terceiro ao nono dia de incubação; sendo que, do 12º ao 15º dia, apresentou um crescimento abrupto e se manteve até o 24º dia (Figuras 5c e 5d). Com relação a curva de crescimento de *Leucoagaricus* sp. IJ2016, observou-se um crescimento contínuo do terceiro ao 12º dia de incubação, quando então ocorreu uma estabilização, mantendo-se constante até o 15º dia. A partir desse ponto observamos crescimento acentuado até o 18º dia, seguindo com um crescimento menos intenso até o 24º dia (Figuras 5e e 5f; Tabela 2).

Tabela 2. Biomassa seca (média $\pm$ erro padrão, em mg) dos três fungos mutualistas para todos os dias de obtenção dos filtrados.

Dia do filtrado	Biomassa seca (mg)		
	<i>Leucoagaricus</i> sp. AR04	<i>L. gongylophorus</i> FF2006	<i>Leucoagaricus</i> sp. IJ2016
3	36,47 $\pm$ 2,86	19,51 $\pm$ 2,02	32,4 $\pm$ 0,83
6	57,42 $\pm$ 3,78	34,16 $\pm$ 3,67	49,65 $\pm$ 2,53
9	82,45 $\pm$ 4,24	43,00 $\pm$ 2,46	68,05 $\pm$ 6,22
12	133,58 $\pm$ 10,06	59,06 $\pm$ 1,98	114,17 $\pm$ 9,33
15	173,43 $\pm$ 20,78	258,45 $\pm$ 29,87	122,28 $\pm$ 10,61
18	189,07 $\pm$ 24,05	2,59,28 $\pm$ 44,43	215,87 $\pm$ 24,3
21	280,66 $\pm$ 8,48	276,5 $\pm$ 29,32	226,69 $\pm$ 17,98
24	312,27 $\pm$ 8,45	283,58 $\pm$ 18,5	237,95 $\pm$ 21,76
27	353,46 $\pm$ 23,38	346,57 $\pm$ 21,36	149,1 $\pm$ 15,71

Biomassa seca inicial: 1,85 mg, 2,5 mg e 1, 8 mg para *Leucoagaricus* sp. AR04, *L. gongylophorus* FF2006 e *Leucoagaricus* sp. IJ2016, respectivamente.

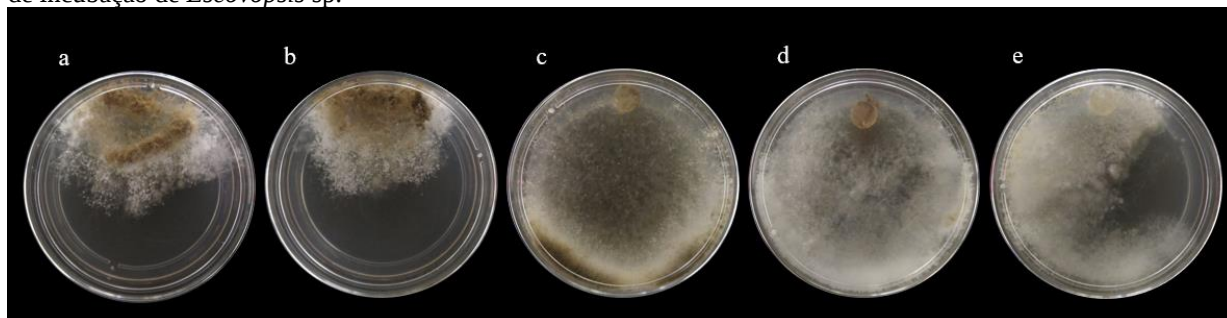
4.4 Determinação da atividade biológica dos extratos brutos dos três fungos mutualistas

Foram obtidas as seguintes massas de extrato bruto dos filtrados dos fungos mutualistas: 46,73 mg de *Leucoagaricus* sp. AR04, 34,56 mg de *L. gongylophorus* FF2006 e 45,33 mg de *Leucoagaricus* sp. IJ2016. Os extratos foram empregados nas triagens “i” e “ii”. Como resultado da triagem “i” (incorporação dos extratos brutos no meio de cultivo), a partir do segundo dia de incubação, até o sexto dia, *Escovopsis* sp. LESF 315 cresceu significativamente mais na presença dos extratos dos três fungos mutualistas, quando comparado aos controles (Mann-Whitney, $P < 0,05$, Tabela 3 e Figura 6). Também foram observadas diferenças significativas no crescimento de *Escovopsis* sp. LESF 315 entre os extratos. Na presença do extrato de *Leucoagaricus* sp. AR04, o parasita cresceu significativamente mais, quando comparado com os extratos dos demais mutualistas (Mann-Whitney, $P < 0,05$, Tabela 3). Com relação aos controles, houve diferença significativa entre eles apenas no primeiro e no sexto dias de incubação do parasita, sendo que este cresceu mais no controle negativo (Tabela 3).

Tabela 3. Crescimento micelial (média $\pm$ erro padrão, em cm²) de *Escovopsis* sp. LESF 315 na presença dos extratos brutos de *Leucoagaricus* sp. AR04, *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006 e *Leucoagaricus* sp. IJ2016 incorporados no meio de cultivo (50 μ L de extrato em 10 mL de PDA). C+: acetona (50 μ L) e C-: somente meio de cultivo. Letras distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tratamentos (Mann-Whitney $P < 0,05$).

Tratamentos	Dias de incubação					
	1	2	3	4	5	6
AR04	5,63 $\pm$ 0,32 ad	55,04 $\pm$ 0,63 a	58,12 $\pm$ 0,00 a	58,12 $\pm$ 0,00 a	58,12 $\pm$ 0,00 a	58,12 $\pm$ 0,00 a
FF2006	4,13 $\pm$ 0,05 bd	16,88 $\pm$ 0,34 b	38,02 $\pm$ 4,79 b	58,12 $\pm$ 0,00 a	58,12 $\pm$ 0,00 a	58,12 $\pm$ 0,00 a
IJ2016	4,18 $\pm$ 0,17 bcd	13,47 $\pm$ 0,71 c	18,45 $\pm$ 0,82 c	58,12 $\pm$ 0,00 a	58,12 $\pm$ 0,00 a	58,12 $\pm$ 0,00 a
C+	3,35 $\pm$ 0,15 c	7,5 $\pm$ 0,76 d	8,66 $\pm$ 0,73 d	12,85 $\pm$ 1,29 b	16,87 $\pm$ 0,73 b	25,56 $\pm$ 5,13 b
C-	4,97 $\pm$ 0,19 d	10,22 $\pm$ 0,48 d	12,93 $\pm$ 0,89 d	15,61 $\pm$ 1,35 b	26,14 $\pm$ 4,78 b	42,61 $\pm$ 5,63 c

Figura 6. Crescimento de *Escovopsis* sp. LESF 315 (a) no controle negativo (somente meio de cultivo); (b) no controle positivo (com acetona); na presença do extrato bruto (50 μ L em 10 mL de PDA) de (c) *Leucoagaricus* sp. AR04, (d) *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006 e (e) *Leucoagaricus* sp. IJ2016. Imagens obtidas no quarto dia de incubação de *Escovopsis* sp.



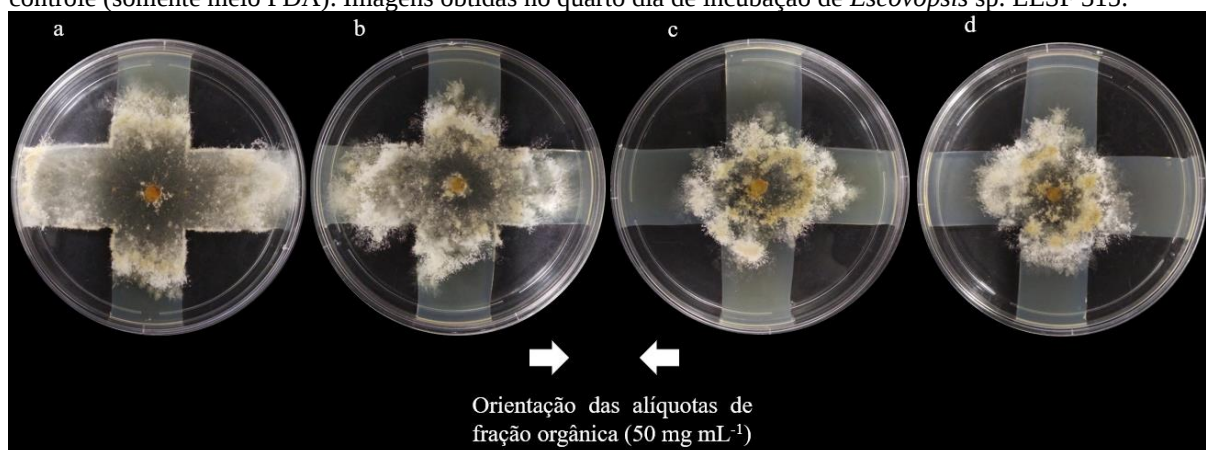
Com relação a triagem “ii” (“chance de escolha”), como esperado, *Escovopsis* sp. LESF 315 apresentou um maior crescimento em direção as alíquotas dos extratos brutos (Tabelas A10 a A12). As diferenças significativas (Mann-Whitney, $P < 0,05$) desse crescimento foram observadas com mais frequência do segundo ao quarto dia de ensaio com o extrato bruto de *Leucoagaricus* sp. AR04 (Figura 7a); no segundo e terceiro dia com o extrato bruto de *L. gongylophorus* FF2006 (Figura 7b) e somente no sexto dia com o extrato de *Leucoagaricus* sp. IJ2016 (Figura 7c). Contudo, houve também diferença significativa no crescimento de *Escovopsis* sp. LESF 315 no controle negativo (somente meio PDA). No quarto dia de ensaio, esse fungo cresceu mais na extremidade 4, quando comparada a extremidade 2 (Tabela A13, Figura 7d).

Diferenças significativas foram observadas também ao compararmos o crescimento de *Escovopsis* sp. LESF 315 nas placas contendo o extrato bruto e naquelas do controle negativo (Mann-Whitney, $P < 0,05$, Figura 7 e Tabela 4). Tais diferenças ocorreram em todos os dias de incubação de *Escovopsis* sp. LESF 315 frente aos extratos de *Leucoagaricus* sp. AR04 e *L. gongylophorus* FF2006. Esse resultado ocorreu nas cinco placas avaliadas de cada tratamento. Por outro lado, o crescimento de *Escovopsis* sp. LESF 315 na presença do extrato bruto de *Leucoagaricus* sp. IJ2016 foi estatisticamente semelhante ao controle (Figura 7 e Tabela 4). Os extratos de *Leucoagaricus* sp. AR04 e *L. gongylophorus* FF2006 proporcionaram um maior crescimento de *Escovopsis* sp. LESF 315, quando comparado com o extrato de *Leucoagaricus* sp. IJ2016.

Tabela 4. Crescimento micelial de *Escovopsis* sp. LESF 315 (média $\pm$ erro padrão, em cm) na presença dos extratos brutos dos filtrados de *Leucoagaricus* sp. AR04, *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006, *Leucoagaricus* sp. IJ2016 e no controle negativo (somente meio PDA). Letras distintas nas colunas indicam diferenças significativas entre os tratamentos (Mann-Whitney, $P < 0,05$).

Tratamentos	Dias						
	1	2	3	4	5	6	7
AR04	0,33 $\pm$ 0,01 a	0,52 $\pm$ 0,01 a	0,61 $\pm$ 0,01 a	0,68 $\pm$ 0,00 a	0,71 $\pm$ 0,00 a	0,72 $\pm$ 0,00 a	0,73 $\pm$ 0,01 a
FF2006	0,30 $\pm$ 0,02 ab	0,45 $\pm$ 0,01 b	0,56 $\pm$ 0,01 b	0,68 $\pm$ 0,01 a	0,69 $\pm$ 0,01 a	0,69 $\pm$ 0,01 a	0,72 $\pm$ 0,01 a
IJ2016	0,24 $\pm$ 0,01 b	0,32 $\pm$ 0,01 c	0,40 $\pm$ 0,01 c	0,52 $\pm$ 0,02 b	0,56 $\pm$ 0,02 b	0,61 $\pm$ 0,03 b	0,65 $\pm$ 0,02 b
C-	0,21 $\pm$ 0,02 cb	0,30 $\pm$ 0,01 dc	0,37 $\pm$ 0,01 dc	0,48 $\pm$ 0,01 b	0,56 $\pm$ 0,01 b	0,63 $\pm$ 0,02 b	0,69 $\pm$ 0,01 b

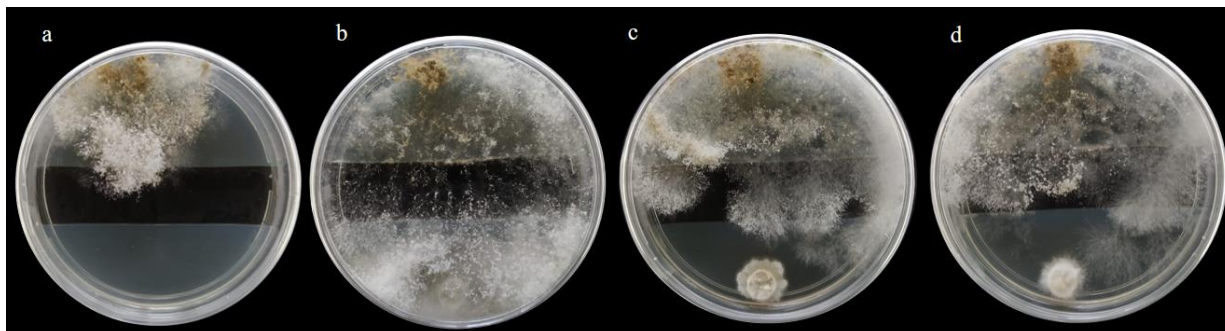
Figura 7. Crescimento de *Escovopsis* sp. LESF 315 na presença dos extratos brutos (50 mg mL⁻¹) de (a) *Leucoagaricus* sp. AR04; (b) *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006 e (c) *Leucoagaricus* sp. IJ2016 e (d) no controle (somente meio PDA). Imagens obtidas no quarto dia de incubação de *Escovopsis* sp. LESF 315.



4.5 Ensaios de volatilidade

Escovopsis sp. LESF 315 apresentou um crescimento micelial significativamente maior na presença dos três fungos mutualistas, quando comparado com o crescimento na ausência deles (Mann-Whitney, $P < 0,05$, Figura 8). As diferenças significativas foram observadas do primeiro ao sétimo dia de ensaio frente aos três fungos mutualistas (Mann-Whitney, $P < 0,05$, Figura 8 e Tabela A14). No primeiro e segundo dia de experimento, o crescimento de *Escovopsis* sp. LESF 315 na presença de *Leucoagaricus* sp. AR04 foi de 5,13 e 5,47 vezes maior em relação ao controle, respectivamente (Tabela A14). Na presença de *L. gongylophorus* FF2006, o parasita atingiu um crescimento 3,67 vezes a mais que no controle, no terceiro dia de incubação do experimento (Tabela A14). Já, com relação a *Leucoagaricus* sp. IJ2016, esse fungo estimulou o crescimento de *Escovopsis* sp. LESF 315 em 2,87 vezes, quando comparado com o controle; porém, esse crescimento somente foi observado no quinto dia de incubação do experimento (Tabela A14).

Figura 8. Crescimento de *Escovopsis* sp. LESF 315 (a) na ausência dos fungos mutualistas e na presença de (b) *Leucoagaricus* sp. AR04, (c) *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006 e (d) *Leucoagaricus* sp. IJ2016. Imagens obtidas no quarto dia de incubação de *Escovopsis* sp. LESF 315.

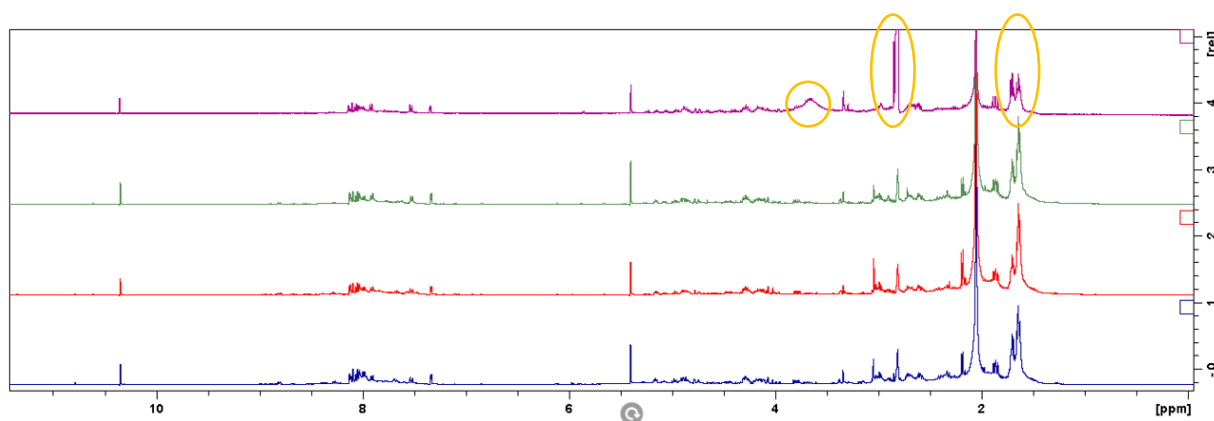


4.6 Análise do perfil químico dos extratos brutos dos filtrados

Os espectros de RMN de ^1H obtidos dos extratos brutos dos três fungos mutualistas foram muito semelhantes (Figura 9). Tais semelhanças puderam ser observadas, principalmente, na região de 1,5 a 3 ppm (Figura 9). Essa é também a região que foram detectadas as maiores diferenças, em relação ao espectro do controle (somente meio PDB). Uma análise mais aprimorada desses espectros será realizada até a publicação deste trabalho. No momento, esses resultados foram suficientes para que selecionássemos apenas um fungo mutualista para prosseguir com a caracterização química.

Considerando os resultados dos ensaios de incorporação dos filtrados no meio de cultivo em conjunto com os resultados do experimento de volatilidade, optamos por selecionar o fungo *Leucoagaricus* sp. AR04. Foi na presença dos filtrados desse fungo ou da própria colônia (nos ensaios de volatilidade) que *Escovopsis* sp. LESF 315 apresentou os maiores crescimentos em relação ao controle.

Figura 9. Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do meio de cultivo PDB (em roxo, 15 mg mL^{-1}) e do extrato bruto de *Leucoagaricus* sp. IJ2016 (em verde, 15 mg mL^{-1}), de *Leucoagaricus* sp. AR04 (em vermelho, 15 mg mL^{-1}) e de *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006 (em azul, 15 mg mL^{-1}). Regiões assinaladas em amarelo destacam as diferenças entre os espectros dos extratos do meio de cultivo (controle) e dos filtrados dos fungos.

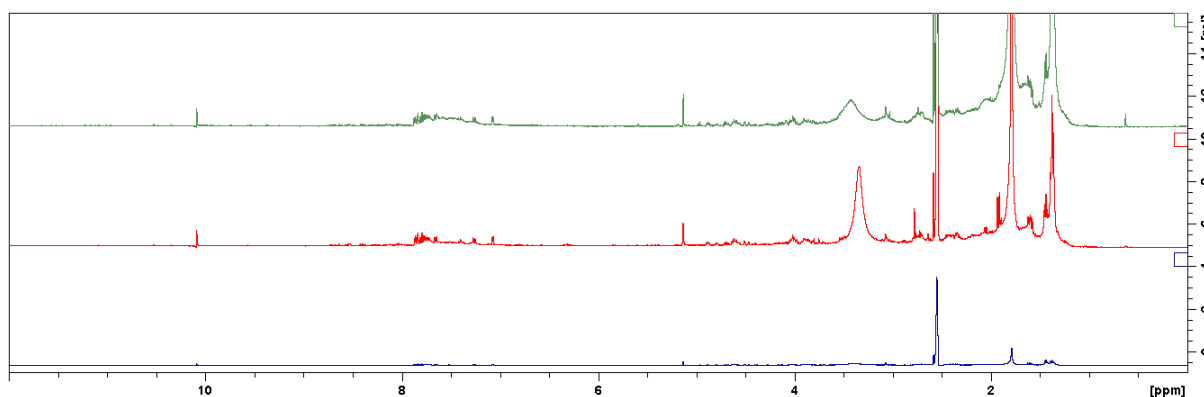


4.7 Cultivo em escala ampliada para obtenção dos extratos brutos do filtrado de *Leucoagaricus* sp. AR04

Do cultivo em escala ampliada de *Leucoagaricus* sp. AR04 foram obtidos 22 litros de filtrado. Desse, um total de 835,66 mg resultou no extrato bruto. Já do meio de cultivo PDB, foram obtidos 22,42 mg de extrato bruto para uso nas análises químicas de RMN de ^1H e nos ensaios biológicos.

A comparação dos perfis químicos obtidos por RMN de ^1H dos extratos do filtrado de *Leucoagaricus* sp. AR04 tanto em escala reduzida (Figura 9), quanto em escala ampliada (Figura 10), mostrou que esses filtrados são semelhantes em termos de composição química. Isso pode ser afirmado, dada à similaridade dos *fingerprints* obtidos de ambos os extratos do mesmo fungo (Figura 10).

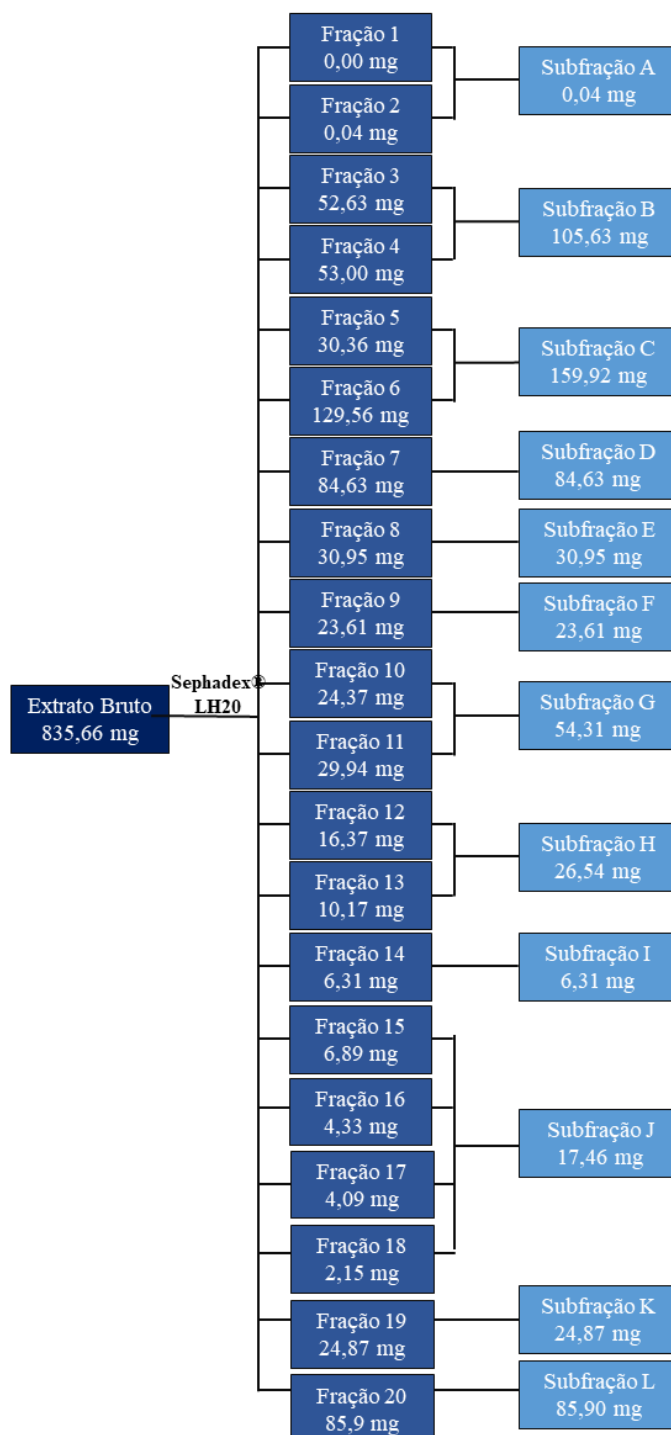
Figura 10. Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, acetona- d_6) do meio de cultivo PDB (em azul, 15 mg mL^{-1}), do extrato bruto de *Leucoagaricus* sp. AR04 obtido em escala reduzida (em vermelho, 15 mg mL^{-1}) e em escala ampliada (em verde, 15 mg mL^{-1}).



4.8 Obtenção das subfrações dos filtrados de *Leucoagaricus* sp. AR04

Com o método de Cromatografia de Exclusão foram coletadas 20 frações de 100 mL cada. A análise do perfil químico de cada uma por RMN de ^1H permitiu a união de frações com espectros semelhantes, resultando nas massas destacadas na Figura 11. Algumas frações não foram reunidas, pois apresentaram espectros distintos. Após esse processo de junção e diferenciação, foram obtidas 12 subfrações da fração orgânica.

Figura 11. Fluxograma de fracionamento do extrato bruto de *Leucoagaricus* sp. AR04, com as frações e subfrações obtidas.

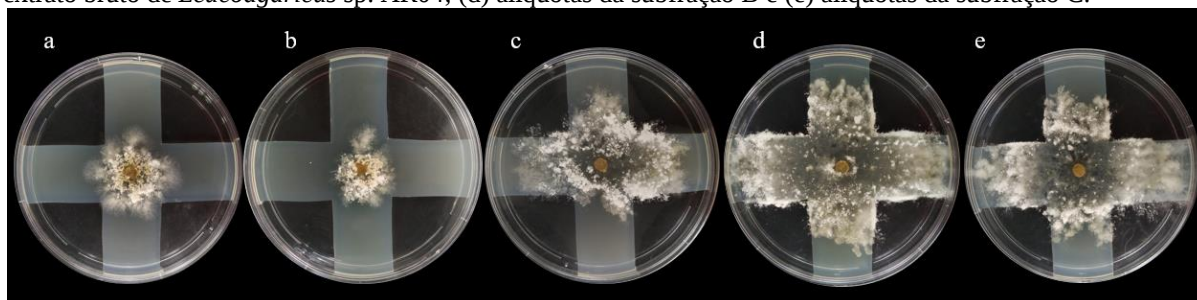


4.9 Ensaios biológicos das subfrações

Escovopsis sp. LESF 315 apresentou um maior crescimento em direção as alíquotas do extrato bruto e de oito (B, C, D, E, F, G, I e L), dentre as 11 subfrações avaliadas, quando

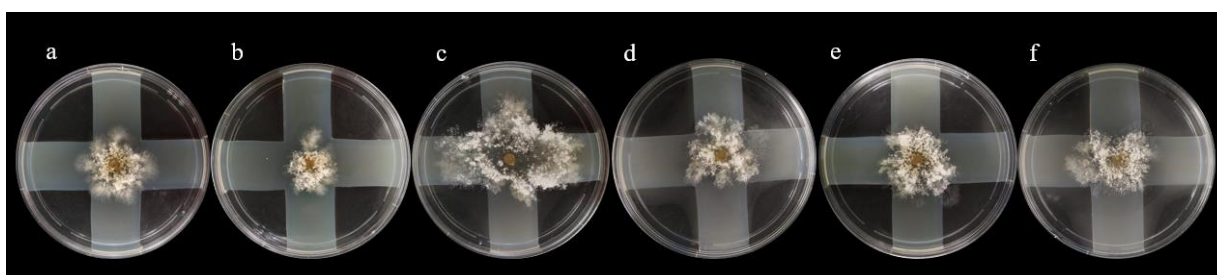
comparado com o controle (Tabelas A15 a A25). As diferenças significativas (Mann-Whitney, $P < 0,05$) desse crescimento foram observadas com mais frequência no terceiro dia de ensaio, com o extrato bruto e também com as subfrações (Figura 12). A subfração A não foi avaliada devido a quantidade insuficiente de massa (Figura 11).

Figura 12. Crescimento micelial de *Escovopsis* sp. LESF 315 com três dias de incubação (a) no controle negativo (somente meio PDB), (b) no controle positivo (extrato bruto do meio de cultivo), (c) na presença das alíquotas do extrato bruto de *Leucoagaricus* sp. AR04; (d) alíquotas da subfração B e (e) alíquotas da subfração C.



Com relação às demais subfrações (H, J e K), não foi observado um crescimento significativamente maior de *Escovopsis* sp. LESF 315 no sentido das alíquotas, em relação ao controle positivo (Tabelas A26 a A28). Todavia, quando comparado com o controle negativo (somente meio PDA), já no segundo dia de ensaio, *Escovopsis* sp. LESF 315 apresentou um maior crescimento para as extremidades 2 e 4, nas quais foram aplicadas as subfrações (Mann-Whitney, $P < 0,05$, Figura 13).

Figura 13. Crescimento micelial de *Escovopsis* sp. LESF 315 com três dias de incubação (a) no controle negativo (somente meio PDB), (b) no controle positivo (extrato bruto do meio de cultivo), (c) na presença das alíquotas do extrato bruto de *Leucoagaricus* sp. AR04; (d) alíquotas da subfração H e (e) alíquotas da subfração J e (f) alíquotas da subfração K.



Utilizando a média do crescimento em cada tratamento e comparando com ambos os controles de forma conjunta, observamos que *Escovopsis* sp. LESF 315 cresceu significativamente mais na presença das subfrações B, C e do extrato bruto, do que nos controles positivo e negativo (Mann-Whitney, $P < 0,05$, Tabela A29). Comparado com as demais subfrações, o parasita sempre apresentou um crescimento significativamente maior nas subfrações B e C (Mann-Whitney, $P < 0,05$, Tabela A29).

Considerando esses resultados, as subfrações B e C foram selecionadas para serem novamente fracionadas com o intuito de isolar as substâncias majoritárias responsáveis pela bioatividade.

4.10 Fracionamento da subfração B

Foram coletadas no fracionamento 41 subfrações de 5 mL cada. Após a análise dos perfis químicos obtidos por RMN de ^1H (Figuras 14 a 16), as subfrações foram reunidas conforme descrito na Figura 17. O fracionamento das subfrações β , bem como o estudo químico das subfrações resultantes encontram-se em andamento.

Figura 14. Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, metanol- d_4) das subfrações: (a) B1 (em azul), B3 (em vermelho), B5 (em verde), B7 (em violeta) e B9 (em amarelo); (b) B10 (em azul), B11 (em vermelho) e B12 (em verde); (c) B13 (em azul), B14 (em vermelho), B15 (em verde escuro), B16 (em violeta), B17 (em amarelo), B18 (em preto), B19 (em verde claro) e B20 (em rosa); (d) B21 (em azul), B22 (em vermelho) e B23 (em verde).

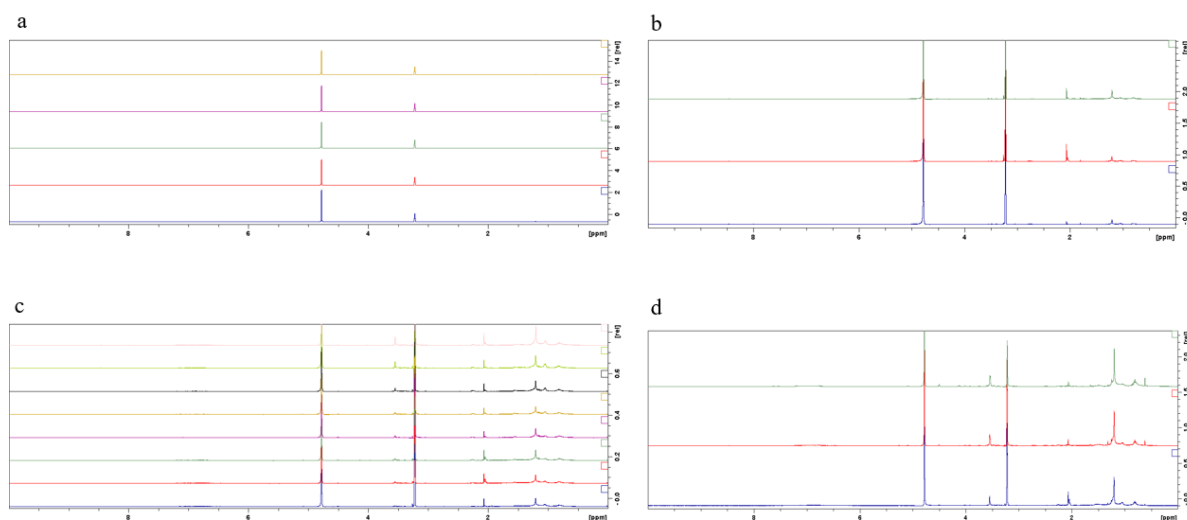


Figura 15. Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, metanol- d_4) das subfrações: (a) B24 (em azul), B25 (em vermelho) e B26 (em verde); (b) B27 (em azul) e B28 (em vermelho); (c) B29 (em azul) e B30 (em vermelho); (d) B31.

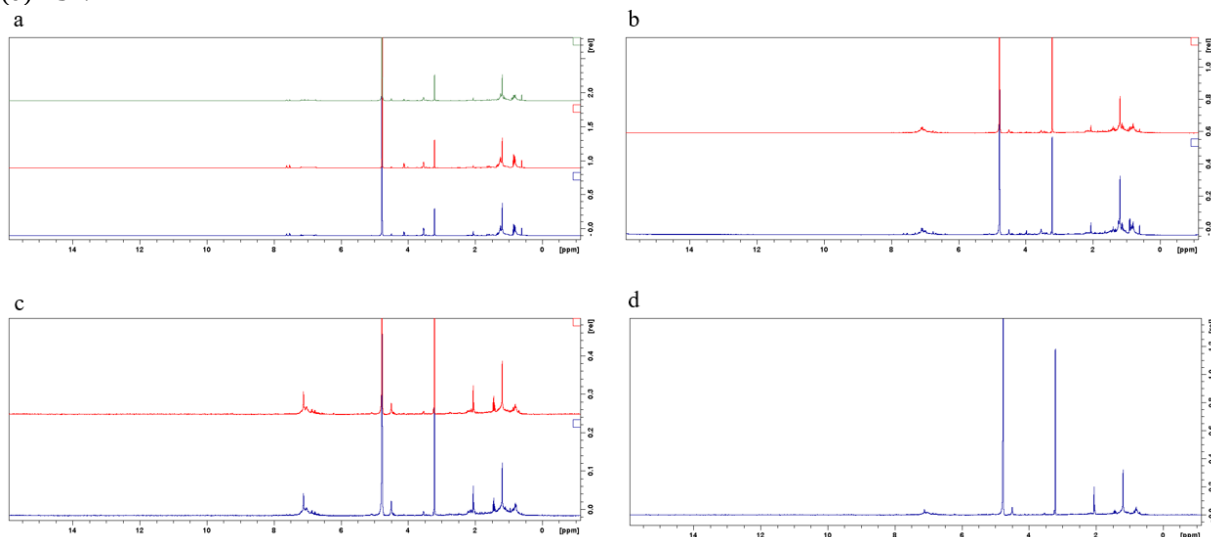


Figura 16. Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, metanol- d_4) das subfrações: (a) B32 (em azul), B33 (em vermelho), B34 (em verde escuro), B35 (em violeta), B36 (em amarelo), B37 (em preto), B38 (em verde claro) e B39 (em rosa); (b) B41.

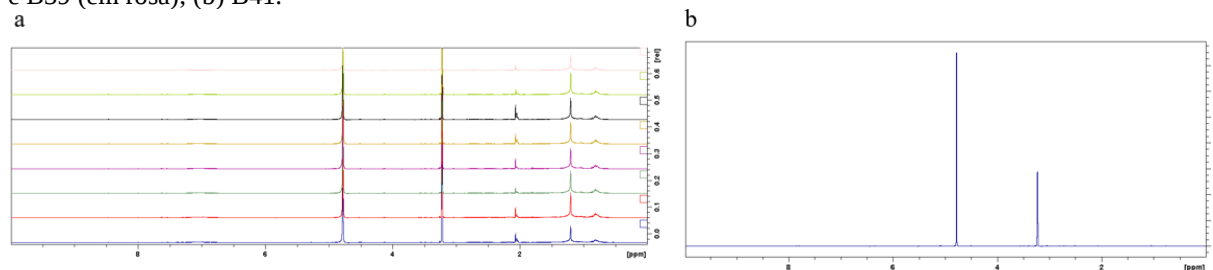
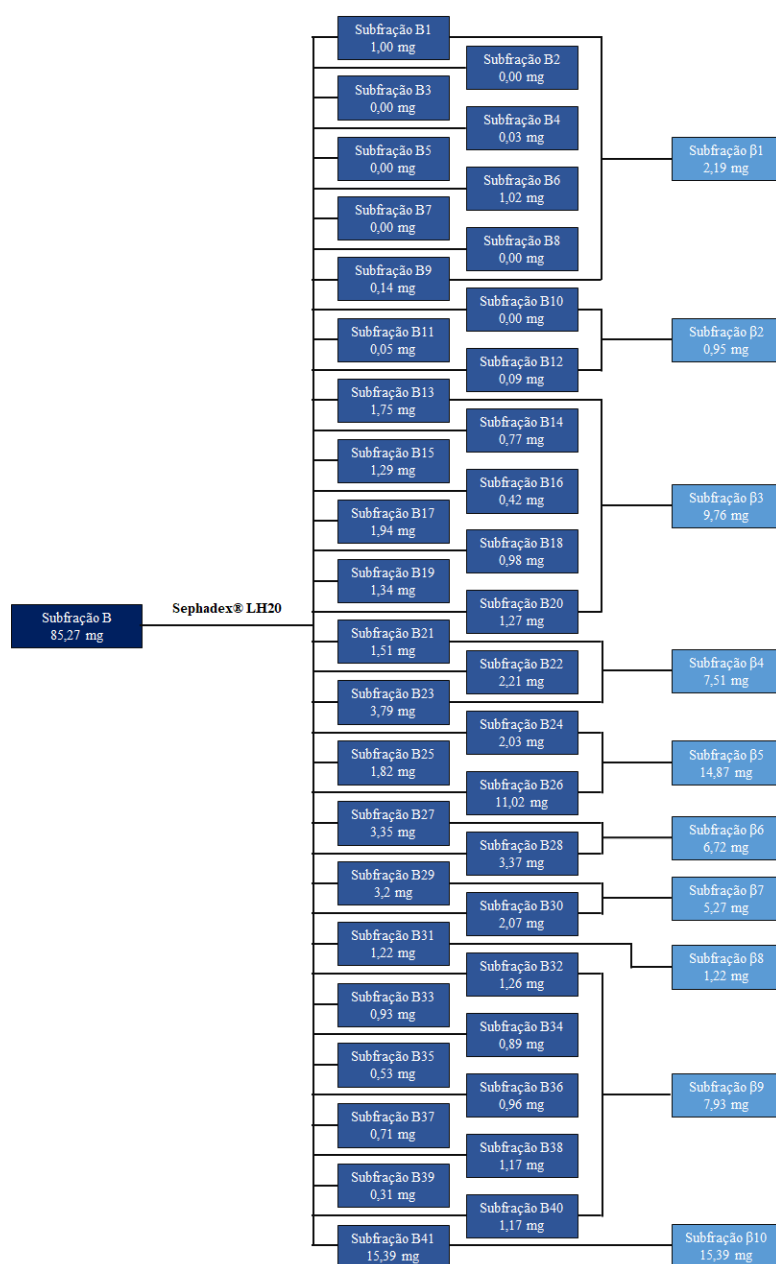


Figura 17. Fluxograma de fracionamento da subfração B, subfrações obtidas e respectivas massas.



4.11 Fracionamento da subfração C

Foram coletadas nesse procedimento 40 subfrações de 5 mL cada. Após a análise dos perfis químicos obtidos por RMN de ^1H (Figuras 18 a 20), as subfrações foram assim reunidas conforme descrito na Figura 21.

As subfrações $\delta 3$, $\delta 5$ e $\delta 7$ apresentaram pureza espectral. Apenas com a análise do RMN de ^1H da substância $\delta 7$ foi possível sua identificação como sendo 5-hidroximetilfurfural (Figura 22). Também foi possível identificar $\delta 5$ como pertencente à classe das dicetopiperazinas. A caracterização da estrutura química de $\delta 3$ está sob investigação.

Figura 18. Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, metanol- d_4) das subfrações: (a) C1 (em azul), C3 (em vermelho), C5 (em verde escuro), C7 (em violeta), C9 (em amarelo), C11(em preto), C13 (em verde claro) e C14 (em rosa); (b) C15 (em azul), C16 (em vermelho), C17 (em verde escuro), C18 (em violeta), C19 (em amarelo) e C20 (em preto); (c) C21 (em azul) e C22 (em vermelho); (d) C23.

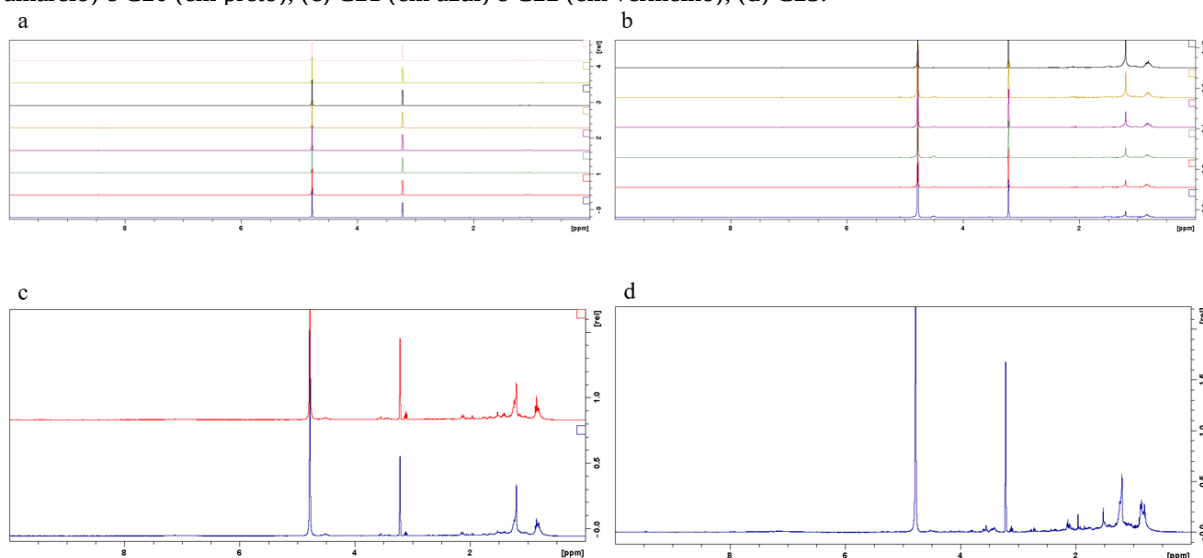


Figura 19. Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, metanol- d_4) das subfrações: (a) C24 (em azul), C25 (em vermelho) e C26 (em verde); (b) C27; (c) C28 (em azul) e C29 (em vermelho); (d) C30.

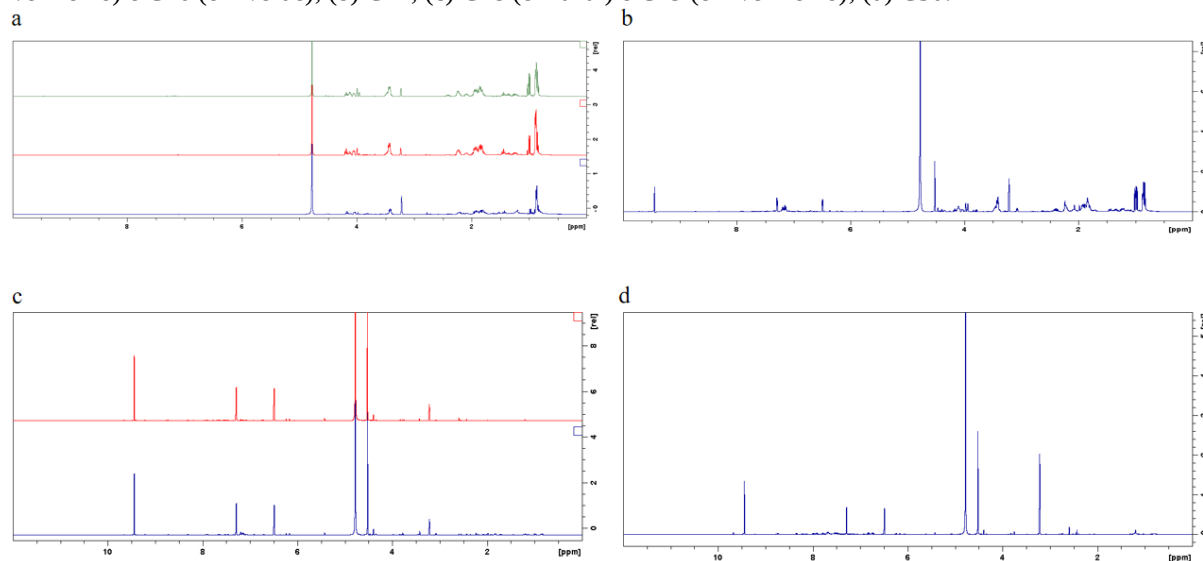


Figura 20. Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, metanol- d_4) das subfrações: (a) C31 (em azul), C32 (em vermelho), C33 (em verde escuro), C34 (em violeta) e C35 (em amarelo); (b) C37 (em azul) e C39 (em vermelho).

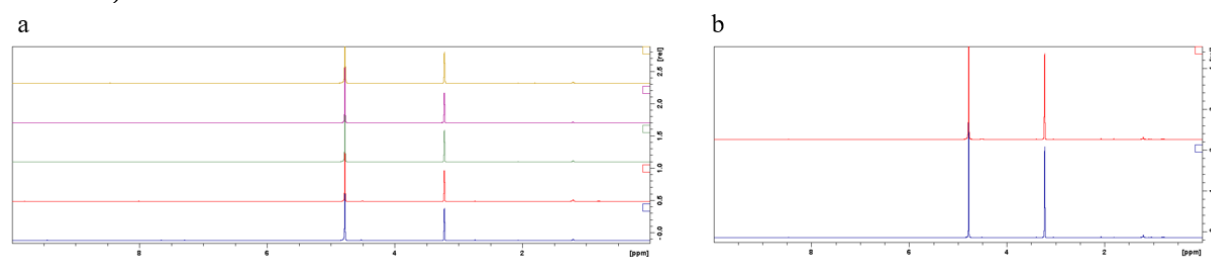


Figura 21. Fluxograma de fracionamento da subfração C, subfrações obtidas e respectivas massas.

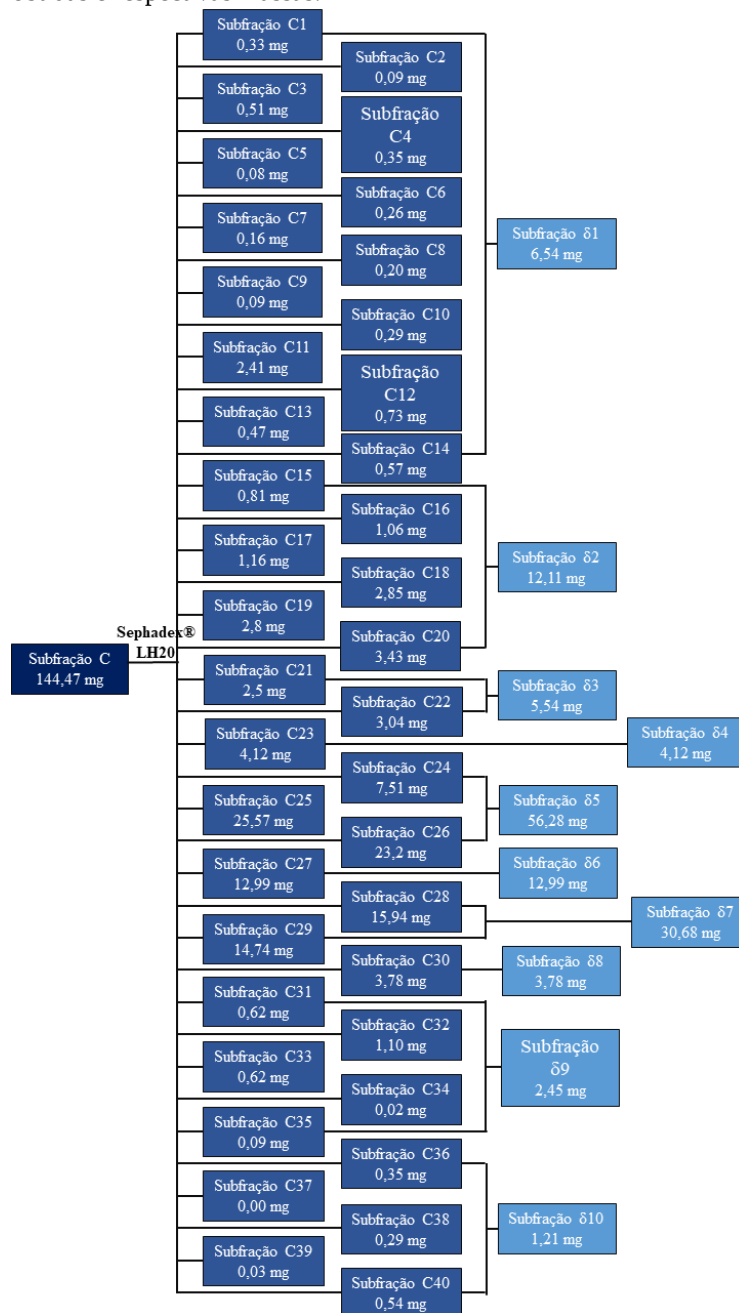
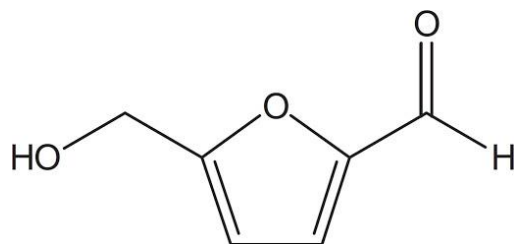


Figura 22. Estrutura molecular do 5-hidroximetilfurfural (MELO et al., 2016)



4.12 Ensaios biológicos com as subfrações $\delta 5$ e $\delta 7$ (5-hidroximetilfurfural)

Em todos os dias de incubação, *Escovopsis* sp. LESF 315 cresceu significativamente mais na presença de ambas as subfrações, do que nos dois controles (Mann-Whitney, $P < 0,05$, Figura 23, Tabela 5). Tal diferença de crescimento foi, em média, 2,07 e 2,34 vezes maior na presença da subfração $\delta 5$ e $\delta 7$, respectivamente, em comparação com o controle negativo (somente meio PDA).

No terceiro dia de incubação de *Escovopsis* sp. LESF 315, além do maior crescimento observado em todas as placas contendo as subfrações, uma das unidades experimentais chamou a atenção (Figura 24). Nela foi possível observar com clareza a orientação do parasita no sentido da alíquota da subfração $\delta 7$. O mesmo não foi observado para a subfração $\delta 5$. Ainda no terceiro dia de incubação, observamos diferença significativa entre os controles (Mann-Whitney, $P < 0,05$, Tabela 5). *Escovopsis* sp. LESF 315 cresceu mais no controle negativo (somente meio PDA), do que no controle positivo (Tabela 5), sugerindo que o metanol inibiu o crescimento do fungo.

Tabela 5. Crescimento micelial de *Escovopsis* sp. LESF 315 (média $\pm$ erro padrão, em cm^2) na presença das subfrações $\delta 5$ e $\delta 7$ e também nos controles positivo (solvente) e negativo (somente meio PDA). Letras distintas nas colunas indicam diferenças significativas (Mann-Whitney, $P < 0,05$).

Dias de crescimento de <i>Escovopsis</i>				
Tratamento	1	2	3	4
$\delta 5$	2,88 $\pm$ 0,20 a	12,21 $\pm$ 0,96 a	37,93 $\pm$ 1,27 a	54,74 $\pm$ 1,48 a
$\delta 7$	2,98 $\pm$ 0,31 ac	14,89 $\pm$ 2,01 a	46,50 $\pm$ 1,94 b	55,61 $\pm$ 1,13 a
C+	1,64 $\pm$ 0,11 b	5,45 $\pm$ 0,40 b	10,85 $\pm$ 0,51 c	15,02 $\pm$ 1,07 b
C-	1,98 $\pm$ 0,15 bc	6,94 $\pm$ 0,93 b	14,92 $\pm$ 1,28 d	21,64 $\pm$ 1,86 b

Figura 23. Crescimento micelial de *Escovopsis* sp. LESF 315 no terceiro dia de incubação no (a) controle positivo (solvente); (b) no controle negativo (somente meio PDA); na presença das subfrações (c) $\delta 5$ e (d) $\delta 7$.

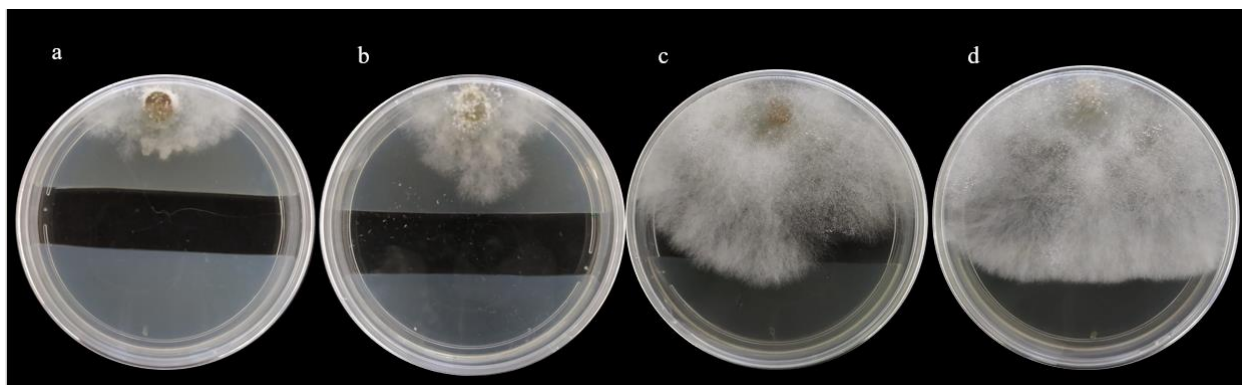
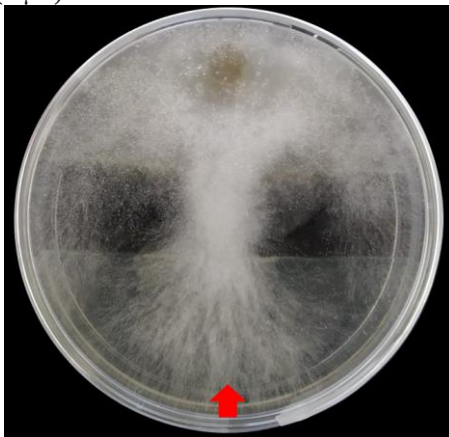


Figura 24. Crescimento micelial de *Escovopsis* sp. LESF 315 orientado para a subfração 87 (5-hidroximetilfurfural) no terceiro dia de incubação. A seta em vermelho indica a localização da alíquota (2 μ L).



5 DISCUSSÃO

Utilizando uma abordagem integrada de química de produtos naturais e biomonitoramento, demonstramos que tanto metabólitos solúveis presentes nos filtrados, quanto metabólitos voláteis liberados pelo fungo mutualista das formigas atíneas, estimulam o crescimento de *Escovopsis* sp. Estudos prévios relataram o fenômeno de crescimento maximizado do parasita na presença do fungo cultivado pelas atíneas, porém não haviam descrito a natureza dessa interação (FOLGARAIT; MARFETÁN; CAFARO, 2011; GERARDO et al., 2006). Nossos resultados também permitiram entender que os fungos mutualistas avaliados produzem uma variedade de metabólitos envolvidos nessa resposta, dentre eles, o 5-hidroximetilfurfural e duas dicetopiperazinas (obtidos especificamente de *Leucoagaricus* sp. AR04). A antiga história evolutiva de *Escovopsis* sp. e o fungo cultivado pelas formigas atíneas possivelmente levou à diferentes mecanismos de interação entre esses micro-organismos. Um deles, certamente, é o reconhecimento dos compostos produzidos pelos fungos mutualistas por *Escovopsis* sp.

O parasita respondeu aos metabólitos produzidos pelos fungos mutualistas na maioria dos experimentos, maximizando o crescimento. Além disso, *Escovopsis* sp. LESF 315 orientou o crescimento em direção aos compostos de interesse, como observado nos experimentos de “chance de escolha” e frente à alíquota de 5-hidroximetilfurfural. O fenômeno de atração frente a um hospedeiro foi observado em diversos sistemas biológicos, por exemplo, bactérias parasitas do gênero *Pseudomonas* são atraídas aos seus fungos hospedeiros (*Globisporangium debaryanum*), via substâncias liberadas pelos mesmos (CHET; FOGEL; MITCHELL, 1971). Semelhantemente, o nematoide *Meloidogyne incognita* é também atraído por quimiotaxia às raízes de plantas hospedeiras (ZUCKERMAN; JANSSON, 1984). Portanto, os resultados obtidos no presente estudo sugerem que os metabólitos produzidos pelos fungos mutualistas realmente medeiam a interação com *Escovopsis* sp., sendo que há um reconhecimento deles por parte do fungo parasita. É possível que esses compostos também sejam responsáveis por influenciar a esporulação de *Escovopsis* sp. Conforme sugerido por Folgarait e colaboradores (2011), *Escovopsis weberi* apresenta uma esporulação vigorosa na presença de *Leucoagaricus* sp. Tal fenômeno também pode estar relacionado com os compostos que maximizam o crescimento do parasita. Entretanto, no presente trabalho, a esporulação não foi um critério analisado para *Escovopsis* sp.

A maximização do crescimento de *Escovopsis* sp. LESF 315 aparentemente não depende do dia e da concentração dos metabólitos produzidos pelos fungos mutualistas. O fato

de observarmos um maior crescimento nos filtrados obtidos já nos primeiros dias de cultivo dos fungos mutualistas, poderia sugerir a presença de subprodutos do metabolismo primário influenciando a interação (FREIRE, 2007). No entanto, as curvas de crescimento dos três fungos mutualistas sinalizam um crescimento acelerado e contínuo em determinados dias de cultivo (trofofase), seguido de uma fase estacionária ou de pouco crescimento (idiofase; ZHILIN; CHUAN-CHAO; LIAN-QING, 2007). Tal padrão de crescimento e o fato de encontrarmos essas substâncias nas diferentes fases da curva também sugerem a presença de metabólitos secundários (FREIRE 2007). De fato, esse é o caso das dicetopiperazinas isoladas no presente trabalho e também encontradas em fungos mutualistas das atíneas basais (WANG; MUELLER; CLARDY, 1998) e consideradas metabólitos secundários.

Respostas de crescimento maximizado de *Escovopsis* sp. LESF 315 foram observadas com maior frequência nos experimentos realizados com filtrados na concentração 1:10. Entretanto, também observamos inibição do crescimento desse parasita na presença dos filtrados, em ambas as concentrações. A inibição mais expressiva foi a que ocorreu com o isolado *Escovopsis* sp. LESF 055, pois este foi inibido já no primeiro dia de incubação na presença do filtrado de *Leucoagaricus* sp. IJ2016 (filtrado obtido com 14 dias de cultivo, Tabela A3). Nesse experimento, a colônia de *Escovopsis* sp. LESF 055 apresentou um crescimento 21,05 vezes menor do que no experimento controle. É sabido que metabólitos podem estimular ou inibir o crescimento de outros organismos, dependendo da concentração (CALABRESE; BRAIN, 2005). Além disso, em fungos, há também o fator sensibilidade (FRIES, 1973). Algumas substâncias, como o etanol, por exemplo, quando em pequenas concentrações, aumenta a eficiência de utilização da glicose em determinados fungos, auxiliando no crescimento. Já em concentrações elevadas o etanol ocasiona a morte desses micro-organismos (WEINHOLD, GARRAWAY, 1966; FRIES, 1973). Outro exemplo são os antibióticos que, em elevada concentração, inibem o crescimento de alguns micro-organismos (DAVIES, 2006); entretanto, em baixas concentrações, podem estimular o crescimento bacteriano ou atuarem como agentes de sinalização química (*quorum sensing*), especialmente entre bactérias (DAVIES, 2006). Nesse contexto, é possível que as respostas de crescimento maximizado de *Escovopsis* sp. LESF 315 na presença dos filtrados com a concentração 1:10 (menor concentração utilizada nesse estudo) possam estar relacionadas à essa propriedade dos metabólitos. Entretanto, para que isso seja investigado é necessário conhecer os compostos presentes nos filtrados (atividade parcialmente alcançada nesse estudo) e avaliar se existe uma influência entre concentração dos metabólitos e a resposta no desenvolvimento do parasita.

As subfrações $\delta 3$ e $\delta 5$ foram identificadas como pertencentes à classe das dicetopiperazinas. Na literatura há diversas atividades biológicas descritas para essas substâncias, entretanto, a propriedade antifúngica é a mais conhecida. No geral, são mais de 40 substâncias dicetopiperazínicas listadas como metabólitos de fungos (COLLADO; GARCIA-PAJÓN, 2003). Dentre os fungos produtores encontram-se, vários basidiomicetos, incluindo o próprio fungo cultivado pelas atíneas (WANG; MUELLER; CLARDY, 1998). Esses autores relataram ter encontrado no fungo mutualista de *Cyphomyrmex minutus*, até então denominado *Tyridiomicetes formicarium*, várias dicetopiperazinas. Foi sugerido que a produção dessas moléculas poderia estar relacionada à defesa contra micro-organismos invasores do jardim de fungo ou contra patógenos do próprio fungo mutualista. Embora não é sabida a real função das dicetopiperazinas no jardim de fungo, aqui, demonstramos que $\delta 5$ é uma das substâncias envolvidas na resposta de maior crescimento de *Escovopsis* sp. LESF 315. É possível que tal dicetopiperazina (e a outra presente no filtrado, mas ainda não caracterizada) seja um antifúngico sinalizador, aos moldes dos antibióticos, quando em baixas concentrações (DAVIES, 2006). Estudos adicionais são necessários para entender o papel dessa classe de composto na interação *Escovopsis*-fungo mutualista.

Compostos voláteis envolvidos em interações químicas entre micro-organismos podem apresentar diversas funções. Bennet e colaboradores (2012) sugeriram a possibilidade de compostos voláteis atuarem como sinalizadores na comunicação entre micro-organismos. Fries (1973) relatou diversos compostos, como os acetaldeídos (BURGUE, 1971), capazes de estimular o crescimento de fungos. No sistema das atíneas derivadas, a comunicação do fungo mutualista com *Escovopsis* sp. LESF 315 acontece, em parte, por compostos voláteis. A dicetopiperazina da subfração $\delta 5$ e o 5-hidroximetilfurfural, obtidas das subfrações dos filtrados de *Leucoagaricus* sp. AR04, estimularam o crescimento de *Escovopsis* sp. LESF 315 por volatilidade. No entanto, não sabemos se essas substâncias foram as mesmas produzidas por esse e os demais fungos mutualistas avaliados no primeiro ensaio de volatilidade (Figura 8). Todavia, é evidente que tanto compostos solúveis da fração orgânica de *Leucoagaricus* sp. AR04, quanto compostos voláteis proporcionam o aumento no crescimento de *Escovopsis* sp. LESF 315.

Fries (1973) sugere possíveis formas pelas quais esse efeito positivo dos VOCs no crescimento fúngico pode ocorrer. Segundo esse autor, é possível que os VOCs atuem no metabolismo intermediário desses micro-organismos, (i) ativando ou bloqueando atividades enzimáticas; (ii) removendo ou neutralizando um inibidor; (iii) influenciando a captura de

nutrientes do meio; (iv) alterando as estruturas da membrana; (vi) substituindo um fator limitante no metabolismo intermediário, entre outros motivos. No entanto, os motivos e os mecanismos moleculares que *Escovopsis* sp. utiliza como resposta à presença dos metabólitos ainda carecem de investigação.

6 CONSIDERAÇÕES

Demonstramos que a interação *Escovopsis*-fungo mutualista é mediada por compostos químicos solúveis e voláteis. Além disso, identificamos uma substância da classe das dicetopiperazinas e 5-hidroximetilfurfural, obtidas de *Leucoagaricus* sp. AR04, envolvidas na promoção do crescimento de *Escovopsis* sp. LESF 315. Nossos resultados sugerem que outras substâncias presentes nos filtrados dos três fungos mutualistas avaliados também podem estar envolvidas no fenômeno de maximização do crescimento do parasita. Tal diversidade química com efeito em *Escovopsis* sp. pode ser resultante da antiga história evolutiva entre o fungo mutualista e o parasita. Nosso estudo descobriu apenas algumas, das várias substâncias envolvidas nessa complexa interação entre fungos. Os resultados aqui apresentados são inéditos quanto à biologia dos fungos mutualistas citados e a interação destes com o parasita *Escovopsis* sp.

REFERÊNCIAS

- ABRÀMOFF, M. D.; MAGALHÃES, P. J.; RAM, S. J. Image processing with ImageJ. **Biophotonics International**, v. 11, n. 7, p. 36-42, 2004.
- ANGELI-PAPA, J. La culture d'un champignon par les fourmis attinis: mise en évidence des phénomènes d'antibiose dans le nid. **Cryptogamie Mycologie**, v. 5, [s/n], p. 147-154, 1984.
- AYWARD, F. O.; BURNUM-JOHNSON, K. E.; TRINGE, S. G.; TEILING, C.; TREMMEL, D. M.; MOELLER, J. A.; SCOTT, J. J.; BARRY, K. W.; PIEHOWSKI, P. D.; NICORA, C. D.; MALFATTI, S. A.; MONROE, M. E.; PURVINE, S. O.; GOODWIN, L. A.; SMITH, R. D.; WEINSTOCK, G. M.; GERARDO, N. M.; SUEN, G.; LIPTON, M. S.; CURRIE, C. R. *Leucoagaricus gongylophorus* produces diverse enzymes for the degradation of recalcitrant plant polymers in leaf-cutter ant fungus gardens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 12, p. 3770-3778, 2013.
- BENNETT, J. W.; HUNG, R.; LEE, S.; PADHI, S. Fungal and bacterial volatile organic compounds: an overview and their role as ecological signaling agents, in: Hock, B. (Ed.), **The Mycota IX, Fungal Association**, 2 edn., p. 373-393, 2012.
- BOYA, P. C.; FERNANDEZ-MARIN, H.; MEJIA, L. C.; SPADAFORA, C.; DORRESTEIN, P. C.; GUTIERREZ, M. Imaging mass spectrometry and MS/MS molecular networking reveals chemical interactions among cuticular bacteria and pathogenic fungi associated with fungus-growing ants. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 5604, 2017.
- BRANSTETTER, M. G.; JEŠOVNIK, A.; SOSA-CALVO, J.; LLOYD, M. W.; FAIRCLOTH, B. C.; BRADY, S. G.; SCHULTZ, T. R. Dry habitats were crucibles of domestication in the evolution of agriculture in ants. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 284, n. 1852, 2017.
- BURGE, W. D. Anaerobic decomposition of DDT in soil. Acceleration by volatile components of Alfalfa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 19, n. 2, p. 375-378, 1971.
- CALABRESE, E. J.; BLAIN, R. The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the hormesis database: an overview. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 202, [s/n], p. 289-301, 2005.
- COLLADO, I. G.; GARCIA-PAJÓN, C. M. Secondary metabolites isolated from *Colletotrichum* species, **Natural Products Report**, v. 20, n. 4, p. 246, 2003.
- CHAPELA, I. H.; REHNER, S. A.; SCHULTZ, T. R.; MULLER, U. G. Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. **Science**, v. 266, n. 5191, p. 1691-1694, 1994.
- CHET, I.; BAKER, R. Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive of *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, v. 71, [s/n], p. 286-290, 1981.
- CHET, I.; FOGEL, S.; MITCHELL, R. Chemical detection of microbial prey by bacterial. **Journal of Bacteriology**, v. 106, n. 3, p. 863-867, 1971.
- CHET, I.; BENHAMOU, S. H. Mycoparasitism and lectin enzymes. In: *Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial*, **Protección Vegetal**, v. 24, n. 1, 2009. 21 applications. HARMAN, G. E.; KUBICE, C. P. Ed. 2, v. 2, p. 153-152. Taylor & Francis Ltd., 1998.
- CURRIE, C. R.; WONG, B.; STUART, A. E.; SCHULTZ, T. R.; REHNER, S. A.; MUELLER, U. G.; SUNG, GI-HO; SPADAFORA, W. J.; STRAUS, A. N. Ancient Tripartite Coevolution in the Attine Ant-Microbe Symbiosis. **Science**, v. 299, n. 5605, p. 386-388, 2003.
- CURRIE, C. R. Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. **Oecologia**, Berlin, v. 128, [s/n], p. 99-106, 2001.
- CURRIE, C. R.; SCOTT, J. A.; SUMMERBELL, R. C.; MALLOCH, D. Fungus-growing ants use antibiotic producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, v. 398, n. 6729, p. 701, 1999a.
- CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 96, n. 14, p. 7998-8002, 1999b.
- DAVIES, J. Are antibiotics naturally antibiotics? **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 7, p. 496-499, 2006.
- DE FINE LICHT, H. H.; BOOMSMA, J. J. Forage collection, substrate preparation, and diet composition in fungus-growing ants. **Ecological Entomology**, v. 35, n. 3, p. 259-269, 2010.

DELLA LUCIA, T. M. C.; GANDRA, L. C.; GUEDES, R., N. C. M. Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. **Pest Management Science**, v. 70, n. 1, p. 14-23, 2014.

DHODARY, B.; SCHILG, M.; WIRTH, R.; SPITELLER, D. S. Secondary metabolites from *Escovopsis weberi* and their role in attacking the garden fungus of leaf cutting ants. **Chemistry - a European Journal**, v. 24, n. 17, p. 4445-4452, 2018.

FOLGARAIT, P. J.; MARFETÁN, J. A.; CAFARO, M. J. Growth and conidiation response of *Escovopsis weberi* (Ascomycota: Hypocreales) against the fungal cultivar of *Acromyrmex lundii* (Hymenoptera: Formicidae). **Environmental Entomology**, v. 40, n. 2, p. 342-349, 2011.

FREIRE, F. C. O. **Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007.

FRIES, N. Effects of volatile organic compounds on the growth and development of fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 60, n. 1, p. 1-21, 1973.

GERARDO, N. M.; JACOBS, S. R.; CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G. Ancient host-pathogen associations maintained by specificity of chemotaxis and antibiosis. **PLoS Biology**, v. 4, n. 8, p. 1358-1363, 2006.

HEINE, D.; HOLMES, N. A.; WORSLEY, S. F.; SANTOS, A. C. A.; INONOCENT, T. M.; SCHERLACH, K.; PATRICK, E. H.; YU, D. W.; MURRELL, C.; VIEIRA, P. C.; BOOMSMA, J. J.; HERTWECK, C.; HUTCHINGS, M. I.; WILKINSON, B. Chemical warfare between leafcutter ant symbionts and a co-evolved pathogen, **Nature Communications**, v. 9, n. 2208, p. 1-11, 2018.

HERVEY, A.; NAIR, R. S. M. Antibiotic metabolite of a fungus cultivated by gardening ants. **Mycologia**, v. 71, n. 5, p. 1064-1066, 1979.

HUFF, T., KUBALL, H. G.; ANKE, T. 7-Chloro-4,6-dimethoxy-1(3H)-isobenzofuranone and basidalin: antibiotic secondary metabolites from *Leucoagaricus carneifolia* Gillet (basidiomycetes). **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 49, n.7-8, p. 407-410, 1994.

JEŠOVNIK, A.; GONZÁLEZ, V. L.; SCHULTZ, T. R. Phylogenomics and divergence dating of fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae) of the genera *Sericomyrmex* and *Apterostigma*. **PloS One**, v. 11, n. 7, e 0151059, 2016.

KARAMAN, I.; ŞAHİN, F.; GÜLLÜCE, M.; ÖĞÜTÇÜ, H.; ŞENGÜL, M.; ADIGÜZEL, A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus*, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, n. 2-3, p. 231-235, 2003.

MEHDIABADI, N. J.; SHULTZ, T. R. Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants. **Myrmecological News**, v. 13, [s.n.], p. 37-55, 2010.

MELO, F. C.; SOUZA, R. F.; COUTINHO, P. A. L.; SOUZA, M. O. Synthesis of 5-Hydroxymethylfurfural from dehydration of fructose and glucose using ionic liquids. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 12, p. 2378-2384, 2014.

MODY, J. O.; ADEBIYI, O. A.; ADENIYI, B. A. Do *Aloe vera* and *Ageratum conyzoides* enhance the anti-microbial activity of traditional medicinal soft soaps (Osedudu)? **Journal Ethnopharmacology**, n. 92, [s/n], p. 57-60, 2004.

MUELLER, U. G.; KARDISH, M. R.; ISHAK, H. D.; WRIGHT, A. M.; SOLOMON, S. E.; BRUSCHI, S. M.; CARLSON, A. L.; BACCI JR., M. Phylogenetic patterns of ant-fungus associations indicate that farming strategies, not only a superior fungal cultivar, explain the ecological success of leafcutter ants. **Molecular Ecology**, v. 2018, n. 27, p. 2414-2434, 2018.

MULLER, U. G.; ISHAK, H. D.; BRUSCHI, S. M.; SMITH, C. C.; HERMAN, J. J.; SOLOMON, S. E.; MIKHEYEV, A. S.; RABELING, C.; SCOTT, J. J.; COOPER, M.; RODRIGUES, A.; ORTIZ, A.; BRANDÃO, C. R. F.; LATTKE, J. E.; PAGNOCCA, F. C.; REHNER, S. A.; SCHULTZ, T. R.; VASCONCELOS, H. L.; ADAMS, R. M. M.; BOLLAZZI, M. CLARK, R. M.; HIMLER, A. G.; LAPOLLA, J. J.; LEAL, I. R.; JOHNSON, R. A.; ROCES, F. SOSA-CALVO, J.; WIRTH, R.; BACCI, M. Jr. Biogeography of mutualistic fungi cultivated by leafcutter ants. **Molecular Ecology**, v. 26, n. 24, p. 6921-6937, 2017.

NEUMEYER, D. Filtering small quantities of conidial suspensions to remove mycelial fragments. **Fungal Genetics Newsletter**, v.37, [s.n.], p. 1-27, 1990.

OSTROSKY, A. E.; MIZUMOTO, K. M.; LIMA, L. E. M.; KANEKO, M. T.; SUZANA O. NISHIKAWA, O. S.; FREITAS, R. B. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

- PAGNOCCA, F. C.; MASIULIONIS, E. V.; RODRIGUES, A. Specilized fungal parasites and opportunistic fungi in gardens of attine ants. **Psyche**, v. 2012, [s/n], p. 1-9, 2012.
- PAGNOCCA, F. C.; SILVA, O. A.; HEBLING-BERALDO, M. J.; BUENO, O.C.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. Toxicity of sesame extracts to the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. **Bulletin of Entomological Research**, v. 80, [s/n], p. 349-352, 1990.
- SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G. Major evololutionary transitions in ant agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 105, n. 14, p. 5435-5440, 2008.
- SCHULTZ, T. R., MUELLER, U. G., CURRIE, C. R., REHNER, S. A. Reciprocal illumination: a comparison of agriculture in humans and ants. In: VEGA, F., BLACKWELL, M. (Eds.): Ecological and evolutionary advances in insect-fungal associations. **Oxford University Press**, p. 149-190, 2005.
- SEN, R.; ISHAK, H. D.; ESTRADA, D., DOWD, S. E.; HONG, E.; MUELLER, U. G. Generalized antifungal activity and 454-screening of *Pseudonocardia* and *Amycolatopsis* bacteria in nests of fungus-growing ants. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 106, n. 42, p. 17805-17810, 2009.
- SILVA-PINHATI, A. O. C.; BACCI JR., M.; SIQUEIRA, C. G.; SILVA, A.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. A. J. Isolation and maintenance of symbiotic fungi of ants in the tribe Attini (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical Entomology**, v.34, n. 1, p. 1-5, 2005.
- STAUB, G. M., GLOER, K. B., GLOER, J. B., WICKLOW, D. T.; DOWD, P. F. New paspalinine derivatives with antiinsect an activity from the sclerotia of *Aspergillus nomius*. **Tetrahedron Letters**, v. 34, n. 16, p. 2569-2572, 1993.
- STROBEL, G. A.; DIRKSE, E. SEARS, J.; MARKWORTH, C. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, v. 147, p. 2943–2950, 2001.
- WANG, Y.; MUELLER, U. G.; CLARDY, J. Antifungal diketopiperazines from symbiotic fungus of fungus-growing ant *Cyphomyrmex minutus*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, n. 4, p. 935-941, 1998.
- WEBER, N. A. The fungus-culturing behavior of ants. **American Zoologist**, v. 12, n. 3, p. 577-587, 1972.
- WEINHOLD, A. R.; GARRAWAY, M. O. Nitrogen and carbon nutrition of *Armillaria mellea* in relation to growth-promoting effects of ethanol. **Phytopathology**, v. 56, n. 1, p. 108-112, 1966.
- WHITTAKER, R. H.; FEENY, P. P. Allelochemicals: chemical interactions between species. chemical agents are of major significance in the adaptation of species and organization of communities. **Science, New Series**, v. 171, n. 3973, p. 757-770, 1971.
- ZHI-LIN, Y.; CHUAN-CHAO, D.; LIAN-QUING, C. Regulation and accumulation of secondary metabolites in plant-fungus symbiotic system. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 11, p. 1266-1271, 2007.
- ZUCKERMAN, B. M.; JANSSON, H. B. Nematode chemotaxis and possible mechanisms of host/prey recognition. **Annual Review of Phytopathology**, v. 22, [s/n], p. 95-113, 1984.

ANEXO

Tabela A1. Área de crescimento micelial (média $\pm$ erro padrão, em cm²) de diferentes isolados de *Escovopsis* sp. na ausência (A) e presença (P) do filtrado de cultivo de *Leucoagaricus* sp. AR04. Os valores destacados em negrito representam diferenças significativas entre A e P (Mann-Whitney, $P < 0,05$).

<i>Escovopsis</i>	Tratamento	Dias de crescimento							
		1	2	3	4	5	7	10	14
LESF 037	A	4,32 $\pm$ 0,48	8,47$\pm$0,72	11,91$\pm$1,07	20,19$\pm$1,00	25,96$\pm$0,69	45,73$\pm$3,58	47,94$\pm$3,23	52,35$\pm$2,13
	P	10,31 $\pm$ 2,74	50,26$\pm$3,43	58,12$\pm$0,00	58,12$\pm$0,00	58,12$\pm$0,00	58,12$\pm$0,00	58,12$\pm$0,00	58,12$\pm$0,00
	¹ PC		5,93	4,87	2,88	2,24	1,27	1,21	1,11
LESF 046	A	2,17 $\pm$ 0,66	18,06$\pm$2,98	34,39 $\pm$ 5,75	57,48 $\pm$ 0,59	57,48 $\pm$ 0,59	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00
	P	0,86 $\pm$ 0,02	6,33$\pm$2,83	36,82 $\pm$ 3,50	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00
	PC		- 2,85						
LESF 050	A	0,85$\pm$0,04	5,24 $\pm$ 1,59	13,36$\pm$4,50	25,02$\pm$6,79	27,99$\pm$5,81	35,68$\pm$6,01	38,91$\pm$6,36	50,20 $\pm$ 7,31
	P	4,95$\pm$0,98	18,48 $\pm$ 8,71	53,10$\pm$0,00	58,12$\pm$0,00	58,12$\pm$0,00	58,12$\pm$0,00	58,12$\pm$0,00	58,12 $\pm$ 0,00
	PC	5,82		3,97	2,32	2,08	1,63	1,49	
LESF 055	A	6,89$\pm$0,56	28,44$\pm$1,30	32,01$\pm$1,50	37,07$\pm$3,02	37,75$\pm$3,39	40,94$\pm$4,80	50,35$\pm$2,50	53,19$\pm$1,69
	P	20,89$\pm$0,85	55,66$\pm$0,58	58,12$\pm$0,00	58,12$\pm$0,00	58,12$\pm$0,00	58,12$\pm$0,00	58,12$\pm$0,00	58,12$\pm$0,00
	PC	3,03	1,96	1,81	1,57	1,54	1,42	1,54	1,09
LESF 315	A	3,56$\pm$0,42	24,84$\pm$1,59	50,93$\pm$1,06	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00
	P	12,12$\pm$1,24	56,53$\pm$0,91	58,12$\pm$0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00
	PC	3,40	2,27	1,14					
LESF 324	A	0,54$\pm$0,01	7,59$\pm$0,71	21,55$\pm$1,81	46,14$\pm$3,56	51,86$\pm$3,54	53,25$\pm$3,43	56,76 $\pm$ 1,26	58,12 $\pm$ 0,00
	P	1,21$\pm$0,19	20,02$\pm$1,43	51,44$\pm$1,83	58,12$\pm$0,00	58,12$\pm$0,00	58,12$\pm$0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00
	PC	2,24	2,64	2,39	1,26	1,12	1,09		

¹PC: Proporção de crescimento de *Escovopsis* sp. Valores negativos significam que *Escovopsis* sp. cresceu mais na ausência do filtrado, do que na presença desse.

Tabela A2. Área de crescimento micelial (média $\pm$ erro padrão, em cm²) de diferentes isolados de *Escovopsis* sp. na ausência (A) e presença (P) do filtrado de cultivo de *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006. Os valores destacados em negrito representam diferenças significativas entre A e P (Mann-Whitney, $P < 0,05$).

<i>Escovopsis</i>	Tratamento	Dias de crescimento							
		1	2	3	4	5	7	10	14
LESF 037	A	1,75$\pm$0,10	3,46$\pm$0,19	5,55 $\pm$ 0,31	9,16 $\pm$ 0,37	12,65 $\pm$ 0,45	20,38$\pm$0,81	20,51$\pm$0,80	39,56 $\pm$ 3,68
	P	0,58$\pm$0,02	2,03$\pm$0,33	4,44 $\pm$ 0,60	10,11 $\pm$ 1,03	12,38 $\pm$ 1,64	29,42$\pm$1,83	29,72$\pm$1,87	39,56 $\pm$ 3,68
	¹ PC	- 3,02	- 1,70				1,44	1,45	
LESF 046	A	0,62 $\pm$ 0,08	14,17$\pm$1,73	34,34 $\pm$ 4,28	39,56$\pm$3,68	42,88$\pm$3,17	50,62 $\pm$ 3,35	56,61 $\pm$ 1,39	58,12 $\pm$ 0,00
	P	0,69 $\pm$ 0,13	22,79$\pm$2,32	47,05 $\pm$ 6,63	58,12$\pm$0,00	58,12$\pm$0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00
	PC		1,60		1,47	1,35			
LESF 050	A	1,28 $\pm$ 0,30	9,58$\pm$0,80	19,44$\pm$3,43	21,71 $\pm$ 3,45	21,71 $\pm$ 3,45	25,41 $\pm$ 3,05	34,86 $\pm$ 4,18	43,54 $\pm$ 4,47
	P	0,54 $\pm$ 0,02	3,29$\pm$0,34	9,73$\pm$1,19	16,67 $\pm$ 2,11	30,73 $\pm$ 4,07	40,46 $\pm$ 5,42	49,07 $\pm$ 2,80	54,87 $\pm$ 1,77
	PC		- 2,91	- 1,98					
LESF 055	A	1,99$\pm$0,28	5,99 $\pm$ 0,49	13,15$\pm$0,68	20,07$\pm$0,74	27,49$\pm$1,97	43,77$\pm$4,50	52,18 $\pm$ 4,52	58,12 $\pm$ 0,00
	P	0,56$\pm$0,02	4,72 $\pm$ 0,21	27,07$\pm$0,81	44,66$\pm$0,79	51,66$\pm$2,43	55,63$\pm$2,29	56,24 $\pm$ 1,73	57,08 $\pm$ 0,96
	PC	- 3,55		2,06	2,22	1,88	1,27		
LESF 315	A	5,44 $\pm$ 0,56	24,49$\pm$2,53	45,99$\pm$2,81	55,59 $\pm$ 1,15	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00
	P	8,57 $\pm$ 1,09	42,04$\pm$0,97	57,91$\pm$0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00
	PC		1,72	1,26					
LESF 324	A	6,08$\pm$0,82	13,98 $\pm$ 1,48	33,01 $\pm$ 2,16	50,09 $\pm$ 3,00	55,50 $\pm$ 2,06	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00
	P	1,04$\pm$0,18	10,77 $\pm$ 1,84	32,70 $\pm$ 4,27	49,16 $\pm$ 2,04	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00
	PC	- 5,85							

¹PC: Proporção de crescimento de *Escovopsis* sp. Valores negativos significam que *Escovopsis* sp. cresceu mais na ausência do filtrado, do que na presença desse.

Tabela A3. Área de crescimento micelial (média $\pm$ erro padrão, em cm²) de diferentes isolados de *Escovopsis* sp. na ausência (A) e presença (P) do filtrado de cultivo de *Leucoagaricus* sp. IJ2016. Os valores destacados em negrito representam diferenças significativas entre A e P ($P < 0,05$ – Mann-Whitney).

<i>Escovopsis</i>	Tratamento	Dias de crescimento							
		1	2	3	4	5	7	10	14
LESF 037	A	8,66 $\pm$ 1,15	12,55$\pm$1,68	14,16$\pm$1,62	15,81$\pm$1,31	19,00$\pm$0,84	22,44$\pm$0,78	30,09$\pm$1,34	52,56$\pm$2,18
	P	10,83 $\pm$ 1,37	27,83$\pm$2,77	41,27$\pm$3,79	44,04$\pm$4,15	56,62$\pm$0,88	58,12$\pm$0,00	58,12$\pm$0,00	58,12$\pm$0,00
	¹ PC		2,22	2,85	2,78	2,98	2,59	1,93	2,27
LESF 046	A	25,34 $\pm$ 2,33	51,30$\pm$0,52	57,08 $\pm$ 0,96	57,08 $\pm$ 0,96	57,08 $\pm$ 0,96	57,08 $\pm$ 0,96	57,08 $\pm$ 0,96	57,08 $\pm$ 0,96
	P	34,23 $\pm$ 0,51	57,41$\pm$0,65	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00
	PC		1,12						
LESF 050	A	13,33$\pm$1,30	20,55$\pm$2,58	36,34$\pm$2,92	40,82$\pm$2,50	51,35 $\pm$ 2,26	53,38 $\pm$ 1,17	54,44 $\pm$ 0,65	55,55 $\pm$ 0,00
	P	24,57$\pm$2,53	46,51$\pm$2,07	56,35$\pm$1,09	57,58$\pm$0,50	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00
	PC	1,84	2,26	1,55	1,41				
LESF 055	A	11,79$\pm$1,03	24,66$\pm$0,98	29,27 $\pm$ 1,60	33,46 $\pm$ 3,14	42,21 $\pm$ 4,61	44,80 $\pm$ 5,08	49,10 $\pm$ 3,51	58,12 $\pm$ 0,00
	P	0,56$\pm$0,02	4,72$\pm$0,21	27,07 $\pm$ 0,81	44,66 $\pm$ 0,79	54,66 $\pm$ 2,43	55,63 $\pm$ 2,29	56,24 $\pm$ 1,73	57,08 $\pm$ 0,96
	PC	- 21,05	- 5,22						
LESF 315	A	2,41 $\pm$ 0,27	21,21$\pm$1,52	43,27$\pm$2,47	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00
	P	3,48 $\pm$ 0,41	36,87$\pm$0,67	57,27$\pm$0,79	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00
	PC		1,73	1,32					
LESF 324	A	1,57$\pm$0,09	16,10$\pm$1,36	44,59 $\pm$ 0,84	51,47 $\pm$ 1,04	51,60 $\pm$ 1,20	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00
	P	3,69$\pm$0,29	24,00$\pm$0,96	51,72 $\pm$ 1,46	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00
	PC	2,35	1,49						

¹PC: Proporção de crescimento de *Escovopsis* sp. Valores negativos significam que *Escovopsis* sp. cresceu mais na ausência do filtrado, do que na presença desse.

Tabela A4. Área de crescimento micelial (média $\pm$ erro padrão, em cm²) de isolados de *Escovopsis* sp. na ausência (A) e na presença (P) do filtrado de cultivo de *Leucoagaricus* sp. AR04. Os valores destacados em negrito representam diferenças significativas entre A e P (Mann-Whitney, $P < 0,05$).

<i>Escovopsis</i>	Tratamento	Dias de crescimento			
		1	2	3	4
LESF 046	A	21,04$\pm$1,13	40,92$\pm$2,66	56,74 $\pm$ 0,78	57,77 $\pm$ 0,00
	P	31,38$\pm$0,53	56,38$\pm$1,17	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00
¹ PC		1,49	1,38		
LESF 050	A	22,08$\pm$1,17	37,05$\pm$0,60	56,51 $\pm$ 1,64	58,12 $\pm$ 0,00
	P	32,08$\pm$0,42	58,12$\pm$0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00
PC		1,45	1,57		
LESF 315	A	13,01$\pm$0,41	52,08$\pm$0,60	56,53$\pm$0,28	57,04 $\pm$ 0,32
	P	36,59$\pm$0,34	58,12$\pm$0,00	58,12$\pm$0,00	58,12 $\pm$ 0,00
PC		2,81	1,11	1,03	

¹PC: Proporção de crescimento de *Escovopsis* sp.

Tabela A5. Área de crescimento micelial (média $\pm$ erro padrão, em cm²) de isolados de *Escovopsis* sp. na ausência (A) e na presença (P) do filtrado de cultivo de *Leucoagaricus* sp. IJ2016. Os valores destacados em negrito representam diferenças significativas entre A e P (Mann-Whitney, $P < 0,05$).

<i>Escovopsis</i>	Tratamento	Dias de crescimento			
		1	2	3	4
LESF 046	A	21,04$\pm$1,13	40,92$\pm$2,66	56,74 $\pm$ 0,78	57,77 $\pm$ 0,00
	P	46,18$\pm$1,13	58,12$\pm$0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00
¹ PC		2,19	1,42		
LESF 050	A	22,08$\pm$1,17	37,05$\pm$0,60	56,51 $\pm$ 1,64	58,12 $\pm$ 0,00
	P	38,62$\pm$1,33	58,12$\pm$0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00
PC		1,75	1,57		
LESF 315	A	13,01$\pm$0,41	52,08$\pm$0,60	56,53$\pm$0,28	57,04 $\pm$ 0,32
	P	48,63$\pm$0,81	58,12$\pm$0,00	58,12$\pm$0,00	58,12 $\pm$ 0,00
PC		3,74	1,15	1,03	

¹PC: Proporção de crescimento de *Escovopsis* sp.

Tabela A6. Área de crescimento micelial (média $\pm$ erro padrão, em cm²) de isolados de *Escovopsis* sp. na ausência (A) e na presença (P) do filtrado de cultivo de *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006. Os valores destacados em negrito representam diferenças significativas entre A e P (Mann-Whitney, $P < 0,05$).

<i>Escovopsis</i>	Tratamento	Dias de crescimento			
		1	2	3	4
LESF 046	A	21,04$\pm$1,13	40,92$\pm$2,66	56,74 $\pm$ 0,78	57,77 $\pm$ 0,00
	P	8,30$\pm$0,18	55,41$\pm$0,99	57,43 $\pm$ 0,35	58,12 $\pm$ 0,00
	¹ PC	-2,53	1,35		
LESF 050	A	22,08$\pm$1,17	37,05 $\pm$ 0,60	56,51 $\pm$ 1,64	58,12 $\pm$ 0,00
	P	3,24$\pm$0,30	45,41 $\pm$ 0,44	56,38 $\pm$ 0,30	58,12 $\pm$ 0,00
	PC	-6,81			
LESF 315	A	13,01 $\pm$ 0,41	52,08 $\pm$ 0,60	56,53 $\pm$ 0,28	57,04 $\pm$ 0,32
	P	11,51 $\pm$ 0,75	54,88 $\pm$ 0,84	57,74 $\pm$ 0,30	58,12 $\pm$ 0,00
	PC				

¹PC: Proporção de crescimento de *Escovopsis* sp. Valores negativos significam que *Escovopsis* sp. cresceu mais na ausência do filtrado, do que na presença desse.

Tabela A7. Áreas de crescimento micelial (média $\pm$ erro padrão, em cm²) de *Escovopsis* sp. LESF 315 na ausência (A) e na presença (P) dos filtrados de cultivo *Leucoagaricus* sp. AR04, nas concentrações de 1:1 e 1:10. Os valores destacados em negrito representam diferenças significativas entre A e P (Mann-Whitney, $P < 0,05$).

Dias de crescimento de <i>Escovopsis</i>	Tratamento	Filtrados (1:1) obtidos no dia:								
		3	6	9	12	15	18	21	24	27
1	A	16,92$\pm$0,10	16,92$\pm$0,10	16,92$\pm$0,10	16,92$\pm$0,10	16,92$\pm$0,10	16,92$\pm$0,10	16,92$\pm$0,10	16,92$\pm$0,10	16,92$\pm$0,10
	P	11,51$\pm$0,86	09,66$\pm$0,53	12,31$\pm$0,27	9,79$\pm$0,14	25,91$\pm$1,31	18,73$\pm$0,52	31,06$\pm$1,18	25,22$\pm$1,21	21,11$\pm$1,20
2	A	41,13$\pm$0,29	41,13 $\pm$ 0,29	41,13$\pm$0,29	41,13$\pm$0,29	41,13 $\pm$ 0,29	41,13 $\pm$ 0,29	41,13$\pm$0,29	41,13$\pm$0,29	41,13$\pm$0,29
	P	54,88$\pm$0,76	36,67 $\pm$ 3,8	58,12$\pm$0,00	58,12$\pm$0,00	48,42 $\pm$ 2,90	37,08 $\pm$ 1,21	58,12$\pm$0,00	51,66$\pm$1,25	56,44$\pm$0,73
3	A	57,40 $\pm$ 0,32	57,40 $\pm$ 0,32	57,40 $\pm$ 0,32	57,40 $\pm$ 0,32	57,40 $\pm$ 0,32	57,40 $\pm$ 0,32	57,40 $\pm$ 0,32	57,40 $\pm$ 0,32	57,40 $\pm$ 0,32
	P	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	42,42 $\pm$ 7,64	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00
4	A	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00
	P	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	47,02 $\pm$ 7,85	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00	58,12 $\pm$ 0,00

[illegible]

Tabela A9. Áreas de crescimento micelial (média $\pm$ erro padrão, em cm²) de *Escovopsis* sp. LESF 315 na ausência (A) e presença (P) dos filtrados de cultivo de *Leucoagaricus* sp. IJ2016, nas concentrações de 1:1 e 1:10. Os valores destacados em negrito representam diferenças significativas entre A e P (Mann-Whitney, $P < 0,05$).

[illegible]

Dias de crescimento de <i>Escovopsis</i>	Tratamento	Filtrados (1:10) obtidos no dia:								
		3	6	9	12	15	18	21	24	27
1	A	16,67±0,27	16,67±0,27	16,67±0,27	16,67±0,27	16,67±0,27	16,67±0,27	16,67±0,27	16,67±0,27	16,67±0,27
	P	11,23±0,50	8,99±0,25	4,66±0,22	10,02±0,23	5,88±0,17	10,34±0,61	10,57±0,24	4,68±0,24	11,15±0,15
2	A	38,41±0,23	38,41±0,23	38,41±0,23	38,41±0,23	38,41±0,23	38,41±0,23	38,41±0,23	38,41±0,23	38,41±0,23
	P	43,39±0,78	48,50±0,79	46,42±0,62	50,87±0,79	49,24±0,31	45,03±7,16	56,48±0,54	43,26±0,98	50,87±4,12
3	A	54,79±0,42	54,79±0,42	54,79±0,42	54,79±0,42	54,79±0,42	54,79±0,42	54,79±0,42	54,79±0,42	54,79±0,42
	P	55,72±1,04	58,12±0,00	58,12±0,00	58,12±0,00	58,12±0,00	58,12±0,00	58,12±0,00	58,12±0,00	58,12±0,00
4	A	58,12±0,00	58,12±0,00	58,12±0,00	58,12±0,00	58,12±0,00	58,12±0,00	58,12±0,00	58,12±0,00	58,12±0,00
	P	58,12±0,00	58,12±0,00	58,12±0,00	58,12±0,00	58,12±0,00	58,12±0,00	58,12±0,00	58,12±0,00	58,12±0,00

Tabela A10. Crescimento micelial de *Escovopsis* sp. LESF 315 (cm) nas extremidades controles (1 e 3, contendo 2 µL de acetona) e nas demais (2 e 4) onde foram incorporadas as alíquotas de 2 µL do extrato bruto (concentração de 50 mg mL⁻¹) de *Leucoagaricus* sp. AR04. Letras distintas indicam diferenças significativas entre as extremidades (Mann-Whitney, $P < 0,05$).

Extremidades	Dias						
	1	2	3	4	5	6	7
1	0,30±0,01 a	0,43±0,01 a	0,55±0,00 a	0,60±0,01 a	0,64±0,01 a	0,64±0,02 a	0,69±0,01 a
2	0,36±0,01 a	0,64±0,01 b	0,67±0,00 b	0,74±0,01 b	0,74±0,01 b	0,74±0,01 b	0,74±0,01 b
3	0,30±0,01 a	0,43±0,01 a	0,48±0,00 a	0,61±0,01 a	0,67±0,02 ab	0,70±0,01 ab	0,72±0,01 ab
4	0,35±0,02 a	0,61±0,01 b	0,74±0,01 b	0,74±0,01 b	0,74±0,01 b	0,74±0,01 b	0,74±0,01 b

Tabela A11. Crescimento micelial de *Escovopsis* sp. LESF 315 (cm) nas extremidades controles (1 e 3, contendo 2 µL de acetona) e nas demais (2 e 4) onde foram incorporadas as alíquotas de 2 µL do extrato bruto (concentração de 50 mg mL⁻¹) de *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006. Letras distintas indicam diferenças significativas entre as extremidades (Mann-Whitney, $P < 0,05$).

Extremidades	Dias						
	1	2	3	4	5	6	7
1	0,27±0,01 a	0,33±0,01 a	0,47±0,01 a	0,55±0,01 a	0,55±0,01 a	0,57±0,01 a	0,60±0,01 a
2	0,29±0,01 a	0,48±0,01 b	0,60±0,02 b	0,66±0,01 b	0,70±0,01 bc	0,70±0,01 b	0,72±0,01 bc
3	0,27±0,01 a	0,32±0,01 a	0,46±0,02 a	0,63±0,02 ab	0,64±0,02 b	0,64±0,02 ab	0,68±0,01 ab
4	0,32±0,03 a	0,58±0,02 b	0,65±0,01 b	0,73±0,01 c	0,74±0,00 c	0,74±0,00 b	0,76±0,01 c

Tabela A12. Crescimento micelial de *Escovopsis* sp. LESF 315 (cm) nas extremidades controles (1 e 3, contendo 2 µL de acetona) e nas demais (2 e 4) onde foram incorporadas as alíquotas de 2 µL do extrato bruto (concentração de 50 mg mL⁻¹) de *Leucoagaricus* sp. IJ2016. Letras distintas indicam diferenças significativas entre as extremidades (Mann-Whitney, $P < 0,05$).

Extremidades	Dias						
	1	2	3	4	5	6	7
1	0,21±0,01 a	0,32±0,02 a	0,36±0,02 a	0,44±0,03 a	0,52±0,03 a	0,54±0,03 a	0,61±0,03 a
2	0,25±0,01 a	0,38±0,02 a	0,47±0,02 b	0,56±0,03 a	0,63±0,03 a	0,63±0,03 b	0,68±0,03 a
3	0,22±0,01 a	0,28±0,02 a	0,37±0,01 a	0,51±0,05 a	0,54±0,04 a	0,55±0,04 a	0,60±0,03 a
4	0,26±0,02 a	0,36±0,01 a	0,43±0,01 ab	0,54±0,01 a	0,58±0,02 a	0,68±0,01 b	0,71±0,02 a

Tabela A13. Crescimento micelial de *Escovopsis* sp. LESF 315 (cm) nas extremidades do controle negativo (somente PDA). Letras distintas indicam diferenças significativas entre as extremidades (Mann-Whitney, $P < 0,05$).

Extremidades	Dias						
	1	2	3	4	5	6	7
1	0,17±0,02 a	0,25±0,01 a	0,32±0,01 a	0,45±0,02 ab	0,54±0,02 a	0,57±0,01 a	0,63±0,02 a
2	0,20±0,03 a	0,28±0,01 a	0,34±0,01 a	0,43±0,01 a	0,50±0,02 a	0,53±0,02 a	0,62±0,02 a
3	0,21±0,01 a	0,30±0,01 a	0,37±0,01 a	0,46±0,00 ab	0,54±0,02 a	0,62±0,02 a	0,69±0,03 a
4	0,20±0,02 a	0,30±0,02 a	0,37±0,01 a	0,51±0,02 b	0,57±0,01 a	0,63±0,02 a	0,69±0,01 a

Tabela A14. Áreas de crescimento micelial (média ± erro padrão, em cm²) de *Escovopsis* sp. LESF 315 na ausência (A) e na presença (P) dos fungos mutualistas *Leucoagaricus* sp. AR04, *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006 e *Leucoagaricus* sp. IJ2016. Os valores destacados em negrito representam diferenças significativas entre A e P (Mann-Whitney, $P < 0,05$).

Mutualistas	Tratamentos	Dias de crescimento de <i>Escovopsis</i> sp. LESF 315						
		1	2	3	4	5	6	7
AR04	A	3,47±0,28	7,36±0,31	13,37±0,37	17,04±0,71	20,25±1,42	25,71±0,89	25,94±0,90
	P	17,80±2,69	40,24±2,04	56,08±1,44	58,12±0,00	58,12±0,00	58,12±0,00	58,12±0,00
¹ PC		5,13	5,47	4,19	3,41	2,87	2,26	2,24
FF2006	A	3,47±0,28	7,36±0,31	13,37±0,37	17,04±0,71	20,25±1,42	25,71±0,89	25,94±0,90
	P	9,20±1,28	22,70±2,51	49,12±1,66	58,12±0,00	58,12±0,00	58,12±0,00	58,12±0,00
PC		2,65	3,08	3,67	3,41	2,87	2,26	2,24
IJ2016	A	3,47±0,28	7,36±0,31	13,37±0,37	17,04±0,71	20,25±1,42	25,71±0,89	25,94±0,90
	P	7,52±1,21	16,27±3,09	33,72±3,57	48,39±2,92	58,12±0,00	58,12±0,00	58,12±0,00
PC		2,18	2,21	2,52	2,84	2,87	2,26	2,24

¹Proporção de crescimento de *Escovopsis* LESF 315.

Tabela A15. Crescimento micelial de *Escovopsis* sp. LESF 315 (cm) nas extremidades do controle negativo (somente PDA). Letras distintas indicam diferenças significativas entre as extremidades (Mann-Whitney, $P < 0,05$).

Extremidades	Dias						
	1	2	3	4	5	6	7
1	0,11±0,01	0,18±0,01 a	0,22±0,04 a	0,32±0,01	0,42±0,03 a	0,48±0,02 a	0,51±0,01 a
2	0,12±0,01	0,22±0,02 ab	0,31±0,02 a	0,34±0,02	0,41±0,01 a	0,49±0,02 a	0,54±0,02 a
3	0,11±0,01	0,19±0,01 a	0,30±0,01 a	0,34±0,01	0,44±0,02 a	0,50±0,02 a	0,53±0,02 a
4	0,13±0,01	0,29±0,02 b	0,30±0,01 a	0,34±0,01	0,43±0,01 a	0,49±0,02 a	0,54±0,02 a

Tabela A16. Crescimento micelial de *Escovopsis* sp. LESF 315 (cm) nas extremidades controles (1 e 3, contendo 2 µL de acetona) e nas demais (2 e 4) onde foram incorporadas as alíquotas de 2 µL do extrato orgânico do meio de cultivo (concentração de 50 mg mL⁻¹). Letras iguais indicam a ausência de diferenças significativas entre as extremidades (Mann-Whitney, $P > 0,05$).

Extremidades	Dias						
	1	2	3	4	5	6	7
1	0,9±0,00 a	0,16±0,01 a	0,27±0,01 a	0,31±0,01 a	0,34±0,01 a	0,41±0,01 a	0,47±0,01 a
2	0,10±0,01 a	0,16±0,01 a	0,27±0,02 a	0,31±0,02 a	0,36±0,01 a	0,43±0,01 a	0,46±0,01 a
3	0,10±0,01 a	0,16±0,01 a	0,26±0,01 a	0,32±0,02 a	0,38±0,02 a	0,47±0,03 a	0,51±0,03 a
4	0,10±0,01 a	0,17±0,00 a	0,28±0,01 a	0,32±0,02 a	0,38±0,02 a	0,44±0,02 a	0,49±0,02 a

Tabela A17. Crescimento micelial de *Escovopsis* sp. LESF 315 (cm) nas extremidades controles (1 e 3, contendo 2 µL de acetona) e nas demais (2 e 4) onde foram incorporadas as alíquotas de 2 µL do extrato orgânico (concentração de 50 mg mL⁻¹) de *Leucoagaricus* sp. AR04. Letras distintas indicam diferenças significativas entre as extremidades (Mann-Whitney, $P < 0,05$).

Extremidades	Dias						
	1	2	3	4	5	6	7
1	0,19±0,02 a	0,31±0,01 a	0,45±0,01 a	0,57±0,03 a	0,67±0,03 a	0,69±0,02 a	0,71±0,01 a
2	0,23±0,03 a	0,44±0,04 a	0,66±0,02 b	0,75±0,02 b	0,76±0,01 a	0,76±0,01 a	0,76±0,01 a
3	0,20±0,02 a	0,33±0,02 a	0,47±0,01 a	0,64±0,02 ab	0,70±0,02 a	0,73±0,02 a	0,75±0,01 a
4	0,22±0,03 a	0,48±0,06 a	0,66±0,02 b	0,75±0,01 b	0,75±0,01 a	0,75±0,01 a	0,75±0,01 a

Tabela A18. Crescimento micelial de *Escovopsis* sp. LESF 315 (cm) nas extremidades controles (1 e 3, contendo 2 μ L de acetona) e nas demais (2 e 4) onde foram incorporadas as alíquotas de 2 μ L da subfração B (concentração de 50 mg mL⁻¹). Letras distintas indicam diferenças significativas entre as extremidades (Mann-Whitney, $P < 0,05$).

Extremidades	Dias						
	1	2	3	4	5	6	7
1	0,22±0,01 a	0,45±0,01 a	0,60±0,03 a	0,69±0,02 a	0,72±0,02 a	0,73±0,02 a	0,75±0,01 a
2	0,29±0,02 a	0,64±0,03 b	0,72±0,02 a	0,72±0,02 a	0,72±0,02 a	0,72±0,02 a	0,72±0,02 a
3	0,25±0,02 a	0,48±0,01 a	0,61±0,04 a	0,67±0,03 a	0,70±0,02 a	0,70±0,02 a	0,72±0,05 a
4	0,23±0,03 a	0,58±0,02 b	0,75±0,00 a	0,75±0,00 a	0,75±0,00 a	0,75±0,00 a	0,75±0,00 a

Tabela A19. Crescimento micelial de *Escovopsis* sp. LESF 315 (cm) nas extremidades controles (1 e 3, contendo 2 μ L de acetona) e nas demais (2 e 4) onde foram incorporadas as alíquotas de 2 μ L da subfração C (concentração de 50 mg mL⁻¹). Letras distintas indicam diferenças significativas entre as extremidades (Mann-Whitney, $P < 0,05$).

Extremidades	Dias						
	1	2	3	4	5	6	7
1	0,29±0,02 a	0,45±0,02 a	0,55±0,03 a	0,64±0,02 a	0,67±0,02 a	0,70±0,03 a	0,70±0,01 a
2	0,36±0,03 a	0,62±0,03 b	0,68±0,02 b	0,74±0,01 a	0,74±0,01 b	0,74±0,01 a	0,74±0,01 a
3	0,34±0,02 a	0,48±0,01 a	0,55±0,03 a	0,66±0,03 a	0,69±0,02 a	0,70±0,02 a	0,72±0,04 a
4	0,29±0,03 a	0,64±0,03 b	0,70±0,03 b	0,76±0,01 a	0,77±0,01 b	0,77±0,01 a	0,77±0,01 a

Tabela A20. Crescimento micelial de *Escovopsis* sp. LESF 315 (cm) nas extremidades controles (1 e 3, contendo 2 μ L de acetona) e nas demais (2 e 4) onde foram incorporadas as alíquotas de 2 μ L da subfração D (concentração de 50 mg mL⁻¹). Letras distintas indicam diferenças significativas entre as extremidades (Mann-Whitney, $P < 0,05$).

Extremidades	Dias						
	1	2	3	4	5	6	7
1	0,11±0,01 a	0,20±0,00 a	0,31±0,01 a	0,40±0,00 a	0,48±0,01 a	0,54±0,01 a	0,59±0,01 a
2	0,12±0,01 a	0,22±0,01 a	0,38±0,01 b	0,48±0,02 b	0,56±0,02 b	0,61±0,02 a	0,69±0,01 b
3	0,13±0,01 a	0,19±0,01 a	0,31±0,02 a	0,39±0,02 a	0,48±0,03 a	0,52±0,04 a	0,58±0,03 a
4	0,16±0,02 a	0,22±0,01 a	0,35±0,01 ab	0,46±0,03 b	0,52±0,02 b	0,60±0,02 a	0,67±0,02 b

Tabela A21. Crescimento micelial de *Escovopsis* sp. LESF 315 (cm) nas extremidades controles (1 e 3, contendo 2 μ L de acetona) e nas demais (2 e 4) onde foram incorporadas as alíquotas de 2 μ L da subfração E (concentração de 50 mg mL⁻¹). Letras distintas indicam diferenças significativas entre as extremidades (Mann-Whitney, $P < 0,05$).

Extremidades	Dias						
	1	2	3	4	5	6	7
1	0,12±0,01 a	0,24±0,01 a	0,36±0,02 a	0,42±0,02 a	0,50±0,02 a	0,59±0,03 a	0,64±0,03 a
2	0,11±0,01 a	0,26±0,01 a	0,36±0,02 a	0,48±0,03 a	0,53±0,03 a	0,57±0,03 a	0,61±0,03 a
3	0,10±0,01 a	0,22±0,02 a	0,33±0,01 a	0,45±0,03 a	0,51±0,02 a	0,57±0,02 a	0,65±0,03 a
4	0,13±0,01 a	0,28±0,01 a	0,43±0,03 a	0,59±0,04 b	0,64±0,04 a	0,66±0,04 a	0,73±0,03 a

Tabela A22. Crescimento micelial de *Escovopsis* sp. LESF 315 (cm) nas extremidades controles (1 e 3, contendo 2 μ L de acetona) e nas demais (2 e 4) onde foram incorporadas as alíquotas de 2 μ L da subfração F (concentração de 50 mg mL⁻¹). Letras distintas indicam diferenças significativas entre as extremidades (Mann-Whitney, $P < 0,05$).

Extremidades	Dias						
	1	2	3	4	5	6	7
1	0,10±0,01 a	0,19±0,01 a	0,25±0,02 a	0,35±0,01 a	0,44±0,02 a	0,48±0,01 a	0,49±0,01 a
2	0,12±0,01 a	0,23±0,01 a	0,32±0,01 b	0,37±0,02 a	0,42±0,02 a	0,47±0,02 a	0,48±0,02 a
3	0,13±0,01 a	0,22±0,01 a	0,31±0,02 ab	0,40±0,02 a	0,48±0,02 a	0,57±0,03 a	0,58±0,03 a
4	0,11±0,01 a	0,22±0,01 a	0,34±0,01 b	0,43±0,02 a	0,48±0,02 a	0,54±0,02 a	0,56±0,02 a

Tabela A23. Crescimento micelial de *Escovopsis* sp. LESF 315 (cm) nas extremidades controles (1 e 3, contendo 2 μ L de acetona) e nas demais (2 e 4) onde foram incorporadas as alíquotas de 2 μ L da subfração G (concentração de 50 mg mL⁻¹). Letras distintas indicam diferenças significativas entre as extremidades (Mann-Whitney, $P < 0,05$).

Extremidades	Dias						
	1	2	3	4	5	6	7
1	0,12±0,01 a	0,19±0,01 a	0,31±0,03 a	0,33±0,03 a	0,42±0,03 a	0,43±0,03 a	0,49±0,02 a
2	0,09±0,01 a	0,26±0,01 b	0,29±0,01 a	0,32±0,01 a	0,41±0,02 a	0,47±0,02 a	0,52±0,02 ab
3	0,13±0,01 a	0,23±0,01 b	0,32±0,01 a	0,34±0,01 a	0,42±0,03 a	0,47±0,02 a	0,52±0,01 ab
4	0,15±0,01 a	0,29±0,02 b	0,34±0,02 a	0,39±0,02 a	0,48±0,03 a	0,54±0,02 a	0,61±0,03 b

Tabela A24. Crescimento micelial de *Escovopsis* sp. LESF 315 (cm) nas extremidades controles (1 e 3, contendo 2 μL de acetona) e nas demais (2 e 4) onde foram incorporadas as alíquotas de 2 μL da subfração I (concentração de 50 mg mL^{-1}). Letras iguais indicam ausência de diferenças significativas entre as extremidades (Mann-Whitney, $P > 0,05$).

Extremidades	Dias						
	1	2	3	4	5	6	7
1	0,12 $\pm$ 0,01 a	0,21 $\pm$ 0,00 a	0,34 $\pm$ 0,04 a	0,44 $\pm$ 0,03 a	0,53 $\pm$ 0,04 a	0,58 $\pm$ 0,04 a	0,62 $\pm$ 0,04 a
2	0,11 $\pm$ 0,02 a	0,29 $\pm$ 0,02 b	0,43 $\pm$ 0,02 a	0,52 $\pm$ 0,01 a	0,59 $\pm$ 0,01 a	0,64 $\pm$ 0,02 a	0,68 $\pm$ 0,03 a
3	0,11 $\pm$ 0,01 a	0,18 $\pm$ 0,01 a	0,36 $\pm$ 0,01 a	0,40 $\pm$ 0,02 a	0,47 $\pm$ 0,04 a	0,53 $\pm$ 0,05 a	0,57 $\pm$ 0,04 a
4	0,09 $\pm$ 0,01 a	0,21 $\pm$ 0,02 a	0,39 $\pm$ 0,02 a	0,49 $\pm$ 0,02 a	0,59 $\pm$ 0,02 a	0,65 $\pm$ 0,02 a	0,68 $\pm$ 0,02 a

Tabela A25. Crescimento micelial de *Escovopsis* sp. LESF 315 (cm) nas extremidades controles (1 e 3, contendo 2 μL de acetona) e nas demais (2 e 4) onde foram incorporadas as alíquotas de 2 μL da subfração L (concentração de 50 mg mL^{-1}). Letras distintas indicam diferenças significativas entre as extremidades (Mann-Whitney, $P < 0,05$).

Extremidades	Dias						
	1	2	3	4	5	6	7
1	0,10 $\pm$ 0,01 a	0,19 $\pm$ 0,01 a	0,26 $\pm$ 0,01 a	0,31 $\pm$ 0,01 a	0,37 $\pm$ 0,02 a	0,43 $\pm$ 0,02 a	0,46 $\pm$ 0,03 a
2	0,12 $\pm$ 0,01 a	0,22 $\pm$ 0,00 a	0,36 $\pm$ 0,01 b	0,42 $\pm$ 0,02 b	0,52 $\pm$ 0,02 b	0,59 $\pm$ 0,03 b	0,63 $\pm$ 0,03 b
3	0,13 $\pm$ 0,01 a	0,23 $\pm$ 0,01 a	0,31 $\pm$ 0,00 b	0,39 $\pm$ 0,01 b	0,46 $\pm$ 0,01 b	0,50 $\pm$ 0,02 ab	0,57 $\pm$ 0,02 ab
4	0,12 $\pm$ 0,01 a	0,20 $\pm$ 0,02 a	0,30 $\pm$ 0,01 ab	0,38 $\pm$ 0,02 ab	0,43 $\pm$ 0,02 ab	0,50 $\pm$ 0,02 ab	0,58 $\pm$ 0,02 ab

Tabela A26. Crescimento micelial de *Escovopsis* sp. LESF 315 (cm) nas extremidades controles (1 e 3, contendo 2 μL de acetona) e nas demais (2 e 4) onde foram incorporadas as alíquotas de 2 μL da subfração H (concentração de 50 mg mL^{-1}). Letras iguais indicam ausência de diferenças significativas entre as extremidades (Mann-Whitney, $P > 0,05$).

Extremidades	Dias						
	1	2	3	4	5	6	7
1	0,15 $\pm$ 0,01 a	0,24 $\pm$ 0,01 a	0,35 $\pm$ 0,02 a	0,39 $\pm$ 0,02 a	0,46 $\pm$ 0,03 a	0,52 $\pm$ 0,03 a	0,53 $\pm$ 0,03 a
2	0,13 $\pm$ 0,01 a	0,22 $\pm$ 0,0 a	0,40 $\pm$ 0,01 a	0,49 $\pm$ 0,02 a	0,54 $\pm$ 0,02 a	0,59 $\pm$ 0,02 a	0,61 $\pm$ 0,02 a
3	0,13 $\pm$ 0,01 a	0,18 $\pm$ 0,03 a	0,35 $\pm$ 0,01 a	0,42 $\pm$ 0,01 a	0,49 $\pm$ 0,01 a	0,56 $\pm$ 0,01 a	0,59 $\pm$ 0,01 a
4	0,18 $\pm$ 0,01 a	0,25 $\pm$ 0,01 a	0,38 $\pm$ 0,01 a	0,45 $\pm$ 0,02 a	0,55 $\pm$ 0,02 a	0,59 $\pm$ 0,02 a	0,63 $\pm$ 0,02 a

Tabela A27. Crescimento micelial de *Escovopsis* sp. LESF 315 (cm) nas extremidades controles (1 e 3, contendo 2 µL de acetona) e nas demais (2 e 4) onde foram incorporadas as alíquotas de 2 µL da subfração J (concentração de 50 mg mL⁻¹). Letras iguais indicam ausência de diferenças significativas entre as extremidades (Mann-Whitney, $P > 0,05$).

Extremidades	Dias						
	1	2	3	4	5	6	7
1	0,12±0,01 a	0,20±0,01 a	0,29±0,01 a	0,37±0,01 a	0,46±0,02 a	0,51±0,03 a	0,59±0,03 a
2	0,09±0,01 a	0,19±0,01 a	0,33±0,01 a	0,40±0,02 a	0,45±0,02 a	0,53±0,03 a	0,59±0,02 a
3	0,10±0,01 a	0,18±0,01 a	0,29±0,02 a	0,34±0,02 a	0,44±0,02 a	0,47±0,03 a	0,51±0,03 a
4	0,12±0,01 a	0,19±0,01 a	0,30±0,02 a	0,41±0,03 a	0,46±0,03 a	0,50±0,03 a	0,58±0,03 a

Tabela A28. Crescimento micelial de *Escovopsis* sp. LESF 315 (cm) nas extremidades controles (1 e 3, contendo 2 µL de acetona) e nas demais (2 e 4) onde foram incorporadas as alíquotas de 2 µL da subfração K (concentração de 50 mg mL⁻¹). Letras iguais indicam ausência de diferenças significativas entre as extremidades (Mann-Whitney, $P > 0,05$).

Extremidades	Dias						
	1	2	3	4	5	6	7
1	0,12±0,01 a	0,21±0,01 a	0,31±0,01 a	0,40±0,02 a	0,46±0,03 a	0,51±0,03 a	0,58±0,03 a
2	0,13±0,01 a	0,24±0,01 a	0,38±0,03 a	0,46±0,05 a	0,54±0,04 a	0,58±0,05 a	0,62±0,04 a
3	0,11±0,01 a	0,20±0,01 a	0,30±0,03 a	0,39±0,03 a	0,43±0,04 a	0,48±0,04 a	0,52±0,05 a
4	0,10±0,01 a	0,21±0,01 a	0,33±0,02 a	0,45±0,03 a	0,52±0,03 a	0,54±0,03 a	0,58±0,03 a

Tabela A29. Crescimento micelial (em cm) de *Escovopsis* sp. LESF 315 frente as alíquotas de 2 μ L (concentração de 50 mg mL⁻¹) das subfrações B e C, comparado com as alíquotas das demais subfrações e com os controles negativo (somente meio PDA), positivo (extrato bruto do meio de cultivo) e extrato bruto de *Leucoagaricus* sp. AR04.

Tratamentos	Dias de crescimento de <i>Escovopsis</i> sp. LESF 315						
	1	2	3	4	5	6	7
Subfrações							
B	0,25±0,01 a	0,54±0,01 a	0,67±0,02 a	0,72±0,02 a	0,72±0,01 a	0,72±0,01 a	0,73±0,01 a
C	0,32±0,02 a	0,55±0,02 a	0,65±0,01 a	0,70±0,01 a	0,70±0,01 a	0,71±0,01 a	0,73±0,01 a
D	0,13±0,01 b	0,21±0,00 b	0,34±0,01 b	0,43±0,01 b	0,51±0,01 b	0,57±0,01 b	0,63±0,01 b
E	0,12±0,00 b	0,25±0,01 b	0,37±0,01 b	0,48±0,02 b	0,55±0,02 b	0,60±0,02 b	0,66±0,02 b
F	0,11±0,00 b	0,22±0,01 b	0,30±0,01 b	0,39±0,01 b	0,45±0,01 b	0,51±0,01 b	0,53±0,01 b
G	0,12±0,01 b	0,24±0,01 b	0,31±0,01 b	0,35±0,01 b	0,43±0,02 b	0,48±0,02 b	0,53±0,02 b
H	0,15±0,01 b	0,22±0,01 b	0,37±0,00 b	0,44±0,01 b	0,51±0,00 b	0,57±0,01 b	0,59±0,01 b
I	0,11±0,01 b	0,22±0,01 b	0,38±0,01 b	0,46±0,01 b	0,54±0,02 b	0,60±0,02 b	0,64±0,02 b
J	0,10±0,01 b	0,19±0,00 b	0,30±0,01 b	0,38±0,01 b	0,45±0,01 b	0,50±0,02 b	0,57±0,01 b
K	0,12±0,01 b	0,21±0,01 b	0,33±0,01 b	0,42±0,01 b	0,49±0,01 b	0,53±0,02 b	0,57±0,02 b
L	0,12±0,00 b	0,21±0,00 b	0,31±0,01 b	0,37±0,01 b	0,45±0,01 b	0,51±0,01 b	0,56±0,02 b
C-	0,12±0,01 b	0,22±0,01 b	0,28±0,01 b	0,33±0,01 b	0,43±0,01 b	0,49±0,01 b	0,53±0,01 b
C+	0,10±0,01 b	0,16±0,00 b	0,27±0,00 b	0,31±0,01 b	0,36±0,01 b	0,44±0,01 b	0,48±0,01 b
Extrato bruto de <i>Leucoagaricus</i> sp. AR04	0,21±0,02 a	0,39±0,03 b	0,56±0,01 b	0,68±0,01 a	0,72±0,01 a	0,73±0,01 a	0,74±0,01 a