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

**Fungos isolados de ninhos iniciais da formiga *Atta sexdens rubropilosa*:
análise do potencial para biocontrole de formigas-cortadeiras**

DAIANE RAQUEL POLEZEL

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).

Janeiro - 2017

DAIANE RAQUEL POLEZEL

Fungos isolados de ninhos iniciais da formiga *Atta sexdens rubropilosa*: análise do potencial para biocontrole de formigas-cortadeiras

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 (Área de Microbiologia Aplicada).

Orientador: Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca

Rio Claro

2017

595.796 Polezel, Daiane Raquel
P765f Fungos isolados de ninhos iniciais da formiga *Atta sexdens rubropilosa* : análise do potencial para biocontrole de formigas-cortadeiras / Daiane Raquel Polezel. - Rio Claro, 2017
66 f. : il., figs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Fernando Carlos Pagnocca

1. Formiga. 2. Controle biológico. 3. *Leucoagaricus gongylophorus*. 4. *Trichoderma*. 5. Compostos orgânicos voláteis. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

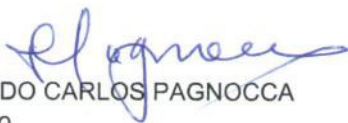
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Fungos isolados de ninhos iniciais da formiga *Atta sexdens rubropilosa*: análise do potencial para biocontrole de formigas cortadeiras

AUTORA: DAIANE RAQUEL POLEZEL

ORIENTADOR: FERNANDO CARLOS PAGNOCCA

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



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



Prof. Dr. JOSÉ EDUARDO MARCONDES DE ALMEIDA
Laboratório de Controle Biológico / Instituto Biológico



Prof. Dr. ODAIR CORREA BUENO
CEIS / IB-Rio Claro

Rio Claro, 22 de fevereiro de 2017

Aos meus pais, José Augusto e Zélia, por serem grandes exemplos em minha vida.

Dedico.

Agradecimentos

Difícil iniciar aos agradecimentos, mas ao mesmo tempo é algo muito bom, pois escrever essas palavras demonstra que concluí mais uma etapa. Desde os árduos estudos para o processo seletivo, até a escrita dessa dissertação, foram vários dias difíceis, e a presença de inúmeras pessoas teve fundamental importância, desde os pensamentos positivos até as contribuições para que esse trabalho fosse realmente concluído.

De início, agradeço a Deus e à Nossa Senhora Aparecida, que sempre iluminam meus passos, me abençoam e me dão fé e perseverança para que eu alcance e concretize meus objetivos.

Ao meu pai José, minha mãe Zélia e ao meu irmão Danilo. Nenhuma palavra é capaz de realmente expressar minha gratidão por tudo o que me ensinaram, pelo amor compartilhado, pelo exemplo inefável que vocês são em minha vida. Tudo o que nós já passamos foram obstáculos que só conseguimos enfrentar pois temos uns aos outros. Só peço a Deus que nos ilumine e nos dê muita saúde! Eu amo vocês incondicionalmente e serei eternamente grata a Deus por tê-los em minha vida.

Agradeço imensamente meu orientador e também amigo Fernando Carlos Pagnocca, pela confiança, paciência, atenção. Tudo o que me passou, desde 2012, quando iniciei em seu laboratório, teve grandiosa contribuição para a minha formação na graduação e agora, durante o mestrado. Com certeza eu tive um grande orientador e aqui deixo o meu mais sincero agradecimento por todo o apoio dado a mim e também à minha família.

À Maria Carolina Canali. Foram 6 anos de convivência diária, desde o início da graduação, passando pelo estágio, TCC, prova do mestrado, e por fim a escrita e defesa da minha dissertação, que também é sua! Muito obrigada, minha amiga! Pelo apoio, pelas vezes que você esteve presente por mim, pelos dias de choros e sorrisos (e muitos sorrisos), estudos e descansos, por ser quem você é e pela amizade grandiosa que construímos! Serei eternamente grata por Deus ter colocado você junto a mim nessa caminhada tornando tudo mais leve e alegre!

Às minhas amigas, Daniela Tura e Weilan Paixão. Não tenho palavras para expressar o meu carinho por vocês! Muito obrigada pela amizade que, com certeza, levarei para sempre comigo.

À minha avó Raquel, pelas orações e por sempre me incentivar nos estudos. Agradeço imensamente por ainda ter a oportunidade de abraçá-la em mais esse momento da minha vida. E aos meus avós: Arcanjo, Alvira e Antonio (*in memoriam*); tenho certeza que intercederam por mim e estão orgulhosos por mais esse degrau que eu subi em minha vida. Vocês sempre serão meu exemplo de garra e coragem.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia: à Dra. Virgínia, que ofereceu grandiosa colaboração para o desenvolvimento desse trabalho, e também à Dra. Ana Paula, agradeço imensamente.

Ao CEIS, pelo suporte oferecido ao longo desses anos: Necis, por sempre estar disposta em ajudar, às meninas do Laboratório de Formigas: Thais, Nathália e Bianca, pela paciência ao ensinar a cuidar das formigas. Ao Sergio Kakazu, por realizar o sequenciamento das amostras. Ao Prof. Odair, pelas idéias oferecidas e pelo suporte dado ao longo desse trabalho. Ao Prof. Andre Rodrigues e todo o pessoal do LESF, Danilo Polezel, Quimi, Lorena, Tássio, por sempre estarem dispostos a ajudarem. Ao pessoal do Depto de Bioquímica, pela amizade construída que certamente levarei comigo. Ao Adriano Uemura, pela sua paciência e tempo dispensado, principalmente quando o assunto era o GC-MS, agradeço imensamente.

Ao CNPq pelo financiamento deste trabalho.

Enfim, a todos que de uma forma ou outra, contribuíram com alguma peça para o desenvolvimento desse trabalho, meu sincero agradecimento!

“No man is an island, entire of itself; every man is a piece of the continent, a part of the main.”

John Donne

RESUMO

Os gêneros de formigas-cortadeiras, *Atta* e *Acromyrmex*, mantêm uma associação mutualística com o basidiomiceto *Leucoagaricus gongylophorus*, o qual é responsável pela produção de enzimas que degradam o material vegetal transportado para o interior dos ninhos. As formigas-cortadeiras são consideradas pragas devido a enorme quantidade de material vegetal que é cortada, principalmente em ambientes alterados por atividades antrópicas, como os locais de agricultura e reflorestamento. Devido à necessidade de manejo das formigas-cortadeiras, o controle biológico representa um método promissor e ambientalmente amigável. Nesse contexto, devido a íntima relação entre as formigas e o fungo mutualista, é de grande importância selecionar linhagens de fungos filamentosos que possam interferir negativamente sobre o jardim de fungos. No presente trabalho isolamos fungos filamentosos contaminantes de colônias iniciais da formiga *Atta sexdens rubropilosa*. Após o isolamento e identificação foram realizados testes para avaliar o crescimento desses fungos utilizando o jardim de fungos como substrato, e também as linhagens consideradas melhores nesse aspecto foram testadas em colônias completas. A combinação de dois fungos (*Trichoderma harzianum* e *Trichoderma virens*) mostrou-se promissora para prosseguimento nos testes e futuro uso no controle biológico. Adicionalmente, foi avaliada a secreção de compostos orgânicos voláteis através de análises GC/MS de três linhagens de fungos filamentosos após sete dias de crescimento em culturas individuais e também frente ao fungo mutualista. Ainda, utilizando a microscopia eletrônica de varredura, avaliamos como ocorre a interação do fungo *R. variabilis* frente ao fungo mutualista, demonstrando que o fungo *R. variabilis* possui caráter micoparasita ao interagir com o fungo mutualista .

Palavras-chave: Controle biológico. Formigas-cortadeiras. Compostos orgânicos voláteis. *Leucoagaricus gongylophorus*. *Trichoderma*.

ABSTRACT

The leaf-cutting ants, *Atta* and *Acromyrmex*, maintain a mutualistic association with the basidiomycete *Leucoagaricus gongylophorus*, which is responsible for the production of enzymes that degrade the plant material transported to the interior of the nests. The leaf-cutting ants are considered pests due to an enormous amount of plant material they cut, mainly at areas altered by anthropic activities, such as agricultural and reforestation sites. Due to the need for management of the leaf cutting ants, biological control represents a promising and environmentally friendly method. In this context, due to the close relationship between ants and mutual fungi, it is of great importance to select strains of filamentous fungi that negatively impact the fungus garden. Thus, in the present study, we evaluated lineages of filamentous fungi isolated from the initial colonies of *Atta sexdens rubropilosa*. After isolation and identification of the contaminants filamentous fungi, assays were carried out in order to determine the fungal growth of the most suitable lineages on the fungus garden of the lab colonies. The combination of two fungi (*Trichoderma harzianum* and *Trichoderma virens*) was promising for the development of methods aiming at the biological control of leaf-cutting ants. Additionally, the production of volatile organic compounds was evaluated by the GC / MS analysis of three of the filamentous fungal strains after 7 days of growth in individual cultures, and also in the presence of the mutualistic fungus. Images of scanning electron microscopy were taken during the co-culture assays.

Key-words: Biological control. Volatile Organic Compounds. *Atta*. *Leucoagarycus gongylophorus*. *Trichoderma*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 Formigas da tribo Attini e o cultivo de fungos.....	12
2.2 Fungos parasitas associados às formigas-cortadeiras e ao fungo mutualista.....	13
2.3 Formigas-cortadeiras e seu controle	14
2.4 Metabólitos secundários	15
2.5 Estudos antecedentes produção de VOC's.....	16
3 CAPÍTULO 1 - Potencial dos fungos filamentosos para o biocontrole da formiga	
<i>Atta sexdens rubropilosa</i>.....	17
Resumo.....	18
3.1 Introdução.....	19
3.2 Objetivos.....	20
3.3 Material e Métodos.....	21
3.3.1 Isolamento, cultivo e preservação dos fungos.....	21
3.3.2 Cultivo direto no jardim de fungo.....	21
3.3.3 Teste de patogenicidade em sub-colônias de <i>A. sexdens rubropilosa</i>	22
3.3.4 Teste de patogenicidade em sub-colônias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> utilizando mix de fungos.....	22
3.3.5. Teste de patogenicidade em colônias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> utilizando mix de fungos.....	23
3.3.6 Teste de patogenicidade em colônias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> utilizando mix de fungos: técnica de polvilhamento.....	23
3.3.7 Teste de patogenicidade em colônias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> utilizando mix de fungos: técnica de nebulização.....	24
3.3.8 Viabilidade dos esporos.....	24
3.3.9 Caracterização polifásica dos isolados de fungos filamentosos.....	24
3.3.10. Marcadores morfológicos.....	24

3.3.11. Marcadores moleculares: Extração de DNA, Amplificação e Sequenciamento.....	25
3.4 Resultados.....	25
3.4.1 Identificação dos isolados	25
3.4.2 Cultivo direto no jardim de fungo.....	27
3.4.3 Teste de patogenicidade em subcolônias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	28
3.4.4 Teste de patogenicidade em sub-colônias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> utilizando consórcio de fungos	29
3.4.5 Teste de patogenicidade em colônias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> utilizando consórcio de fungos.....	31
3.4.6. Teste de patogenicidade em colônias de <i>A. sexdes rubropilosa</i> utilizando mix de fungos: técnica de polvilhamento.....	31
3.4.7. Teste de patogenicidade em colônias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> utilizando mix de fungos: técnica de nebulização.....	32
3.5 Discussão.....	33
3.6 Conclusão.....	34
4 CAPÍTULO 2 – Ação dos fungos filamentosos frente ao fungo mutualista <i>L. gongylophorus</i>.....	35
Resumo.....	36
4.1 Introdução.....	37
4.2 Objetivos.....	38
4.3 Material e Métodos.....	39
4.3.1 Produção de Compostos Orgânicos Voláteis.....	39
4.3.2 Estudo das interações físicas entre <i>Rhizomucor variabilis</i> e o fungo mutualista <i>L. gongylophorus</i> por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	39
4.4 Resultados.....	41
4.4.1 Compostos Orgânicos Voláteis	41
4.4.1.1 Composição dos VOC's produzidos pelo co-cultivo de <i>L. gongylophorus</i> (FF2006) com <i>T. harzianum</i> (A215-2).....	43
4.4.1.2 Composição dos VOC's produzidos pelo co-cultivo de <i>T. virens e L. gongylophorus</i> (FF2006).....	44
4.4.1.3 Composição dos VOC's pelo co-cultivo de <i>R. variabilis e L. gonylophorus</i>	45

4.4.1.4 Composição dos VOC's produzidos pelo co-cultivo de <i>T. harzianum</i> (A215-2); <i>T. virens</i> (A174-1) e <i>L. gongylophorus</i> (FF2006).....	46
4.4.2 Estudo das interações físicas entre <i>Rhizomucor variabilis</i> e o fungo mutualista <i>L. gongylophorus</i> por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	49
4.5 Discussão.....	52
4.6 Conclusão.....	51
REFERÊNCIAS.....	55
ANEXO.....	64

1. Introdução

As formigas-cortadeiras, gêneros *Acromyrmex* e *Atta*, possuem uma relação mutualística com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* e o cultivam no interior de suas colônias sobre vegetação recém-cortada (CURRIE et al., 1999, HINKLE et al., 1994, MUELLER et al., 1998; SCHULTZ; BRADY, 2008). O controle dessas formigas faz-se necessário devido à intensa desfolha realizada em locais de agricultura e reflorestamento (CHERRETT, 1986; FOWLER et al., 1989). Atualmente, os métodos mais utilizados de controle dessas formigas envolvem produtos químicos. Contudo, esses compostos contaminam o meio ambiente por não serem biodegradáveis e acumulam-se na cadeia alimentar, atingindo assim organismos não alvo (BOARETTO; FORTI, 1997; OLIVEIRA et al., 2011).

O fungo mutualista das formigas-cortadeiras pode ser o alvo para o método de biocontrole, e alguns estudos realizados em condições de laboratório já demonstraram a ação deletéria de fungos micoparasitas, tais como os dos gêneros *Acremonium*, *Trichoderma*, *Escovopsis*, *Mucor* e *Syncephalastrum* sobre o jardim de fungos (SILVA et al., 2006; BARCOTO et al., 2016; FOLGARAIT et al., 2011).

Compostos orgânicos voláteis secretados por esses micro-organismos também podem representar uma fonte potencial de compostos promissores ao biocontrole, pois tais compostos podem possuir caráter antifúngico e também inseticida (HEIL, 2008; STENBERG et al., 2015; KANDASAMY et al., 2016; MITHÖFER et al., 2016; WERNER et al., 2016). Contudo, este é um campo de investigação pouco explorado (PIECHULLA; DEGENHARDT, 2014).

O presente trabalho teve como objetivo estudar os fungos filamentosos isolados como contaminantes de ninhos iniciais de formigas-cortadeiras visando a seleção de linhagens com potencial para o desenvolvimento de métodos de controle biológico dessas formigas-cortadeiras, avaliando a interação dos mesmos junto ao fungo mutualista *L. gongylophorus*.

A primeira parte do trabalho apresenta uma revisão sobre os aspectos básicos da associação mutualística entre formigas e fungo, além das pesquisas envolvendo o biocontrole das formigas-cortadeiras.

O Capítulo 1 teve como objetivo selecionar as linhagens que interagissem negativamente com o fungo mutualista das colônias de *Atta sexdens rubropilosa*, sendo estas as mais promissoras aos métodos de biocontrole. No capítulo 2, os estudos prosseguiram com as linhagens que foram selecionadas no Capítulo 1, verificando a interação destas com o fungo mutualista por meio da produção de compostos orgânicos voláteis. Ainda, foram realizados

estudos de microscopia eletrônica de varredura para avaliar como se dá a interação entre o fungo filamentosso *Rhizomucor variabilis* e o mutualista *L. gongylophorus*.

2. Revisão da literatura

2.1 Formigas da tribo Attini e o cultivo de fungos

As formigas da tribo Attini cultivam fungos basidiomicetos (CHAPELA et al., 1994) como fonte imprescindível de nutrientes (WEBER, 1972; BASS; CHERRETT, 1995) num arranjo característico conhecido como “jardim de fungo”. A tribo Attini (Hymenoptera: Formicidae) compreende 16 gêneros e aproximadamente 297 espécies distribuídas na região neotropical, desde o sul dos Estados Unidos até o sul da América do Sul. É considerada um grupo monofilético de formigas que apresenta como característica principal o cultivo de um basidiomiceto usado para alimentação. Estima-se que a fungicultura nessa tribo tenha surgido há 50 milhões de anos, na bacia Amazônica (MUELLER et al., 2001; SCHULTZ; BRADY, 2008; SOLOMON, 2008).

De acordo com Mueller et al. (2001), a origem do cultivo de fungos pela tribo Attini pode ser explicada por duas hipóteses: (i) as formigas se alimentavam de fungos que cresciam acidentalmente nos ninhos, e posteriormente as formigas desenvolveram a capacidade de cultivá-lo e transmiti-lo para as próximas gerações; (ii) os fungos utilizavam as formigas como forma de dispersão, e posteriormente houve o desenvolvimento da capacidade de cultivo, transmissão e uso do fungo na alimentação.

As formigas-cortadeiras cultivam no interior de suas colônias subterrâneas o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* (Basidiomycota: Agaricales: Agaricaceae). O desenvolvimento do fungo sobre o material vegetal preparado pelas formigas resulta no que é conhecido como jardim de fungo. Durante seu crescimento o fungo mutualista produz enzimas que atacam o substrato vegetal, permitindo a penetração das hifas nos tecidos mais internos dos fragmentos vegetais e ao mesmo tempo produzindo nutrientes assimiláveis para todos os habitantes do sistema, inclusive outros micro-organismos e as próprias operárias (SILVA et. al., 2006). Acredita-se que o fungo mutualista seja o único alimento das larvas e que também seja componente da dieta dos adultos. As extremidades arredondadas das hifas são conhecidas como gongilídeos e são ricas em carboidratos, aminoácidos e lipídios, fato

que deve ter contribuído para o sucesso da associação do fungo com as formigas-cortadeiras. (SILVA et al., 2003; SCHULTZ; BRADY, 2008; MENDES et al., 2012; AYLWARD et al., 2013).

2.2 Fungos parasitas associados às formigas-cortadeiras e ao fungo mutualista

Apesar dos diversos mecanismos utilizados por esses insetos para evitar contaminações danosas à colônia, sabe-se que o *jardim de fungo* abriga uma complexa e diversificada comunidade formada por fungos filamentosos, leveduras e bactérias, (CURRIE et al. 1999; PAGNOCCA; MASIULIONIS; RODRIGUES, 2012). Esses micro-organismos também podem hidrolisar o substrato vegetal mas o quê e quanto isso pode significar para a simbiose ainda precisa ser esclarecido (MENDES et al., 2012). Interações antagonistas entre membros desse microbiota também já foram descritas, o que indica a produção de compostos antimicrobianos específicos e desconhecidos (RODRIGUES, et al., 2009).

Colônias inteiras de formigas podem ser destruídas por um micro-organismo parasita que seja suficientemente virulento, principalmente quando a colônia encontra-se vulnerável, como é o caso das colônias iniciais ou daquelas onde o número de operárias é reduzido. Currie et al. (1999) verificaram que *Escovopsis* é um microfungo parasita especializado com alta virulência contra *jardins de fungo* de formigas Attini. *Escovopsis* é um fungo anamórfico (apenas a reprodução assexuada é conhecida) e pode ocasionar retardo no crescimento da colônia, ou até a morte da mesma (CURRIE, 2001). As poucas evidências disponíveis sugerem que representantes do gênero *Escovopsis* são micoparasitas que podem se nutrir indiretamente das hifas do fungo mutualista (REYNOLDS; CURRIE, 2004).

Dentre outros fungos encontrados nos ninhos de formigas-cortadeiras, a maioria é de solo (*Mucor*, *Absidia*, *Cunninghamella*, *Chaetomium*, *Phoma*, *Chrysosporium*, *Acremonium*, *Gliomastix*, *Trichoderma*, *Volutella* e *Arthrobotrys*) enquanto somente *Beauveria* e *Metarhizium* são formalmente caracterizados como entomopatógenos facultativos, ou seja, podem ou não utilizar insetos como hospedeiros em alguma fase da vida, sendo considerados inimigos naturais de muitas espécies de insetos, atuando como importantes reguladores das populações (HAJEK; ST. LEGER, 1994). Os fungos entomopatogênicos foram os primeiros agentes microbianos a serem utilizados no biocontrole de insetos (ALVES, 1998).

Espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium* são usualmente encontradas em solos tropicais onde atuam principalmente como decompositores (DOMSCH; GAMS; ARDERSON, 1980). Contudo, algumas espécies, como *Aspergillus flavus* e *Fusarium*

oxysporum, também têm sido isoladas de operárias vivas ou enfraquecidas, do depósito de lixo e mesmo do jardim de fungo de formigas-cortadeiras (HUGHES; BOOMSMA, 2004; RODRIGUES et al., 2005a, RODRIGUES et al., 2005b). O ascomicota do gênero *Clonostachys* também atua como saprófito de solo, e tem sido isolado com baixa frequência do jardim de fungo de colônias de laboratório de *A. sexdens rubropilosa* (RODRIGUES et al., 2005a).

Espécies de *Trichoderma* são comumente encontradas em diversos tipos de solo, principalmente aqueles que são ricos em matéria orgânica (SAMUELS, 1996). Representantes do gênero *Trichoderma* tem sido utilizados no controle de fitopatógenos, devido as suas propriedades antagonísticas, que envolvem principalmente a produção de antibióticos ou enzimas proteolíticas. Alguns isolados de *Trichoderma* também estão sendo considerados como possíveis candidatos ao controle das formigas-cortadeiras, devido às suas propriedades antagonísticas em relação ao fungo mutualista por elas cultivado (GHISALBERTI; SIVASITHAMPARAM, 1991; BÉLANGER et al., 1995; ORTIZ; ORDUZ, 2000; LOPEZ; ORDUZ, 2003). Entretanto, esta hipótese não foi confirmada por Currie et al. (1999).

Acredita-se que o mecanismo de interação entre *Trichoderma* e o fungo mutualista seja por meio da produção de substâncias antifúngicas, incluindo enzimas, antibióticos, substâncias voláteis e não-voláteis, as quais podem impedir o crescimento micelial do simbionte das Attini sem que haja o contato do parasita com seu hospedeiro (ORTIZ; ORDUZ, 2000).

2.3 Formigas-cortadeiras e seu controle

As formigas-cortadeiras exercem grande influencia no ambiente em que ocorrem, contribuindo para a produtividade, ciclagem de energia, nutrientes, sendo que alteram as propriedades do solo ao promoverem a aeração, aumentando a quantidade de matéria orgânica e a mineralização de nutrientes (FOWLER et al., 1989). Entretanto, apesar da importância ecológica, as formigas-cortadeiras são consideradas pragas devido à elevada quantidade de folhas forrageadas, principalmente em áreas utilizadas para o reflorestamento ou agricultura. Estima-se que populações de *Atta laevigatta* e *Atta sexdens* (L.) causem a perda de 14% do volume de madeira em áreas com 5 ninhos/ha; em áreas com mais de 15

ninhos/ha a perda pode atingir 50% nas plantações de pinheiros (HERNANDEZ; JAFFÉ, 1995; DELLA LUCIA; GANDRA; GUEDES, 2014).

Assim, para o controle de formigas-cortadeiras, vários métodos físicos, biológicos e químicos vêm sendo estudados, sendo que o método químico é o mais utilizado atualmente devido a maior eficiência apresentada quando aplicado em larga escala. Contudo, o uso de produtos químicos, que geralmente contém sulfluramida ou diflubenzuron, pode ocasionar a contaminação do solo, da água e resultam em efeitos cumulativos nas teias alimentares (SANTOS et al. 2007; OLIVEIRA et al., 2011).

Dessa forma, torna-se de grande relevância a busca por novos métodos que substituam os inseticidas utilizados para que se tenha um menor impacto ambiental e uma maior eficiência no controle desses insetos. A utilização de métodos alternativos como o biocontrole por fungos precisa ser desenvolvido, por ser uma estratégia promissora, de alta especificidade, baixo custo e mecanismos de ação singulares (DELLA LUCIA; GANDRA; GUEDES, 2014).

2.4 Metabólitos secundários

Produtos naturais são compostos químicos que podem derivar do metabolismo primário ou secundário de organismos vivos, sendo que os polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e ácidos graxos são considerados metabólitos primários, os quais são encontrados em todos os seres vivos; por outro lado, os metabólitos secundários são, no entanto, de baixo peso molecular (P.M.~3000), caracterizando-se pelo fato de serem compostos químicos com grande diversidade funcional, química e taxonômica (BÉRDY, 2004; KELLER, 2005).

Os metabólitos secundários microbianos conhecidos atualmente exibem grande número de efeitos biológicos, atuando como antitumorais, antiparasitários e antimicrobianos. A penicilina, ciclosporina, micotoxinas como a aflatoxina e também a esterigmatocistina são exemplos desses metabólitos. (CALVO et al., 2002; KELLER, 2005, EVANS, 2011).

Alguns dos metabólitos secundários são solúveis e outros são voláteis conhecidos como VOC's (do inglês *Volatile Organic Compounds*), os quais são muitas vezes secretados em resposta à interações inter e intraespecíficas entre fungos e bactérias nos ecossistemas microbianos (WHEATLEY, 2002; EFFMERT et al., 2012).

Os compostos orgânicos voláteis (VOC's) são ricos em carbono, possuem baixo peso molecular, são altamente lipofílicos, possuem baixa solubilidade em água e entram facilmente na fase gasosa a 0,01 kPa a uma temperatura de aproximadamente 20°C (PAGANS et al., 2006; MAFFEI; GERTSCH, 2011).

Dentre os VOCs produzidos por fungos, muitos já foram identificados e pertencem a diversas classes químicas, como: hidrocarbonetos simples, aldeídos, cetonas, alcoóis, fenóis, tioálcoois, tioésteres e seus derivados, incluindo derivados do benzeno e do ciclohexano (MORATH et al, 2012). Já é sabido que alguns fungos produzem diferentes substâncias voláteis as quais podem ser letais para outros micro-organismos patogênicos (STROBEL, 2006).

O desenvolvimento da cromatografia gasosa e da espectrometria de massas tem possibilitado o aumento de estudos dos VOC's, facilitando o monitoramento da produção e de estudos *in vivo* da biossíntese (THOLL et al, 2006).

2.5 Estudos antecedentes produção de VOC's: fungo simbiote e fungos filamentosos

Existem poucos trabalhos publicados relatando a produção de compostos secundários por fungos cultivados pelas formigas da tribo Attini. Os fungos cultivados por *A. octospinosus*, *A. cephalotes* e *A. sexdens* mostraram ter atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (ANGELI-PAPA, 1984). Wang et al. (1999) relataram que o fungo *Tyridiomyces formicarum* cultivado pela formiga attine *Cyphomyrmex minutus* produz compostos antifúngicos, as dicetopiperazinas; entretanto, não há informações sobre produção de VOC's por estes fungos.

Diversos compostos com atividade antimicrobiana já foram isolados a partir de fungos filamentosos, e entre os compostos ativos, os poliacetilenos são os mais amplamente caracterizados. Eles possuem atividade antibiótica e foram isolados a partir de fungos dos gêneros *Clitocybe*, *Coprinus*, *Cortinellus*, *Daedalea*, *Marasmius*, *Merulius*, *Pleurotus*, *Polyporus* e *Poria* (ANKE et al., 1980). No gênero *Aspergillus* foram encontrados oito tipos de compostos, a saber: ciclopentadiona, dicetopiperanzina, lactona, benzofenol, terpeno, antraquinona, éter difenil e alcalóide (XUE et al, 2012).

Os efeitos dos compostos voláteis microbianos contra outros micro-organismos são de interesse para o controle biológico pois já existem relatos da ação de voláteis bacterianos e fúngicos contra fitopatógenos (FIDDAMAN, 1993; PANDEY et al, 1993). Há uma ampla variedade de compostos voláteis como etileno, cetonas, aldeídos, os quais são produzidos pelo gênero *Trichoderma*, que podem exercer importante papel contra fitopatógenos (VEY, et al, 2001).

3

Capítulo 1

Potencial dos fungos filamentosos para o biocontrole da formiga *Atta sexdens rubropilosa*

RESUMO

As formigas-cortadeiras, ao longo da evolução, desenvolveram o hábito de cultivar fungos e utilizá-los como fonte de alimento. Esses insetos utilizam substrato vegetal para o cultivo do fungo mutualista (*Leucoagaricus gongylophorus*). Nesse contexto, devido a íntima relação entre as formigas e o seu mutualista, é de grande relevância selecionar linhagens capazes de interferir negativamente sobre tal fungo. Dessa forma, no presente trabalho, avaliamos linhagens de fungos filamentosos isolados como contaminantes de colônias iniciais da formiga *Atta sexdens rubropilosa* como potenciais candidatos para o desenvolvimento de métodos de controle biológico. Inicialmente, após o isolamento e agrupamento dos isolados, vinte linhagens foram selecionadas para cultivo direto sobre fragmentos de jardim de fungo sem operárias. A partir disso, os testes evoluíram até atingir colônias completas. Combinações das linhagens mais promissoras foram realizadas com a finalidade de avaliar um possível sinergismo das mesmas. Os resultados demonstraram que fungos filamentosos podem utilizar o fungo mutualista das formigas como substrato para o crescimento (micoparasitismo). Dentre esses fungos destacaram-se as linhagens *Trichoderma harzianum* (A215-2), *Trichoderma virens* (A174-1) e *Rhizomucor variabilis* (A073-1), as quais diminuíram o jardim de fungos das colônias e influíram no comportamento das formigas. Estas informações enfatizam o potencial desses fungos para o biocontrole de formigas-cortadeiras.

Palavras-chave: Antagonismo. Controle biológico. Formigas-cortadeiras. *Leucoagaricus gongylophorus*.

3.1. Introdução

A agricultura de grande parte do continente americano, principalmente na América do Sul, sofre grandes prejuízos causados pela ação das formigas-cortadeiras, as quais cortam folhas e flores frescas que utilizam para cultivar fungos específicos como alimento. O fungo mutualista hidrolisa esse substrato vegetal e, além de servir de alimento, gera nutrientes assimiláveis para as formigas (SILVA et al., 2003).

Uma das principais formas de controle das formigas-cortadeiras é o uso de inseticidas químicos formulados em iscas. A sulfluramida (N-etil perfluooctano sulfonamida) é amplamente empregada para essa finalidade devido sua eficácia em eliminar colônias de várias espécies de formigas-cortadeiras, porém, além da toxicidade, é um composto persistente no ambiente (OLIVEIRA et al., 2011). Buscar métodos eficientes e mais amigáveis ao meio ambiente e aos demais seres vivos direta ou indiretamente atingidos pelos efeitos danosos dos inseticidas empregados atualmente para o controle das formigas-cortadeiras tornou-se uma necessidade inadiável.

O uso de fungos patogênicos e antagonistas para as formigas-cortadeiras ou o fungo mutualista pode representar uma estratégia promissora de controle biológico e deve ser buscada. Tal abordagem inclui o estudo dos fungos filamentosos associados aos ninhos das formigas (DELLA LUCIA; GANDRA; GUEDES, 2014).

Dentre os principais gêneros de fungos encontrados em associação com colônias de formigas-cortadeiras temos: *Fusarium*, *Trichoderma*, *Syncephalastrum*, *Trichosporon*, os entomopatogênicos *Beauveria* e *Metarhizium* (DIEHL-FLEIG et al., 1992; FISHER, et al., 1996; ALVES, 1998; RODRIGUES, et al., 2005; BARCOTO, 2016) . Ainda, um gênero que tem chamado a atenção dos pesquisadores é o *Escovopsis*, o qual foi descrito como um parasita específico do fungo das formigas (LITTLE; CURRIE, 2007; CURRIE; MUELLER; MALLOCH, 1999), mas que ainda é muito pouco compreendido.

3.2 Objetivos

- Encontrar fungos que possam se desenvolver como contaminantes no ambiente das formigas-cortadeiras;
- Selecionar linhagens que possam atuar como interferentes na simbiose das formigas com o fungo mutualista;
- Estruturar uma coleção desses fungos na Central de Recursos Microbianos da UNESP, Rio Claro/SP.

3.3 Material e métodos

3.3.1 Isolamento e preservação dos fungos

Foram isolados fungos filamentosos diversos a partir de 215 ninhos iniciais da espécie *Atta sexdens rubropilosa*, provenientes de coletas realizadas por colaboradores da empresa BASF, em três locais: Fazenda Alvorada (Charqueada-SP) Rodovia SP-191, Km 113.; Fazenda Duratex (Lençóis Paulista-SP) Rodovia Marechal Rondon, Km, 293 (Zona Rural) e Fazenda Suzano (Anhembi-SP) Zona Rural. Foram retirados fragmentos dos fungos que estavam se desenvolvendo sobre o jardim de fungo residual. Eles foram semeados em placas de potato-dextrose ágar (PDA) contendo $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cloranfenicol. As placas foram incubadas a 25°C e observadas diariamente e, uma vez detectado o crescimento de fungos, estes foram sub- cultivados até obtenção de cultura pura (cultura monospórica). Os isolados foram mantidos sob duas formas de preservação: (i) a 4°C em MA2% inclinado e (ii) a -80°C em glicerol 10%.

3.3.2 Cultivo direto no jardim de fungo

Para este ensaio foram selecionados 20 fungos. A seleção dos fungos foi realizada escolhendo um fungo de cada gênero, após um agrupamento morfológico baseado no crescimento das colônias, coloração e observação em estereomicroscópio. Tal seleção também priorizou a escolha de fungos que haviam apresentado intensa deterioração dos jardins iniciais.

Os ensaios nos quais o micélio foi inoculado diretamente no jardim de fungo foram realizados segundo o método proposto por Taerum et al. (2007). Esse método consiste em inocular micélio de fungos filamentosos (cultivados previamente em PDA a 25°C , durante sete dias, no escuro) sobre fragmentos de jardim de fungo livre de operárias e larvas. Para tanto, partes de jardim de fungo foram removidos de um ninho de 18 anos de *A. sexdens rubropilosa* mantido no Laboratório de Formigas do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS/IB/UNESP/Rio Claro). Em seguida, essas porções do jardim de fungos foram colocadas em quatro tampas de 35 mm de diâmetro cada e sobre eles foram adicionados pedaços de fungos de aproximadamente $0,5 \text{ cm}^2$. Este arranjo foi mantido dentro de uma placa de Petri (150 mm de diâmetro).

Para o controle foram utilizados fragmentos de mesmo tamanho de PDA sem fungo inoculado. No centro de cada placa foi disposto um pedaço de algodão esterilizado e umedecido com água deionizada. Para avaliar a contaminação do *jardim de fungo*, foram gerados dados categóricos (0 : sem crescimento; 1: crescimento sobre todo o jardim e 2: crescimento sobre todo o jardim e presença de esporulação). Foram realizadas 5 réplicas para cada um dos vinte fungos e cinco réplicas para o controle.

3.3.3 Teste de patogenicidade em sub-colônias de *A. sexdens rubropilosa*

A partir do resultado obtido no “*Cultivo direto no jardim de fungo*”, dez fungos foram selecionados para os testes de patogenicidade em sub-colônias, contendo operárias e fragmentos do jardim de fungo obtidos de uma colônia adulta mantida no Laboratório de Formigas do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS/UNESP/Rio Claro). As sub-colônias foram acondicionadas em conjuntos de três recipientes plásticos interligados por tubos, sendo um deles destinado ao jardim de fungo, outro para o forrageamento e o terceiro para o descarte (lixo). Para manter a umidade do jardim de fungo, uma camada de aproximadamente 1,0 cm de espessura de gesso foi colocada no recipiente central, antes dos testes. Para evitar fuga das operárias foi aplicada fina camada de Teflon® nas bordas dos recipientes. Quatro réplicas foram utilizadas para cada linhagem de fungo e o teste consistiu em colocar 1,0 mL de suspensão padronizada de 10^8 esporos/mL em Tween® 80 0,05% na superfície dos fragmentos de jardim. Ao grupo controle foi adicionado sobre a superfície do jardim 1,0 mL de solução 0,05% de Tween® 80.

As sub-colônias foram mantidas durante 21 dias, alimentadas com folhas de *Eucalyptus* sp., e os seguintes aspectos foram observados ao longo desse período: corte de folhas, mortalidade de operárias, condições gerais da subcolônia e separação de lixo. Estes aspectos foram avaliados com base na escala de quantificação (BARCOTO, 2015).

3.3.4 Teste de patogenicidade em sub-colônias de *A. sexdens rubropilosa* utilizando mix de fungos

Tal teste foi realizado utilizando as quatro linhagens que apresentaram os melhores resultados no teste mencionado no item 3.3. As combinações foram feitas par a par e também

juntando as 4 linhagens, totalizando 7 conjuntos. A montagem do teste e a obtenção dos resultados foram realizados conforme o item 3.3.

3.3.5 Teste de patogenicidade em colônias de *A. sexdens rubropilosa* utilizando mix de fungos.

Para este experimento foram selecionados dois conjuntos de fungos que apresentaram resultados promissores no item 3.3.3.

As colônias, que tinham em média dois anos, estavam montadas em conjuntos de três recipientes plásticos interligados por tubos, sendo um recipiente destinado ao jardim de fungo, um recipiente para o forrageamento e outro para o descarte (lixo) da colônia. Para manter a umidade do jardim de fungo, uma camada de aproximadamente 1,0 cm de espessura de gesso foi adicionada no recipiente central.

Foram utilizadas três réplicas para cada mistura de duas linhagens de fungo. Na superfície do jardim foi inoculado 5,0 mL de suspensão padronizada de 10^8 esporos/mL em Tween® 80 0,05% de cada fungo. O grupo controle recebeu 5,0 mL de solução 0,05% de Tween® 80. As colônias foram avaliadas durante 21 dias, de acordo com o método citado no item 3.3.

3.3.6 Teste de patogenicidade em colônias de *A. sexdens rubropilosa* utilizando mix de fungos: técnica de polvilhamento

Para este teste foi selecionado o conjunto de fungos composto por *Trichoderma harzianum* (A215-2) e *Trichoderma virens* (A174-1). Os fungos foram cultivados em meio BDA a 25°C durante 7 dias. Após o crescimento, foi feita a suspensão dos esporos em Tween® 80 (0,05%). Obtida a suspensão, esta foi colocada para secar a 35°C. Após a secagem, pesou-se 0,1g de esporo, e em seguida fez-se uma suspensão com a finalidade de saber quantos esporos haviam em 0,1g. Após esse procedimento, esporos de cada fungo foram pesados separadamente a fim de obter 10^9 esporos, os quais foram misturados à 0,5 g de amido de milho e 0,5g de maltodextrina. Obtida a mistura em pó, foi realizado o polvilhamento com auxílio de um frasco com a tampa perfurada. Os jardins de fungo de três colônias foram polvilhados.

3.3.7 Teste de patogenicidade em colônias de *A. sexdens rubropilosa* utilizando mix de fungos: técnica de nebulização

Para este teste foi selecionado o mesmo conjunto de fungos *Trichoderma harzianum* (A215-2) e *Trichoderma virens* (A174-1) utilizado para o teste de polvilhamento. Os fungos foram crescidos em meio BDA a 25°C durante 7 dias. Após o crescimento, foi feita a suspensão dos esporos em Tween® 80 (0,05%), obtendo uma concentração de 10³ esporos/mL. Por fim, 1,5 mL de cada suspensão foi nebulizada com auxílio de compressor de pistão Compbrasil® 550-8L e de Micro-inalador I-205/12V NS® ao qual foi adicionado 1,5mL de cada suspensão, resultando na adição final de 10⁹ esporos por colônia. Para o controle foi nebulizado apenas a solução de Tween® 80 (0,05%). O experimento foi realizado em triplicata.

3.3.8 Viabilidade dos esporos

Para determinar a viabilidade dos esporos dos fungos utilizados nas colônias, as linhagens foram cultivadas a 25 °C em meio *Potato Dextrose Agar* (PDA) por 7 dias. Após este período, os esporos foram suspensos em Tween® 80 (0,05%) e, utilizando placas de Elisa, foram preparadas concentrações de 10³, 10⁴, 10⁵ e 10⁶ conídios.mL⁻¹. Após 24 horas, utilizando câmara de Neubauer, fez-se a contagem dos esporos germinados e as porcentagens de viabilidade de cada linhagem foram calculadas.

3.3.9 Caracterização polifásica dos isolados de fungos filamentosos

A identificação dos vinte fungos que foi realizada empregando marcadores morfológicos e moleculares.

3.3.10 Marcadores morfológicos

Inicialmente os fungos foram agrupados em nível de gênero, segundo as características macromorfológicas das colônias, avaliando a cor e quantidade de micélio aéreo, padrão de crescimento (ELLIS, 1971, 1976; SUBRAMANIAN, 1971; DOMSCH et al., 1980; SAMSON

et al., 2000) em meio Batata Dextrose Agar (BDA). No caso das culturas com marcadores fenotípicos insuficientes para uma identificação morfológica, foi realizado sequenciamento do DNA, utilizando-se as técnicas descritas abaixo.

3.3.11 Marcadores moleculares: Extração de DNA, Amplificação e Sequenciamento

A extração de DNA dos isolados foi realizada de acordo com o método CTAB (cetiltrimetil brometo de amônio), adaptado de Moller et al. (1992) e Gerardo et al. (2004). A região ITS (*internal transcribed spacer*) do genoma de cada fungo foi sequenciada. Para algumas linhagens a região ITS não foi satisfatória, dessa forma utilizou-se a região *large subunit* RNA – LSU .

A região de interesse foi amplificada utilizando reações de 25 µL de volume final e os *primers* ITS4 e ITS5 ou LSU1fd e LRS com base nas seguintes condições: 94 °C/3minutos, seguido de 35 ciclos a 94 °C/1minuto, 55 °C/1minuto, 72 °C/2minuto, 10 °C/∞. A confirmação da amplificação foi realizada através da visualização em gel de agarose 1% (em TBE 1x) e coloração com *GelRed*TM (Biotium).

As amostras foram purificadas utilizando *Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega) e em seguida foram quantificadas em *NanoDrop* (Thermo Scientific). Uma quantidade de 20 ng do produto de amplificação purificado foi utilizada na reação de sequenciamento utilizando *BigDye Terminator v.3.1 Sequencing Kit* (Life Technologies), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Os *primers* utilizados na reação de sequenciamento foram os mesmos empregados na reação de amplificação. As sequências *forward* e *reverse* de cada isolado foram geradas utilizando o sistema ABI 3330 (Life Technologies). As sequências foram reunidas em *contigs* utilizando o software BioEdit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999). A comparação dos *contigs* obtidos foi realizada nos bancos de acesso público (*online*) como o NCBI-GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.4. Resultados

3.4.1 Identificação dos isolados

A partir de 215 ninhos iniciais, foram obtidos 85 isolados de fungos (Anexo 1). Dos ninhos provenientes da Fazenda Duratex (Lençóis Paulista-SP), nenhum fungo foi isolado devido as más condições que se encontravam os ninhos iniciais. Após o isolamento, foi realizado um agrupamento preliminar, baseado nas características macromorfológicas das linhagens, resultando em *Fusarium* (20), *Trichoderma* (19), *Aspergillus* (03); *Mucor* (24) *Cunninghamella* (11 isolados) e sem classificação (10). Dentre esses 85 isolados, 20 foram selecionados para prosseguir os experimentos. Os fungos selecionados para os experimentos foram identificados por sequenciamento do DNA (Tabela 1).

Tabela 1- Identificação molecular de 20 fungos selecionados

Código	Identificação	Região	P.B	Código de acesso	Query Coverage	Max id
A142	<i>Fusarium falciforme</i>	LSU	728	KM401893.	100%	90%
A217(2)	<i>Fusarium chlamyosporum</i>	LSU	680	KJ126422.1	100%	98%
A036	<i>Fusarium oxysporum</i>	ITS	556	KU872840.	100%	99%
A031(2)	<i>Fusarium</i> sp.	ITS	534	KT313637.1	100%	99%
A170(2)	<i>Fusarium</i> sp.	ITS	572	KT313637.1	99%	100%
A071	<i>Fusarium equiseti</i>	ITS	484	KU926350.	100%	99%
A215(2)	<i>Trichoderma harzianum</i>	ITS	606	KR856216.	100%	99%
A174(1)	<i>Trichoderma virens</i>	ITS	602	KP056781.2	100%	99%
A102(2)	<i>Trichoderma spirale</i>	ITS	579	KT278857.1	100%	100%
A020	<i>Trichoderma harzianum</i>	ITS	603	KC478545.	100%	100%
A165(2)	<i>Trichoderma spirale</i>	ITS	583	JQ040382.1	100%	100%
A155(2)	<i>Trichoderma virens</i>	ITS	592	KP056781.2	100%	100%
A184(1)	<i>Trichoderma harzianum</i>	ITS	599	KT336515.1	100%	99%
A196	<i>Trichoderma hamatum</i>	ITS	565	KR093827.	100%	100%
A139(E)	<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	ITS	606	AY373866.	100%	99%
A140	<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	ITS	599	FJ878633.1	98%	98%
A073(1)	<i>Rhizomucor variabilis</i>	ITS	620	HM623314.	100%	97%
V006	<i>Mucor</i> sp.	ITS	563	HM770967.	100%	99%
A078	<i>Eutypa linearis</i>	LSU	746	KU863138	100%	95%
A167	<i>Penicillium shearii</i>	ITS	556	AJ004893.1	100%	99%

3.4.2. Cultivo direto no jardim de fungo

Cinco dias após a introdução dos isolados contaminantes, os jardins de fungos sem operárias apresentaram, em sua maioria, o crescimento de fungos filamentosos (Tabela 2). Os fungos *Eutypa linearis* A078, *Trichoderma spirale* A165(2), *T. harzianum* A020, *F. oxysporum* A036, *F. falciforme* A142 não cresceram sobre o jardim de fungo. Já os fungos *Trichoderma hamatum* A196, *Fusarium* sp. A031(1), *Fusarium chlamydosporum* A217(2) cresceram mas não esporularam. Os demais cresceram e esporularam, sendo que duas linhagens de *T. harzianum* A184(1) e A215(2) foram as que esporularam mais rapidamente.

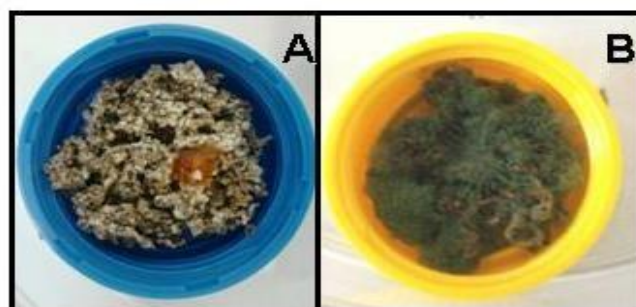
Tabela 2. Crescimento e esporulação dos fungos nos *jardins de fungos*.

Código	Descrição	Dias				
		1	2	3	4	5
A 215(2)	<i>Trichoderma harzianum</i>	3/5	5/5*	5/5	5/5	5/5
A078	<i>Eutypa linearis</i>	0/5	0/5	0/5	1/5	1/5
A102(2)	<i>Trichoderma spirale</i>	2/5	4/5	4/5	5/5*	5/5
A165(2)	<i>Trichoderma spirale</i>	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
A020	<i>Trichoderma harzianum</i>	0/5	0/5	0/5	1/5	1/5
A036	<i>Fusarium oxysporum</i>	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
A142	<i>Fusarium falciforme</i>	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
A174(1)	<i>Trichoderma virens</i>	4/5	5/5	5/5*	5/5	5/5
A196	<i>Trichoderma hamatum</i>	1/5	1/5	2/5	2/5	3/5
A073 (2)	<i>Rhizomucor variabilis</i>	4/5	5/5	5/5*	5/5	5/5
A170(2)	<i>Fusarium</i> sp.	4/5	4/5	4/5*	5/5	5/5
A167	<i>Penicillium shearii</i>	3/5	3/5	4/5	4/5*	5/5
A140	<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	3/5	3/5	3/5	3/5*	5/5
A031(2)	<i>Fusarium</i> sp.	2/5	2/5	4/5	4/5	4/5
V006	<i>Mucor</i> sp.	2/5	4/5	5/5*	5/5	5/5
A155(2)	<i>Trichoderma virens</i>	2/5	2/5	2/5	3/5	3/5
A217(2)	<i>Fusarium chlamydosporum</i>	2/5	2/5	2/5	3/5	3/5
A139 (E)	<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	2/5	3/5	4/5	5/5*	3/5
A184(1)	<i>Trichoderma harzianum</i>	4/5	5/5*	5/5	5/5	5/5
A071	<i>Fusarium equiseti</i>	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
-	Controle	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

Os valores indicam: o número de réplicas em que o fungo cresceu / o número total de réplicas. (*) significa esporulação.

Até o terceiro dia de experimento, os jardins apresentaram tonalidade bege com algumas regiões de marrom escuro na presença dos fungos. Ao final de cinco dias, os jardins apresentaram coloração escura. Os controles dos jardins mantiveram sua tonalidade original (Figura 1).

Figura 1 – Cultivo direto no jardim de fungo. (A) =Controle (não inoculado com coloração mais clara) (B)=*Trichoderma harzianum* A184 (1) sobre o jardim de fungo, após 5 dias .

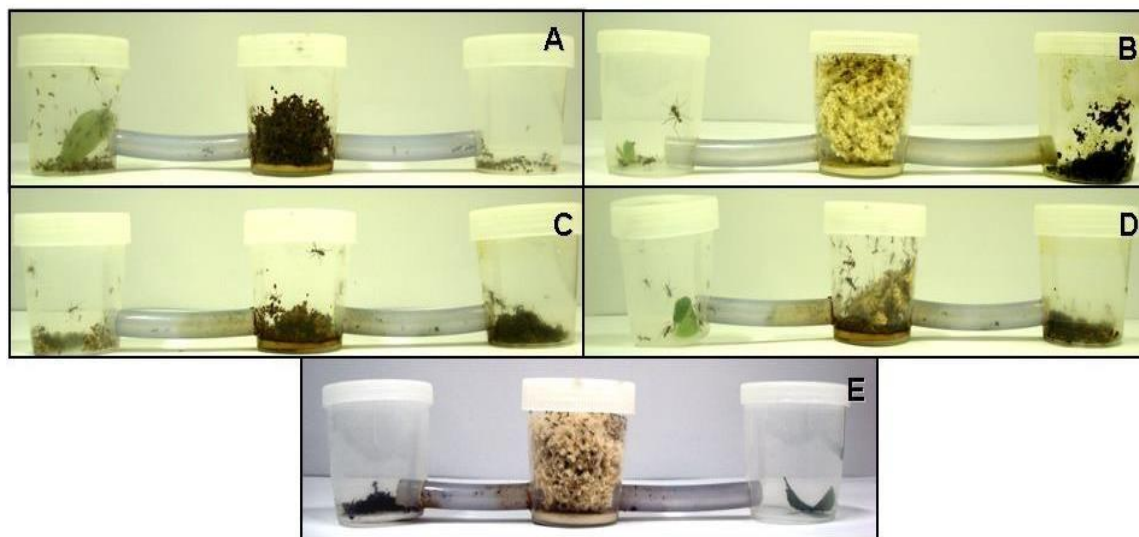


A partir dos resultados obtidos nesse experimento, dez linhagens: *Trichoderma harzianum* A215(2); *Trichoderma harzianum* A184(1); *Aspergillus sclerotiorum* A139(E); *Mucor* sp. V006; *Aspergillus sclerotiorum* A140; *Penicillium shearii* A167; *Fusarium* sp A170(2); *Rhizomucor variabilis* A073(2); *Trichoderma virens* A174(1); *Trichoderma spirale* A102(2) foram selecionadas para o prosseguimento dos experimentos.

3.4.3 Teste de patogenicidade em sub-colônias de *A. sexdens rubropilosa*

A partir das informações obtidas durante o experimento, foi utilizada uma tabela para análise segundo Barcoto (2016). Observou-se que quatro linhagens interferiram nas condições do jardim de fungos (Figura 2), com morte do jardim em pelo menos três das cinco sub-colônias tratadas com *Rhizomucor variabilis* A073, *Trichoderma virens* A174-1 e *Trichoderma harzianum* A184-1. No conjunto de sub-colônias tratadas com *Trichoderma harzianum* A215-2 não ocorreu morte das sub-colônias; entretanto, foi observado crescimento do fungo (A215-2) no material de descarte dessas sub-colônias. Observou-se também, desde os primeiros dias, uma maior quantidade de produção de lixo quando comparado com o controle.

Figura 2 – Sub-colônias: contendo *Rhizomucor variabilis* A073 (A), *Trichoderma harzianum* A215-2 (B), *Trichoderma virens* A174-1 (C), *Trichoderma harzianum* A184-1 (D) e sem inóculo – controle (E). Colônias com 21 dias.



As sub-colônias tratadas com *Trichoderma virens* A174-1 tiveram alteração no forrageamento e a partir do segundo dia de experimento já foi observada a diminuição do jardim nas réplicas. A morte das cinco sub-colônias ocorreu dez dias após o início do experimento.

Em relação às sub-colônias tratadas com *Rhizomucor variabilis* A073, foi observado o acúmulo de lixo junto ao jardim de fungo e diminuição do mesmo. As sub-colônias tratadas com *Trichoderma harzianum* A184-1, também apresentaram diminuição no jardim de fungo, além de ser observada uma maior mortalidade de formigas.

Com as demais seis linhagens utilizadas nesse experimento não foi possível observar maiores alterações nas sub-colônias. Assim, quatro linhagens que apresentaram bons resultados (*Rhizomucor variabilis* A073, *Trichoderma harzianum* A215-2, *Trichoderma virens* A174-1 e *Trichoderma harzianum* A184-1) foram selecionadas para as etapas seguintes

3.4.4 Teste de patogenicidade em sub-colônias de *A. sexdens rubropilosa* utilizando consórcio de fungos.

Esse teste foi realizado utilizando os fungos: *Rhizomucor variabilis* A073, *Trichoderma harzianum* A215-2 e A184-1 e *Trichoderma virens* A174-. Foram feitas

combinações (pares) e também uma combinação com os quatro fungos, totalizando sete combinações, e para cada combinação, foram feitas quatro réplicas.

A combinação entre *Trichoderma harzianum* A215-2 *Trichoderma virens* A174- 1 alterou as condições das sub-colônias já nos primeiros minutos após a inoculação dos fungos, onde as pupas foram carregadas pelas operárias para outra câmara (Figura 3). Tal fato ocorreu nas quatro réplicas. Ainda nesse conjunto, foi observada a morte das sub-colônias após 11 dias de inoculação dos fungos.

Figura 3 – Sub-colônia contendo mix *Trichoderma harzianum* A215-2 *Trichoderma virens* A174-1. Visão geral da sub-colônia (A). Detalhe das pupas carregadas pelas operárias (B).



Em uma das combinações (*Rhizomucor variabilis* A073 e *Trichoderma virens* A174) foi observado diminuição do *jardim de fungo* após seis dias, bem como acúmulo de lixo junto ao jardim de fungos e também ocorreu das formas jovens serem levadas para outra câmara (Figura 4). Nas demais combinações as sub-colônias não sofreram grandes danos.

Figura 4 – Sub-colônia contendo mix *Rhizomucor variabilis* A073 e *Trichoderma virens* A174. Visão geral da sub-colônia (A). Detalhe do jardim contendo lixo e crescimento do fungo (B).



A partir desse ensaio foram selecionadas as combinações *Rhizomucor variabilis* A073 e *Trichoderma virens* A174-1; *Trichoderma harzianum* A215-2 e *Trichoderma virens* A174-1 para os testes com colônias jovens de *Atta sexdens rubropilosa*.

3.4.5 Teste de patogenicidade em colônias de *A. sexdens rubropilosa* utilizando consórcio de fungos

Nesses ensaios foram utilizados os mesmos parâmetros de leitura. As colônias tratadas com *Trichoderma harzianum* A215-2 e *Trichoderma virens* A174-1 apresentaram o mesmo comportamento das sub-colônias logo após a inoculação dos fungos: as pupas foram carregadas pelas operárias para fora do jardim de fungo (Figura 5).

Figura 5 – Pupas sendo carregadas pelas operárias após inoculação dos esporos



Além disso, nesse tratamento, foi também observada tentativa de descontaminação do jardim de fungo, onde considerável quantidade de lixo foi produzido e também constatou-se crescimento dos fungos inoculados junto ao descarte.

O tratamento com a combinação dos fungos *Rhizomucor variabilis* A073 e *Trichoderma virens* A174-1 também apresentou a tentativa de descontaminação do jardim de fungo bem como o crescimento dos fungos inoculados junto ao descarte.

Entretanto, em ambas as combinações não houve a morte total de nenhuma das colônias. As alterações observadas foram a diminuição do jardim de fungos e também na aparência do mesmo.

3.4.6. Teste de patogenicidade em colônias de *A. sexdens rubropilosa* utilizando mix de fungos: técnica de polvilhamento

Para a técnica de polvilhamento foi selecionada a combinação *T. harzianum* (A215-2) e *T. virens* (A174-1). Logo após o polvilhamento, houve alteração no comportamento

das formigas, as quais mudaram as pupas de lugar, mas não as levaram para fora do jardim como nos experimentos anteriores. Já no primeiro dia foi observado o crescimento de contaminação no material de descarte (Figura 6). As condições gerais das três réplicas foram mantidas, onde o corte de folhas permaneceu normal, ocorrendo pouca diminuição no jardim de fungos e início de mudança do jardim de fungos para outra repartição.

Figura 6 – Crescimento (contaminação) no material de descarte após 1 dia de inoculação da combinação de *T. harzianum* (A215-2) e *T. virens* (A174-1).



3.4.7 Teste de patogenicidade em colônias de *A. sexdens rubropilosa* utilizando mix de fungos: técnica de nebulização

Para a técnica de nebulização também foi selecionada a combinação *T. harzianum* (A215-2) e *T. virens* (A174-1). Nessa técnica não houve alteração no comportamento das formigas, tal como foi observado nos experimentos anteriores. Ao final do experimento, as condições gerais das três réplicas foram mantidas, onde o corte de folhas permaneceu normal, não houve diminuição no jardim de fungos e não foi constatada a contaminação por *Trichoderma*.

3.4.8 Viabilidade dos esporos

O teste de viabilidade dos esporos revelou que a taxa de germinação em Tween 80 (0,005%) é maior nas espécies de *Trichoderma harzianum* A215(2) e *Trichoderma virens* A174 (1), os quais apresentaram, respectivamente, 86% e 83% de esporos viáveis. Já a linhagem de *Rhizomucor variabilis* A073 apresentou 78% de viabilidade.

3.5 Discussão

A variedade de fungos filamentosos presentes nos jardins de fungo das formigas-cortadeiras já foi relatada em trabalhos anteriores (RODRIGUES et al., 2005a; 2008), sendo que muitos desses fungos são considerados potenciais antagonistas de *L. gongylophorus*.

Dentre os vinte fungos selecionados para os experimentos iniciais, 10 mostraram potencial contra o fungo *L. gongylophorus*, utilizando-o como substrato para crescimento, sendo que quatro desses fungos pertencem ao gênero *Trichoderma*. Podemos citar *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma virens* como exemplos de fungos micoparasitas necrotróficos, os quais também apresentam capacidade de crescerem como competidores saprofíticos de outros fungos (JEFFRIES, 1995). Os gêneros *Fusarium* e *Mucor*, os quais mostraram potencial contra o fungo mutualista, já foram encontrados em jardim de formigas-cortadeiras previamente tratadas com inseticidas (RODRIGUES et al. 2005).

No entanto, quando os dez fungos que haviam crescido sobre fragmentos de jardim na ausência de formigas foram testados em sub-colônias e, posteriormente, nas colônias, nem todos se desenvolveram sobre o *jardim de fungos*, sendo que o crescimento foi observado apenas nas sub-colônias. A ausência de contaminação dos jardins das colônias pode estar relacionada com a presença de maior número de formigas, pois como já relatado em alguns estudos, o crescimento de micro-organismos nos jardins também pode ser impedido quimicamente. Isso se dá através da produção de compostos antissépticos pelas glândulas metapleurais, como ácido fenilacético, ácido indolacético e 3-hidroxicanônico, por exemplo (FISHER; STRADLING; PEGLER, 1994; CURRIE, 2001a; POULSEN et al., 2002; FERNÁNDEZMARÍN et al., 2006). Ainda, as glândulas mandibulares também podem produzir compostos bioativos pois a secreção destas glândulas inibe a germinação *in vitro* de esporos de *S. racemosum*, *Cunninghamella elegans*, *Fusarium solani*, e *Trichoderma harzianum* (RODRIGUES et al, 2008).

Os resultados obtidos durante os testes de consórcio indicaram que a combinação de dois fungos causa alterações nas colônias, sendo que os comportamentos de defesa foram executados, como a remoção de fragmentos do jardim de fungos. Também, logo após co-infecção *T. harzianum* e *T. virens*, as pupas foram removidas do jardim e transportadas para a câmara de descarte, onde fragmentos do jardim foram depositados sobre elas. De acordo com

Jaccoud et al. (1990) os indivíduos transportados estão contaminados por conídios do fungo e são removidos para outro local com a finalidade de evitar a contaminação dos outros indivíduos.

Em relação aos métodos de dispersão (nebulização e polvilhamento) de esporos, os resultados demonstraram que as metodologias precisam ser otimizadas. Ambos os métodos causaram poucas perturbações nas condições das colônias. Estas perturbações foram mais pronunciadas nos seis primeiros dias, onde as operárias retiraram os fragmentos de jardim contaminados. De acordo com Jaccoud et al. (1999) a utilização de esporos livres de outras formulações é mais eficiente, pois dificulta a manipulação pelas formigas.

3.6 Conclusão

Os isolados de *Trichoderma harzianum* (A215-2), *Trichoderma virens* (A174-1) e *Rhizomucor variabilis* (A073-2) apresentaram pronunciado efeito contra o fungo mutualista *L. gongylophorus* presente no jardim de fungos e atuaram como micoparasitas. Além disso, a combinação entre *Trichoderma harzianum* (A215-2) e *Trichoderma virens* (A174-1) impactou negativamente as colônias, causando danos ao jardim de fungos e alterando o comportamento das operárias. Assim, faz-se necessário aprofundar esses estudos, especialmente buscando uma forma de otimizar a aplicação desses fungos visando o desenvolvimento de um método eficaz de controle das formigas-cortadeiras.

4

Capítulo 2**Ação dos fungos filamentosos frente ao fungo mutualista *L. gongylophorus***

RESUMO

Os fungos filamentosos contaminantes isolados a partir de colônias iniciais de *Atta sexdens rubropilosa* são promissores para serem utilizados no controle biológico. Neste trabalho buscamos elucidar através de testes *in vitro* a produção de compostos orgânicos voláteis (VOC's) das linhagens de *Trichoderma harzianum*(A215-2), *Trichoderma virens* (A174-1) e *Rhizomucor variabilis* (A073-1) quando co-cultivadas com o fungo mutualista das formigas-cortadeiras. Isto porque uma vez considerada a íntima relação entre as formigas e o seu mutualista, é de grande valor ao controle biológico selecionar linhagens capazes de interferir negativamente sobre o fungo mutualista, e saber qual composto pode atuar nessa interferência. O perfil de VOC's secretado pelas culturas revelou a presença do álcool alifático **1-octen-3-ol**, o qual possui efeitos fungicidas e fungistáticos, mostrando dessa forma, seu potencial contra o fungo mutualista. Ainda, durante os experimentos, notou-se escurecimento do fungo mutualista quando este foi co-cultivado com *R. variabilis*. Para tanto, fez-se também microscopia eletrônica de varredura (MEV) desse co-cultivo, buscando elucidar tal interação. A partir das análises, notamos a ação física do fungo filamentoso *R. variabilis* frente ao fungo mutualista *L. Gongylophorus*. Tais resultados ressaltam o potencial uso desses fungos filamentosos para o biocontrole das formigas-cortadeiras.

Palavras-chave: Compostos orgânicos voláteis. Controle Biológico. *L. gongylophorus*.

4.1 Introdução

Considerados micro-organismos contaminantes dos ninhos, os microfungos ocorrem em abundância nos *jardins de fungo* de diversas espécies de formigas-cortadeiras. Representantes dos gêneros *Escovopsis*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Syncephalastrum*, *Trichosporon*, leveduras e diversos fungos melanizados foram encontrados em associação com as formigas-cortadeiras. (LITTLE; CURRIE, 2007, 2008; GUEDES et al. 2012; DUARTE et al, 2014).

Durante o século XX, a busca por metabólitos secundários ou a descoberta de enzimas para novas aplicações, impulsionou a bioprospecção de micro-organismos, e, numa ampliação deste cenário, os VOC's (do inglês, *Volatile Organic Compounds*), até então pouco explorados, também passaram a ser o foco das investigações (MORATH et al. 2012).

Wheatley et al. (1997) constataram a produção de compostos orgânicos voláteis como 2-propanone, 2-methyl- 1 -butanol, heptanal, octanal e decanal, por isolados do gênero *Trichoderma*, inibindo o crescimento de quatro linhagens de fungos (*Neolentinus lepideus*, *Postia placenta*, *Gloeophyllum trabeum*, *Coriolus versicolor*) evidenciando o uso potencial em controle biológico.

Os VOC's apresentam baixo peso molecular, baixo ponto de ebulição e caráter lipofílico, propriedades que facilitam a evaporação e dispersão na atmosfera (EFFMERT et al., 2012). Os VOC's produzidos por fungos basidiomicetos e ascomicetos incluem álcoois, terpenos, aldeídos, cetonas, sesquiterpenos e compostos aromáticos (WHEATLEY et al., 1997; WHEATLEY, 2002).

4.2. Objetivos

- Avaliar a produção de VOC's quando os fungos são cultivados separadamente, bem como quando estes forem co-cultivados com o fungo mutualista.
- Identificar os compostos produzidos visando uma futura utilização dos mesmos em métodos de controle biológico.
- Estudar as interações físicas do fungo *R. variabilis* frente ao *Leucoagaricus gongylophorus*

4.3. Material e métodos

4.3.1 Produção de Compostos Orgânicos Voláteis

Os fungos selecionados para a análise de voláteis foram aqueles que tiveram resultados promissores frente ao fungo mutualista quando inoculados em jardim de fungos de formiga cortadeira (Capítulo 1), sendo eles: *Trichoderma harzianum* A215-2; *Rhizomucor variabilis* A073-1; *Trichoderma virens* A174-1

Para os ensaios utilizou-se a metodologia descrita por Strobel et al. (2001) modificada. Utilizaram-se placas de Petri (90cm x 15cm) contendo o meio PDA (Potato Dextrose Agar, Difco). As placas foram perfuradas nas laterais com a finalidade de inserir a fibra SPME Stable Flex, 50/30 DVB/CAR/PDMS após o período de incubação. Para evitar o contato físico entre os fungos através do meio de cultivo, foram retiradas partes do PDA de modo a estabelecer dois e três espaços entre os fungos.

Os fungos foram semeados a partir de culturas em PDA mantidas no escuro por 7 dias/25°C. As leituras dos VOC's foram feitas após 7 dias de crescimento utilizando para a detecção o suporte SPME (Solid-Phase Micro-Extraction) com a fibra SPME Stable Flex, 50/30 DVB/CAR/PDMS (divinylbenzene/carboxen on polydimethylsiloxane) o qual foi introduzido pelo orifício lateral da placa. Após 1h de exposição da fibra, o SPME foi inserido no cromatógrafo a gás (Agilent, Série 6890, Shimadzu) com detector seletivo de massas com sistema quadruplo (GC-MSD: Agilent MS 5973 *Network*), equipado com coluna CP-Sil8 CB (30 m x 0.25 µm)

Os controles consistiram apenas em meio PDA, sem a presença dos fungos. A identificação preliminar dos VOC's produzidos foi realizada comparando os voláteis obtidos com os compostos da biblioteca NIST11.

4.3.2 Estudo das interações físicas entre *Rhizomucor variabilis* e o fungo mutualista *L. gongylophorus* por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Neste trabalho foi realizado ensaio de antagonismo para avaliar a interação física entre *Rhizomucor variabilis* frente ao fungo *L. gongylophorus*, sendo que tal fungo alterou a

coloração da colônia de *L. gongylophorus* quando foi feito co-cultivo para avaliar a produção de voláteis.

Em uma placa de Petri contendo meio PDA, foi adicionado um fragmento de membrana de diálise para facilitar o preparo e consequente análise em microscópio eletrônico de varredura. Em seguida, um disco de micélio do fungo filamentos teste foi inoculado a uma distância de 1,5 cm de um disco de micélio do fungo mutualista (5 mm de diâmetro). As placas foram incubadas a 25 °C e monitoradas para determinar o momento em que as hifas do fungo *Rhizomucor variabilis* estabelecessem contato com as hifas de *L. gongylophorus*.

No momento do encontro das hifas, as placas foram fixadas com tetróxido de ósmio e, após quatro dias, com o auxílio de um bisturi e uma pinça, o fragmento do fungo mutualista foi destacado da placa e transferido para um suporte de alumínio. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em banhos de acetona com concentração gradativa de 50, 75, 90, 95 e 100%. Após a desidratação em ponto crítico (Balzers CPD030), o material foi colado com fita adesiva dupla face em suportes de alumínio (*stubs*) e metalizado com ouro em *Sputtering* (Balzers SCD050). Após banho de ouro, o material foi examinado em microscópio eletrônico de varredura (Hitachi TM300). O método empregado no preparo das amostras foi adaptado de Mello et al. (2008).

Além do experimento de antagonismo, para efeitos de comparação durante as análises microscópicas, o fungo mutualista e o fungo *R. variabilis* foram cultivados separadamente (controles) e, posteriormente, foram tratados conforme descrito anteriormente.

4.4. Resultados

4.4.1. Compostos orgânicos voláteis

A análise dos resultados do GC/MS indicou que *L. gongylophorus* (FF2006), *T. harzianum* (A215-2), *R. variabilis* (A073-1), *T. virens* (A174-1) produziram: 23, 17, 5 e 2 VOC's, respectivamente durante os sete dias de cultivo (Tabelas 1,2,3,4).

Tabela 1. Compostos voláteis produzidos pelo *T. harzianum* (A215-2) após 7 dias de crescimento a 25°C em meio PDA usando a fibra SPME

Nº	RT (min)	Possível composto	Peso mol.	Fórmula	Similaridade (%)
1	7,605	Oxyme Methoxy Phenyl	151	C ₈ H ₉ NO ₂	85
2	10,475	1-Octen-3-ol	128	C ₈ H ₁₆ O	96
3	11,645	Cyclotetrasiloxane octamethyl	296	C ₈ H ₂₄ O ₄ Si ₄	87
4	14,560	2-Octen-1-ol	128	C ₈ H ₁₆ O	86
5	15,465	Cyclotrisiloxane,hexamethyl	222	C ₆ H ₁₈ O ₃ Si ₃	85
6	16,800	Benzaldehyde-2,5-bis(trimethylsilyloxy	282	C ₁₃ H ₂₂ O ₃ Si	70
7	17,615	4H-Pyran-4-one,2,3,dihydro-3,5-dihydroxi-6-methyl	144	C ₆ H ₈ O ₄	86
8	18,595	Sulfurous acid,2-ethyl hexyl isobutyl ester	250	C ₁₂ H ₂₆ O ₃ S	87
9	19,885	Dodecane	170	C ₁₂ H ₂₆	94
10	27,400	4-(2,2-Dimethyl-6-methylecyclohexyl)butanal	194	C ₁₃ H ₂₂ O	71
11	27,760	2-Oxiramehanol-2-t-butyl dimethylsilyloxymethyl-acetate	274	C ₁₃ H ₂₆ O ₄ Si	65
12	27,900	Dodecene-1-chloro	204	C ₁₂ H ₂₅ Cl	75
13	28,435	1-Methyl-1-(3methylbutyl)oxy-1-silacyclobutane	172	C ₉ H ₂₀ OSi	69
14	31,215	2-oxovaleric acid, tertbutyldimethylsilyl ether	230	C ₁₁ H ₂₂ O ₃ Si	71
15	33,050	1-Trimethylsilyloxy-2-methyl-4-methoxybutane	190	C ₉ H ₂₂ O ₂ Si	61
16	33,405	Isosorbide,bis(tert butyldimethylsilyl ether)	374	C ₁₈ H ₃₈ O ₄ Si	63
17	34,230	2,2,4,7,10-Pentamethyl 3,6,9,12 -tetraoxa-2-silapentadecane	306	C ₁₅ H ₃₄ O ₄ Si	64

Tabela 2. Compostos voláteis produzidos pelo *T. virens* (A174-1) após 7 dias de crescimento a 25°C em meio PDA usando a fibra SPME

N°	RT (min)	Possível composto	Peso mol.	Fórmula	Similaridade (%)
1	28,695	2-oxyramethanol,2-t-butyl dimethyl acetate	274	C ₁₃ H ₂₆ O ₄ Si	75
2	33,425	1,3-diisoprpxy-1,3-dimethyl-1,3-desilacyclobutane	231	C ₁₀ H ₂₄ O ₂ Si	62

Tabela 3. Compostos voláteis produzidos pelo *Rhizomucor variabilis* (A073-1) após 7 dias de crescimento a 25°C em meio PDA usando a fibra SPME

N°	RT (min)	Possível composto	Peso mol.	Fórmula	Similaridade (%)
1	19,230	Octanoic acid	144	C ₈ H ₁₆ O ₂	95
2	22,565	Nonoic acid	158	C ₉ H ₁₈ O ₂	86
3	25,985	Decanoic acid	170	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	90
4	26,250	n-decanoic acid	172	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	95
5	42,260	l(+) ascorbic acid 2,6 dihexadecaboate	652	C ₃₈ H ₆₈ O ₈	93

Tabela 4. Compostos voláteis produzidos pelo *L. gongylophorus* (FF2006) após 7 dias de crescimento a 25°C em meio PDA usando a fibra SPME.

N°	RT (min)	Possível composto	Peso mol.	Fórmula	Similaridade (%)
1	5,145	Cyclotrisiloxane,hexamethyl	222	C ₆ H ₁₈ O ₃ Si ₃	92
2	7,585	Styrene	104	C ₈ H ₈	95
3	8,555	Oxime-methoxy-phenyl	151	C ₈ H ₉ NO ₂	85
4	12,300	Cyclotetrasiloxane octamethyl	296	C ₈ H ₂₄ O ₄ Si ₄	92
5	14,235	Disulfide bis(1,1,3,3-tetramethyl butyl)	290	C ₁₆ H ₃₄ S ₂	90
6	15,655	Cyclotrisiloxane hexamethyl	222	C ₆ H ₁₈ O ₃ Si ₃	84
7	15,935	Pentanal	86	C ₅ H ₁₀ O	67
8	16,370	Oxalic acid	230	C ₁₂ H ₂₂ O ₄	78
9	16,815	Ethanone-2,2-(octahydro-2,3-quinxalinedicyclidene)bis[1-phenyl]	372	C ₂₄ H ₂₄ N ₂ O	62
10	16,995	Benzaldehyde 2,5 bistrimethylsilyloxy	282	C ₁₃ H ₂₂ O ₃ Si	72
11	18,395	Cyclopentasiloxane decamethyl	370	C ₁₀ H ₃₀ O ₅ Si	86

Continuação Tabela 4

N°	RT (min)	Possível composto	Peso mol.	Fórmula	Similaridade (%)
12	25,124	Alfa cubebene	204	C ₁₅ H ₂₄	74
13	26,655	1,4 methano 1H-indene-octahydro-4-methyl-8-methylene-7-methylethyl	204	C ₁₅ H ₂₄	90
14	28,380	Cis-muuroala-3,5-diene	204	C ₁₅ H ₂₄	90
15	28,560	Cis-beta-femesene	204	C ₁₅ H ₂₄	90
16	29,105	Nephtalene 1,2,3,5,8 hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1 methylethyl)	204	C ₁₅ H ₂₄	89
17	29,200	Isoledene	204	C ₁₅ H ₂₄	85
18	29,675	Bicyclo[4,4,0] dec-1-ene-2-isoprpi-5-methyl-9-methylene	204	C ₁₅ H ₂₄	89
19	29,755	Cubedol	222	C ₁₅ H ₂₆ O	94
20	30,385	4-epi-cubedol	222	C ₁₅ H ₂₆ O	93
21	30,635	Nephtalene 1,2,3,5,8 hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1 methylethyl)	204	C ₁₅ H ₂₄	91
22	32,740	Diethylphtalate	222	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	84
23	34,095	Cubedol	222	C ₁₅ H ₂₆ O	94

4.4.1.1 Composição dos VOC's produzidos pelo co-cultivo de *L. gongylophorus* (FF2006) com *T. harzianum* (A215-2)

Durante o co-cultivo de *L. gongylophorus*(FF2006) com *T. harzianum* (A215-2), foram secretados 19 compostos, e provavelmente 3 deles foram secretados pelo *T. harzianum* (A215-2): 1-octen-3-ol, 4H-Pyran-4-one-2,3-dihydro-3,5-dihydroxi-6-methyl e 1-Trimethylsiloxy-2-methyl-4-methoxybutane. Além disso, outros dois compostos presentes na combinação também foram secretados quando os fungos estavam em placas separadas. Esses compostos foram: Oxime-methoxy-phenyl e Cyclotrisiloxane, hexamethyl. Os 14 compostos restantes foram produzidos apenas durante o co-cultivo uma vez que não foram detectados nos cultivos isolados. Alguns dos compostos apresentaram similaridade superior a 90% com os existentes no banco de dados da biblioteca, como foram os casos do 1-octen-3-ol, Tridecanoic acid, 9,12-Octadecadienoic acid e Cis-9-hexadecenal.

Tabela 5. Compostos voláteis produzidos pelo co-cultivo de *T. harzianum* (A215-2) e *L. gongylophorus* (FF2006) após 7 dias de crescimento a 25°C em meio PDA usando a fibra SPME

N°	RT (min)	Possível composto	Peso mol.	Fórmula	Similaridade (%)
1	8,815	Oxime-methoxy-phenyl	151	C ₈ H ₉ NO ₂	86
2	11,270	1-Octen-3-ol	128	C ₈ H ₁₈ O	94
3	13,685	Butanal,3-methyl	86	C ₅ H ₁₀ O	82
4	14,940	2-Decen-1-ol	156	C ₁₀ H ₂₀ O	88
5	15,590	Cyclotrisiloxane, hexamethyl	222	C ₆ H ₁₈ O ₃ Si ₃	83
6	17,560	1-Pentanol-3,4-dimethyl	116	C ₇ H ₁₆ O	77
7	17,815	4H-Pyran-4-one-2,3-dihydro-3,5-dihydroxi-6-methyl	144	C ₆ H ₈ O ₄	
8	25,785	Tridecanoic acid	214	C ₁₃ H ₂₆ O ₂	93
9	29,260	2H-Pyran-2-one-5,6- dihydro-6-pentyl	168	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	
10	33,060	1-Trimethylsiloxy-2-methyl-4-methoxybutane	190	C ₉ H ₂₂ O ₂ Si	61
12	38,095	Ala Thr, trimethylsilylester	334	C ₁₃ H ₃₀ N ₂ O	55
15	39,785	Pentadenoic acid	242	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	81
16	46,700	9,12-Octadecadienoic acid	280	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	93
17	46,850	Cis-9-hexadecenal	238	C ₁₆ H ₃₀ O	91
18	47,600	2S,3S(-)-3 Propyloxiranemethanol	116	C ₆ H ₁₂ O ₂	75
19	51,370	Glicine n-(4-butylbenzoi)propil ester	277	C ₁₆ H ₂₃ NO ₃	76

4.4.1.2 Composição dos VOC's produzidos pelo co-cultivo de *T. virens* (A174-1) e *L. gongylophorus* (FF2006).

Durante o co-cultivo de *T. virens* (A174-1) e *L. gongylophorus* (FF2006), foram secretados 14 compostos, sendo que dois (Oxime-methoxy-phenyl e Alfa cubebene) foram provavelmente produzidos pelo *L. gongylophorus* (FF2006), pois também foram secretados quando o fungo estava em placa separada. Além desses, um dos 14 compostos, o 1,3-Diisopropoxy-1,3-dimethy-1,3-didilacyclobutane, foi provavelmente produzido pelo *T. virens* (A174-1), pois também estava presente no cultivo isolado. Os demais 11 compostos foram

produzidos quando os dois fungos estavam em co-cultivo. Todos os compostos identificados tiveram similaridade acima de 60% (Tabela 6).

Tabela 6. Compostos voláteis produzidos pelo co-cultivo de *T. virens* (A174-1) e *L. gongylophorus* (FF2006) após 7 dias de crescimento a 25°C em meio PDA usando a fibra SPME

Nº	RT (min)	Possível composto	Peso mol.	Fórmula	Similaridade (%)
1	8,555	Oxime-methoxy-phenyl	151	C ₈ H ₉ NO ₂	85
2	11,270	1-Butanol, 3-methyl-propanoato	144	C ₈ H ₁₆ O ₂	83
3	11,550	3-Octanone	128	C ₈ H ₁₆ O	82
4	11,710	β-Myrcene	136	C ₁₀ H ₁₆	76
5	24,700	Cyclohexane 1-ethenyl 1-methyl-2(1 methylethyl ethenyl) 4 (1 methylethylidene)	204	C ₁₅ H ₂₄	93
6	24,970	Butenoic acid, 2-hydroxy-2-methyl	148	C ₅ H ₈ O ₅	80
7	25,125	Alfa cubebene	204	C ₁₅ H ₂₄	74
8	26,545	Cyclohexane, 1-etheny-1-methyl-2,4-bis (1-methyetheny[1S(1α,2β,4β)])	204	C ₁₅ H ₂₄	94
9	27,395	Caryophilene	204	C ₁₅ H ₂₄	95
10	29,335	β-Copaene	204	C ₁₅ H ₂₄	93
11	28,835	Gamma-Muurolene	204	C ₁₅ H ₂₄	89
12	32,660	Epiglobulol	222	C ₁₅ H ₂₆ O	89
13	33,410	1,3-Diisopropoxy-1,3-dimethy-1,3-didilacyclobutane	232	C ₁₀ H ₂₄ O ₂ Si ₂	61
14	33,580	2,5-Dihydroxy-1,4-dioxane bis(tert-butylidimethylsilylether)	348	C ₁₆ H ₃₆ O ₄ SiO ₂	67

4.4.1.3 Composição dos VOC's produzidos pelo co-cultivo de *R. variabilis* (A073-1) e *L. gongylophorus* (FF2006).

O co-cultivo do fungo mutualista FF2006 e *R. variabilis* (A073-1) resultou na secreção de 13 compostos, sendo que quatro foram provavelmente secretados pelo FF 2006 (Oxime-methoxy-phenyl; Cyclopentasiloxane decamethyl; Alfa cubebene; Diethylphtalate) e um foi secretado pelo *R. variabilis*, (l-(+) Ascorbic acid-2,6- dihexadecanoate). Os oito compostos restantes foram produzidos durante o co-cultivo dos fungos. Todos os 13

compostos identificados apresentaram similaridade acima de 60% (Tabela 7) com o banco de dados NIST11.

Tabela 7. Compostos voláteis produzidos pelo co-cultivo de *Rhizomucor variabilis* (A073-1) e *L. gongylophorus* (FF2006) após 7 dias de crescimento a 25°C em meio PDA usando a fibra SPME

N°	RT (min)	Possível composto	Peso mol.	Fórmula	Similaridade (%)
1	4,210	2-Hexanol,3-Methyl	116	C ₇ H ₁₆ O	87
2	4,450	2,3 Butenodiol	90	C ₄ H ₁₀ O ₂	98
3	8,555	Oxime-methoxy-phenyl	151	C ₈ H ₉ NO ₂	85
4	13,615	dl-Erythro-1-phenyl-1,2-propanediol	152	C ₉ H ₁₂ O ₂	71
5	16,675	Phenyl ethyl Acohol	122	C ₈ H ₁₀ O	90
6	16,780	Phtalic acid, di(4-isopropyl phenyl) ester	402	C ₂₆ H ₂₃ O ₄	61
7	17,935	2-propen-1- amine, 2-bromo-N-methyl	149	C ₄ H ₈ BrN	65
8	18,395	Cyclopentasiloxane decamethyl	370	C ₁₀ H ₃₀ O ₅ Si	86
9	25,124	Alfa cubebene	204	C ₁₅ H ₂₄	74
10	32,740	Diethylphtalate	222	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	84
11	42,260	l-(+) Ascorbic acid-2,6-dihexadecanoate	652	C ₃₈ H ₆₈ O ₈	93
12	43,020	Heptanoic acid, 2 ethyl	158	C ₉ H ₁₈ O ₂	74
13	45,785	2-Aminonadecane	283	C ₁₉ H ₄₁ N	79

4.4.1.4 Composição dos VOC's produzidos pelo co-cultivo de *T. harzianum* (A215-2); *T. virens* (A174-1) e *L. gongylophorus* (FF2006).

O co-cultivo dos três fungos *T. harzianum* (A215-2); *T. virens* (A174-1) e *L. gongylophorus* (FF2006) resultou na produção de 20 compostos (tabela 8). Dentre estes, dois deles, Oxime-methoxy phenyl e Cyclotrisiloxane hexamethyl foram produzidos quando o *L. gongylophorus* (FF2006) não estava em co-cultivo e também quando os fungos *T. harzianum* (A215-2) e *T. virens* (A174-1) estavam em co-cultivo. Além disso, todos os demais 18 compostos secretados pelo co-cultivo dos três fungos foram também secretados a partir do co-cultivo dos fungos *T. harzianum* (A215-2) e *T. virens* (A174-1), ou seja, o co-cultivo dos

três fungos não resultou na secreção de compostos diferentes daqueles que foram produzidos quando em cultivo isolado ou em co-cultivo em dupla.

Tabela 8. Compostos voláteis produzidos pelo co-cultivo de *T. virens* (A174-1), *T. harzianum* (A215-2) e *L. gongylophorus* (FF2006) após 7 dias de crescimento a 25°C em meio PDA usando a fibra SPME

N°	RT (min)	Possível composto	Peso mol.	Fórmula	Similaridade (%)
1	8,950	Oxime-methoxy phenyl	151	C ₈ H ₉ NO ₂	84
2	11,280	1-Octen-3-ol	128	C ₈ H ₁₆ O	91
3	11,925	3- Hexanoic acid	114	C ₆ H ₁₀ O ₂	69
4	13,760	Cyclopropanemethanol	128	C ₈ H ₁₆ O	82
5	15,755	Cyclotrisiloxane,hexamethyl	222	C ₆ H ₁₈ O ₃ Si ₃	88
6	16,180	2(5H)Furanone-3,5,5-trimethyl	126	C ₇ H ₁₀ O ₂	89
7	20,280	Dianhydromannitol	146	C ₆ H ₁₀ O ₄	94
8	20,445	1,4-Dioxaspiro[5,5]undecan-2-one	170	C ₉ H ₁₄ O ₃	80
9	24,995	Butanoic acid, 3-oxohexyl ester	186	C ₁₀ H ₁₈ O ₃	84
10	26,125	1H-Cyclopropa[a]naphtalene 1a,2,3,5,6,7,7a tetramethyl 1ar	204	C ₁₅ H ₂₄	82
11	28,715	2 oxiraneethanol, butyldimethylsilyloxymethylacetate	2t 274	C ₁₃ H ₂₆ O ₄ Si	74
12	30,790	Spiro[5,5]undeca1,8 diene1,5,5,9 tetramethyl-(R0	204	C ₁₅ H ₂₄	80
13	33,055	1-Trimethylsilyloxy-2-methyl-4- methoxybutane	190	C ₉ H ₂₂ O ₂ Si	61
14	37,275	Tetradecanoic acid	228	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	94
15	41,765	Cylopentadecanone, 2 hydroxy	240	C ₁₅ H ₂₈ O ₂	88
16	41,875	Ethyl isoallocholate	436	C ₂₆ H ₄₄ O ₅	79
17	42,315	l-(+)- Ascorbic acid dihexadecanoate	2,6 652	C ₃₈ H ₆₈ O ₈	94
18	46,695	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)	280	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	93
19	46,850	Cis-9-exadecenal	238	C ₁₆ H ₃₀ O	91
20	47,610	Octadecanoic acid	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	91

No entanto, dentre esses 20 compostos identificados durante o co-cultivo dos três fungos, três (1-Octen-3-ol; Cyclotrisiloxane,hexamethyl; 1-Trimethylsilyloxy-2-methyl-4-

methoxybutane) demonstram ser produzidos pelo *T. harzianum* (A215-2) e um (2 oxiraneethanol, 2t butyldimethylsilyloxymethylacetate) foi provavelmente produzido pelo *T. virens* (A174-1), pois eles foram secretados quando tais fungos foram cultivados isoladamente.

Tabela 9. Compostos voláteis produzidos pelo co-cultivo de *T. virens* (A174-1) e *T. harzianum* (A215-2) 7 dias de crescimento a 25°C em meio PDA usando a fibra SPME

N°	RT (min)	Possível composto	Peso mol.	Fórmula	Similaridade (%)
1	8,950	Oxime-methoxy phenyl	151	C ₈ H ₉ NO ₂	84
2	11,280	1-Octen-3-ol	128	C ₈ H ₁₆ O	91
3	11,925	3- Hexanoic acid	114	C ₆ H ₁₀ O ₂	69
4	13,760	Cyclopropanemethanol	128	C ₈ H ₁₆ O	82
5	15,755	Cyclotrisiloxane,hexamethyl	222	C ₆ H ₁₈ O ₃ Si ₃	88
6	16,180	2(5H)Furanone-3,5,5-trimethyl	126	C ₇ H ₁₀ O ₂	89
8	20,280	Dianhydromannitol	146	C ₆ H ₁₀ O ₄	94
9	20,445	1,4-Dioxaspiro[5,5]undecan-2-one	170	C ₉ H ₁₄ O ₃	80
10	24,995	Butanoic acid, 3-oxohexyl ester	186	C ₁₀ H ₁₈ O ₃	84
11	26,125	1H-Cyclopropa[a]naphtalene 1a,2,3,5,6,7,7a tetramethyl 1ar	204	C ₁₅ H ₂₄	82
12	28,715	2 oxiraneethanol, butyldimethylsilyloxymethylacetate	274	C ₁₃ H ₂₆ O ₄ Si	74
13	30,790	Spiro[5,5]undeca 1,8 diene 1,5,5,9 tetramethyl-(R0	204	C ₁₅ H ₂₄	80
14	33,055	1-Trimethylsilyloxy-2-methyl-4- methoxybutane	190	C ₉ H ₂₂ O ₂ Si	61
15	37,275	Tetradecanoic acid	228	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	94
16	37,835	Thunbergol	290	C ₂₀ H ₃₄ O	75
17	39,815	Pentadecanoic acid	242	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	94
18	41,765	Cylopentadecanone, 2 hydroxy	240	C ₁₅ H ₂₈ O ₂	88
19	41,875	Ethyl isoallocholate	436	C ₂₆ H ₄₄ O ₅	79
20	42,315	l-(+)- Ascorbic acid dihexadecanoate	652	C ₃₈ H ₆₈ O ₈	94

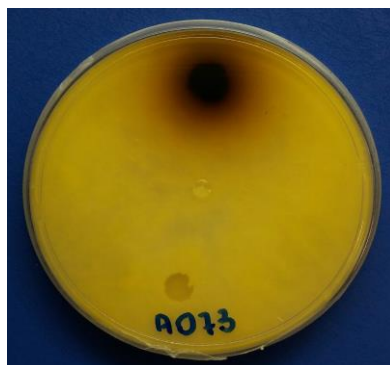
Continuação Tabela 9

N°	RT (min)	Possível composto	Peso mol.	Fórmula	Similaridade (%)
21	46,695	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)	280	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	93
22	46,850	Cis-9-exadecenal	238	C ₁₆ H ₃₀ O	91
23	47,610	Octadecanoic acid	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	91

4.4.2 Estudo das interações físicas entre *Rhizomucor variabilis* e o fungo mutualista *L. gongylophorus* por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Após a montagem do experimento em placa de Petri, o *Rhizomucor variabilis* cresceu rapidamente em direção ao fungo mutualista (3 dias), assim como ocorreu no cultivo isolado desse fungo. No entanto, a presença *Rhizomucor variabilis* alterou a coloração do fungo mutualista (Figura 6), assim como ocorreu na montagem do experimento para leitura dos compostos voláteis.

Figura 1. Interação entre *R. variabilis* e *L. gongylophorus* após 3 dias de incubação



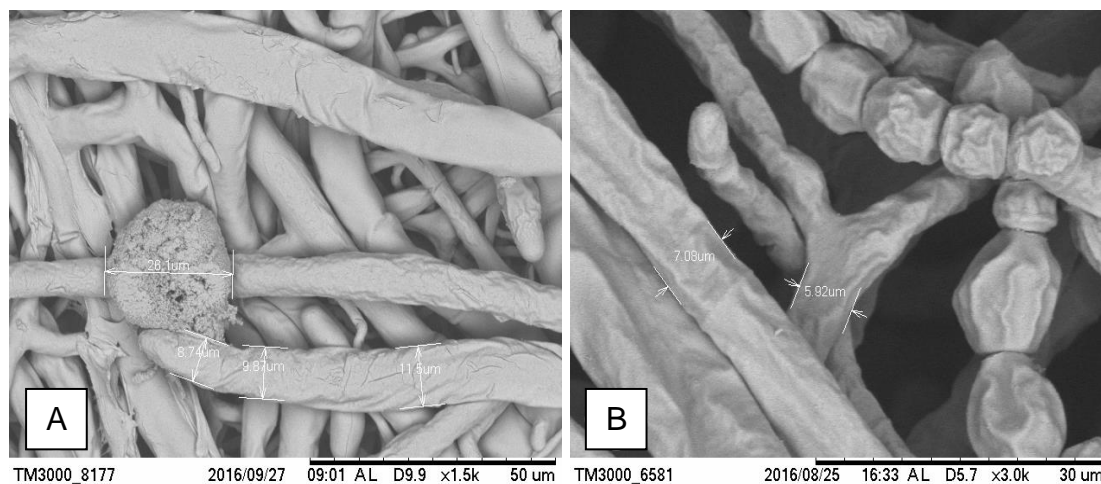
Após o procedimento de fixação e preparo das amostras para microscopia eletrônica de varredura, foi possível avaliar a ação do fungo *Rhizomucor variabilis* (A073-1) sobre o *L. gongylophorus*. Na figura 7 é possível observar o contato das hifas do *R. variabilis* com o *L. gongylophorus*, mostrando um certo estrangulamento.

Figura 2. Micrografias eletrônicas de varredura dos ensaios de antagonismo realizados com *R. variabilis* (A073-1) frente à *Leucoagaricus gongylophorus* (FF2006). Contato físico da hifa do *R. variabilis*, com o gongilídeo do fungo mutualista, evidenciado pelas setas



Uma característica importante observada nas preparações é o tamanho das hifas do fungo mutualista, quando comparada às hifas do *R. variabilis*. As hifas de *L. gongylophorus* apresentam em média, $10,0 \pm 2,8 \mu\text{m}$ de diâmetro, e as hifas do fungo *R. variabilis* $6,48 \pm 1,66 \mu\text{m}$ de diâmetro (Figura 8).

Figura 3. Micrografias eletrônicas de varredura dos ensaios de antagonismo realizados com *Rhizomucor variabilis* (A073-1) frente à *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006. A- Gongilídeos e hifas do fungo mutualista. B- Hifas do fungo *Rhizomucor variabilis*



4.5. Discussão

Recentemente, houve um aumento no número de estudos que relatam a diversidade e possível função biológica dos VOC's em micro-organismos (SCHMIDT et al., 2015). Em comparação com as plantas, o conhecimento sobre as propriedades dos VOC's secretados por micro-organismos é ainda muito limitado (BITAS et al., 2013).

O composto Oxime-methoxy-phenyl (OMP) foi secretado pelo fungo FF 2006 quando cultivado isoladamente. É sabido que derivados do OMP possuem atividade farmacológica diversificada e por este motivo constituem parte essencial das estruturas moleculares de algumas drogas antifúngicas e antimicrobianas como oxiconazol e nafimidone oxime (PARTHIBAN et al, 2009; HARINI et al, 2012).

Um outro composto, o ácido oxálico, também foi produzido pelo fungo FF2006 quando este foi cultivado isoladamente. O ácido oxálico é um poderoso quelante que desestabiliza a integridade da parede vegetal, facilitando a ação de enzimas líticas; além disso, o ácido oxálico também foi associado a vários fungos fitopatogênicos (GODOY et al., 1990). Este deve ser uma das ferramenteas de ataque do fungo mutualista sobre os fragmentos vegetais trazidos pelas operárias ao crescente jardim de fungos.

O álcool alifático 1-octen-3-ol produzido pelo *T. harzianum* (A215-2) quando cultivado isoladamente é o principal composto que contribui com o aroma característico dos fungos e foi encontrado primeiramente em *Tricholoma matsutake* (MURAHASHI, 1938). Há relatos de que o 1-octen-3-ol atrai moscas e mosquitos e, em alguns casos, repele insetos fungívoros (COMBET ET AL., 2006; BRODHUN & FEUSSNER, 2011). Ainda, o 1-octen-3-ol reduz os níveis de dopamina, resultando na degeneração dos neurônios em *Drosophila melanogaster* e também possui efeitos fungicidas e fungistáticos, mostrando dessa forma, seu potencial contra o fungo mutualista (INAMDAR et al, 2013; OKULL et al, 2003). Nencovic et al (2008) verificaram que 1-octen-3-ol produzido por *Trichoderma* durante a esporulação foi capaz de induzir a esporulação de colônias de *Trichoderma* mantidas no escuro.

O ácido decanoico produzido pelo fungo *R. variabilis* (A073-1), quando cultivado isoladamente, possui atividade antimicrobiana e foi considerado uma alternativa em tratamentos de mastite bovina (NAIR et al, 2005).

A combinação *T. harzianum* (A215-2) e *L. gongylophorus* (FF2006) produziu vários compostos, entre eles podemos destacar o 2-Decen-1-ol, o qual já foi encontrado na secreção mandibular de vespas solitárias, em óleo essencial de *Coriandrum sativum*, além de apresentar atividade contra o nematóide *Bursaphelenchus xylophilus* (HEFETZ et al, 1978; POTTER, 1996; KIM et al, 2008).

Quando *T. virens* (A174-1) e *L. gongylophorus* (FF2006) foram cultivados juntos, observou-se a produção de caryophyllene, o qual está presente em vários óleos essenciais como *Eugenia caryophyllata*, *Myrica gale* e *Comptonia peregrina* (ZHENG et al, 1992; SYLVESTRE et al, 2005; 2007). O caryophyllene possui atividade anti-inflamatória, anticarcinogênica, antibiótica, antioxidante e atua também como um anestésico local (CHO et al, 2007; KUBO et al, 1996; PICHETTE et al, 2006; SINGH et al, 2006; GHELARDINI et al, 2001). Há também estudo que relata o papel atrativo que o caryophyllene possui para larva rosa do algodão *Pectinophora gossypiella* (FLINT et al, 1979).

Ainda na combinação dos fungos *T. virens* (A174-1) e *L. gongylophorus* (FF2006), verificou-se a produção de β -Myrcene, o qual é um constituinte majoritário do óleo essencial de capim-limão e apresenta atividades antioxidante e fungitóxica (GUIMARÃES et al, 2011).

O co-cultivo entre *Rhizomucor variabilis* (A073-1) e *L. gongylophorus* (FF2006) resultou na produção de Phenyl ethyl Alcohol o qual lembra o aroma de rosas, sendo amplamente utilizado nas indústrias cosmética e alimentícia (FABRE et al., 1998). Nesse co-cultivo também ocorreu a produção de 2,3 butanodiol, sendo que tal composto possui diversos usos como substância polimérica, além de poder ser utilizado como um composto anticongelante (GARG & JAIN, 1994).

A combinação entre *T. virens* (A174-1), *T. harzianum* (A215-2) e *L. gongylophorus* (FF2006), resultou na produção de Ethyl iso allocholate, o qual também já foi encontrado no óleo essencial de *Sesamum radiatum*. Esse composto pode atuar como um agente emulsionante de gorduras (OGUNLESI et al, 2010).

Vários dos compostos voláteis encontrados neste trabalho possuem importância para a medicina, uma vez que apresentam propriedades anti-inflamatórias ou anti-cancerígenas além de serem precursores de alguns medicamentos (LEGAULT; PICHETTE, 2007; HARINI et al, 2012). Outros compostos possuem importância para a agricultura, por apresentarem

atividade contra nematóides, apresentando potencial uso em controle biológico (KIM et al, 2008).

Durante os co-cultivos vários VOC's foram emitidos unicamente durante as interações produzindo efeitos sobre o crescimento de um fungo em relação ao outro, inibindo ou estimulando este. Em todos os casos notou-se que os fungos dos gêneros *Trichoderma* e *Rhizomucor* cresceram sobre o fungo mutualista das formigas (FF 2006), isso pode ser devido não unicamente à secreção de um composto em particular, mas também pode ser devido a uma determinada mistura dos mesmos.

Em relação à interação física entre *R. variabilis* e o fungo mutualista *L. gongylophorus*, observou-se que em 72 horas o *R. variabilis* sobrepujou o crescimento do fungo mutualista, além de alterar coloração do mesmo para castanho escuro. Sabe-se que o fungo *R. variabilis* pertence à ordem Mucorales e são caracterizados por possuírem um rápido crescimento e saprofiticos na maioria dos casos (HOFFMANN et al, 2013).

Como observado para outros micoparasitas, como *Trichoderma* sp. e *Gliocladium* sp. (ORTIZ; ORDUZ, 2000) o contato entre os fungos pode estimular a secreção de metabólitos secundários, os quais podem ser responsáveis pelo escurecimento do meio de cultivo. De acordo com o estudo de Score et al. (1997) e Peiris et al. (2008), o escurecimento da cultura do *L. gongylophorus* (FF2006), pode estar relacionado aos mecanismos de defesa do mesmo. Tais mecanismos envolvem a produção extracelular da enzima lacase (SCORE et al., 1997). As lacases podem atuar na oxidação de substratos fenólicos, convertendo-os em radicais livres, como as quinonas, sendo que estas sofrem polimerização e originam melanina ou outros compostos semelhantes (WHITE & BODDY, 1992). A melanina e seus derivados alteram a hidrofobicidade da parede celular fúngica e tal alteração atua como uma barreira que impede o contato com enzimas de degradação da parede celular produzidas pelo outro micro-organismo (BULL, 1970).

Mesmo que estes organismos não exijam nutrientes a partir de um hospedeiro, quando parasitam outros fungos, o seu crescimento é beneficiado quando utilizam as células mortas como forma de nutrição. Esses micoparasitas podem ser facultativos ou oportunistas, e podem secretar enzimas que facilitam a competir por espaço e nutrientes (BARNETT; BINDER, 1973).

As relações antagonistas mediadas por micoparasitas necrotróficos são agressivas (HAIFIG, 2014). A hifa do parasita entra em contato e cresce em associação com a hifa do hospedeiro, algumas vezes enrolando-se em volta da hifa do hospedeiro, na qual pode ocorrer penetração. Algo semelhante foi observado na interação entre o *R. variabilis* e o *L. gongylophorus* a partir das análises em microscopia eletrônica de varredura, como já visualizado na figura 7.

4.6. Conclusão

Os fungos filamentosos *T. harzianum*, *T. virens* e *R. variabilis*, selecionados no Capítulo 1 como patógenos potenciais ao fungo mutualista, são promissores para o desenvolvimento de métodos visando ao controle biológico das formigas-cortadeiras e os estudos devem avançar no sentido de promover a utilização destes em escala de campo.

Ainda, o presente trabalho mostrou a produção de diversos compostos voláteis por estes fungos, como Oxime-methoxy-phenyl (OMP), 1-octen-3-ol e β -Myrcene que podem ter diversas aplicações, seja na indústria farmacêutica, para a produção de antifúngicos, antimicrobianos, bem como na área agrícola, sendo que alguns dos compostos podem ter aplicação para o controle de nematóides. A produção de compostos voláteis de caráter antifúngico pelas linhagens de *Trichoderma* evidencia a potencialidade dos mesmos contra o fungo mutualista *L. gongylophorus*. No entanto, o estudo dos VOC's ainda está no início e, não apenas as propriedades biológicas, como vários desses compostos, ainda permanecem desconhecidos.

REFERÊNCIAS

- ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, 1998. 424 p.
- ANKE, T.; KUPKA, J.; SCHRAMM, G.; STEGLICH, W. Antibiotics from basidiomycetes X. *Scorodonin*, a new antibacterial and antifungal metabolite from *Marasmius scorodonius* (Fr.) Fr. **J Antibiotics**.;v. 33, p.463-467, 1980.
- AYLARD, F. O; BURNUM, K.E.; SCOTT, J.J.; SUEN,G. TRINGE,S.G.; ADAMS,S.M; BARRY,K.W.; NICORA,C.D.; NPIEHOWSKI,P.; PURVINE,S.O.; STARRETT,G.J.; GOODWIN,L.A.; SMITH,R.D.; LINPTON,M.S.; CURRIE,C.C. Metagenomic and metaproteomic insights into bacterial communities in leaf-cutter ant fungus gardens. **ISME J**, New York, v.6, p1688-1701, 2012.
- BARCOTO, M. O. **Patogenicidade de *Syncephalastrum racemosum* nos jardins de formigas-cortadeiras**. 2015. 87 f Trabalho de Conclusão de Curso – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo.
- BARCOTO, M. O.; PEDROSA, F.; BUENO, O. C.; RODRIGUES, A. Pathogenic nature of *Syncephalastrum* in *Atta sexdens rubropilosa* fungus gardens. **Pest Management Science**, 2016. doi: 10.1002/ps.4416
- BÉLANGER, R. R. et al. Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: indirect evidence for sequential role of antibiosis and parasitism. **Biocontrol Science and Technology**, v. 5, n. 1, p. 41-54, 1995.
- BARNETT, H. L.; BINDER, F. L. The fungal host-parasite relationship. **Annu. Rev. Phytopathol.**, Palo Ato, v. 11, p. 273-292, 1973.
- BASS, M.; CHERRETT, J. M. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **Physiological Entomology**, v. 20, n. 1, p. 1-6, 1995.
- BOARETTO, M. A. C.; FORTI, L. C. Perspectivas no controle de formigas-cortadeiras. **Série técnica IPEF**, v. 11, n. 30, p. 31-46, 1997.
- BRODHUN, Florian; FEUSSNER, Ivo. Oxylipins in fungi. **FEBS journal**, v. 278, n. 7, p. 1047-1063, 2011.
- BRUCE, A.; AUSTIN, W. J.; KING, B. Control of growth of *Lentinus lepideus* by volatiles from *Trichoderma*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 82, n. 3, p. 423-428, 1984.
- BULL, A. T. Inhibition of polysaccharases by melanin: enzyme inhibition in relation to mycolysis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 137, n. 2, p. 345-356, 1970.

BUTT, Tariq M.; JACKSON, Chris; MAGAN, Naresh **Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential.** London: CAB International, 2001.

CHAPELA, I. H., REHNER, S. A., SCHULTZ, T. R., MUELLER, U. G.. Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. **Science**, v. 266, n. 5191, p. 1691, 1994.

CHERRY, A.J.; LOMER, C.J.; DJEGUI, D.; SCHULTHESS, F. Pathogen incidence and their potential as microbial control agents in IPM of maize stem borers in West Africa. **Biocontrol**, v. 44, n. 3, p. 301-327, 1999.

CHO, J. A., CHANG, H. J., LEE, S.-K., KIM, H.-J., HWANG, J.-K., CHUN, H. S. AMELIORATION of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by oral administration of β -caryophyllene, a sesquiterpene. **Life sciences**, v. 80, n. 10, p. 932-939, 2007.

COMBET E, HENDERSON J, EASTWOOD DC, BURTON KS. Eight carbon volatiles in mushrooms and fungi: properties, analysis, and biosynthesis. **Mycoscience**, v. 47, n. 6, p. 317-326, 2006.

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

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

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

DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M.E. da; LABRES, M.E.V. & SPECHT, A. Ocorrência natural de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. no Rio Grande do Sul. **Acta Biologica Leopoldensia**, v. 14, n. 1, p. 99-104, 1992.

DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. **Compendium of Soil Fungi.** Vols 1 e 2. Academic Press, London 1980.

EFFMERT, U.; KALDERÁS, J.; WARNKE, R.; PIECHULLA, B. Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. **Journal of Chemical Ecology**, v. 38, p. 665-703, 2012.

EVANS, B.; ROBINSON, S.; KELLEHER, N. Surveys of non-ribosomal peptide and polyketide assembly lines in fungi and prospects for their analysis in vitro and in vivo. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 48, n. 1, p. 49-61, 2011.

FABRE, C. E.; BLANC, P. J.; GOMA, G. Production of 2-Phenylethyl Alcohol by *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology progress**, v. 14, n. 2, p. 270-274, 1998.

FISHER, P.J.; STRADLING, D.J.; SUTTON, B.C.; PETRINI, L.E. Microfungi in the fungus gardens of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*: a primary study. **Mycological Research**, v. 100, n. 5, p. 541–546, 1996.

FLINT, H. M.; SALTER, S. S.; WALTERS, S. Caryophyllene: an attractant for the green lacewing. **Environmental Entomology**, v. 8, n. 6, p. 1123-1125, 1979.

FOLGARAIT, P.; GOROSITO, N.; POULSEN, M.; CURRIE, C. R.. Preliminary in vitro insights into the use of natural fungal pathogens of leaf-cutting ants as biocontrol agents. **Current Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 250-258, 2011.

FOWLER, H. G.; PAGANI, M. I.; SILVA, O. A.; FORTI, L.C.; SILVA, V. P.; VASCONCELOS, H. L.; A pest is a pest is a pest? The dilemma of Neotropical leaf-cutting ants: keystone taxa of natural ecosystems. **Environmental Management**, v. 13, n. 6, p. 671-675, 1989.

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

GARBEVA, P., HORDIJK, C., GERARDS, S., BOER, W.. Volatile-mediated interactions between phylogenetically different soil bacteria. **Front. Microbiol.** v. 5; 289p. 2014

GARG, S. K.; JAIN, A. Fermentative production of 2, 3-butanediol: a review. **Bioresource Technology**, v. 51, n. 2, p. 103-109, 1995.

GERARDO, N. M.; MUELLER, U. G.; PRICE S L.; CURRIE, C.R. Exploiting a mutualism: parasite specialization on cultivars within the fungus-growing ant symbiosis. **Proceedings of the Royal Society of London**, London, v. 271, n. 1550, p. 1791-1798, 2004.

GHELARDINI, C., GALEOTTI, N., DI CESARE, M. -L., MAZZANTI, G., BARTOLINI, A. GHELARDINI, C. Local anaesthetic activity of β -caryophyllene. **Il Farmaco**, v. 56, n. 5, p. 387-389, 2001.

GHISALBERTI, E. L.; SIVASITHAMPARAM, K. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. **Soil biology & Biochemistry**, v. 23, n. 11, p. 1011–1020, 1991.

GODOY, G. et al. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 37, n. 3, p. 179-191, 1990

GUEDES, A. F. A.; ATTILI-ANGELIS, D.; PAGNOCCA, F. C. Selective isolation of dematiaceous fungi from the workers of *Atta laevigata* (Formicidae: Attini). **Folia Microbiologica**, Praha, v. 57, n. 1, p. 21-26, 2012.

GUIMARÃES, L. G.. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 42, n. 2, p. 464-472, 2011.

HAIFIG, S. S. V. Natureza do parasitismo de *Escovopsis* e *Escovopsioides* sobre *Leucoagaricus gongylophorus*, fungos associados aos jardins de formigas-cortadeiras.

2014. Dissertação. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo.

HAJEK, A. E.; ST. LEGER, R. J. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. **Annual review of entomology**, v. 39, n. 1, p. 293-322, 1994.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 41, [s.n.], p. 95-98, 1999.

HARINI, Salakatte Thammaiah et al. Synthesis, antioxidant and antimicrobial activity of novel vanillin derived piperidin-4-one oxime esters: preponderant role of the phenyl ester substituents on the piperidin-4-one oxime core. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 22, n. 24, p. 7588-7592, 2012.

HEFETZ, A.; BATRA, SUZANNE WT. Geranyl acetate and 2-decen-1-ol in the cephalic secretion of the solitary wasp *Sceliphron caementarium* (Sphecidae; Hymenoptera). **Experientia**, v. 35, n. 9, p. 1138-1139, 1979.

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

HERVEY, A.; ROBERSON, C. T.; LEONG, I. Studies on fungi cultivated by ants. **Brittonia**, New York, v. 29, p. 226-236, 1977.

HOFFMANN, K. . The family structure of the Mucorales: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 30, n. 1, p. 57-76, 2013.

INAMDAR AA, HOSSAIN MM, BERNSTEIN ALMILLER GE, RICHARDSON JR, BENNETT JW. Fungal-derived semiochemical 1-octen-3-ol disrupts dopamine packaging and causes neurodegeneration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 48, p. 19561-19566, 2013.

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

HUGHES, W.O.H.; THOMSEN, L.; EILENBERG, J.; BOOMSMA, J.J. Diversity of entomopathogenic fungi near leaf-cutting ant nests in a neotropical forest, with particular reference to *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 85, n. 1, p. 46-53, 2004.

HUGHES, W.H.O.; BOOMSMA, J.J. Let or enemy do the work: within-host interactions between two fungal parasites of leaf-cutting ants. **Proceedings of the Royal Society of London B (Suppl.)**, v. 271, p. S104-S106, 2004.

KANDASAMY, D.; GERSHENZON, J.; HAMMERBACHER, A. Volatile organic compounds emitted by fungal associates of conifer bark beetles and their potential in bark beetle control. **Journal of Chemical Ecology**, v. 42, n. 9, p. 952-969, 2016.

KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal secondary metabolism-from biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, p. 937-947, 2005.

KIM, J., SEO, S. M., LEE, S. G., SHIN, S. C., PARK, I. K. Nematicidal activity of plant essential oils and components from coriander (*Coriandrum sativum*), oriental sweetgum (*Liquidambar orientalis*), and valerian (*Valeriana wallichii*) essential oils against pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 16, p. 7316-7320, 2008.

KUBO, I., CHAUDHURI, S. K., KUBO, Y., SANCHEZ, Y., OGURA, T., SAITO, T. ISHIKAWA. Cytotoxic and antioxidative sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*. **Planta Medica**, v. 62, n. 05, p. 427-430, 1996.

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

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

LOPEZ, E.; ORDUZ, S. *Metarhizium anisopliae* and *Trichoderma viride* for control of nests of the fungus-growing ant, *Atta cephalotes*. **Biological Control**, v. 27, n. 2, p.194-200, 2003.

MENDES, T.D.; RODRIGUES, A.; DAYO-OWOYEMI, I.; MARSON, F. A. L.; Maffei, M.E., Gertsch, J., and Appendino, G. (2011). Plant volatiles: production, function and pharmacology. **Nat. Prod. Rep.** 28, 1359–1380. doi: 10.1039/c1np00021g

PAGNOCCA, F.C. Generation of nutrients and detoxification: possible roles of yeasts in leaf-cutting ant nests. **Insects**. v. 3, n.1, p. 228-245, 2012.

MEYLING, N. V.; LUBECK, M.; BUCKLEY, E. P.; EILENBERG, J.; REHNER S. A. Community composition, host range and genetic structure of the fungal entomopathogen *Beauveria* in adjoining agricultural and seminatural habitats. **Molecular Ecology**, v. 18, n. 6, p. 1282-1293, 2009.

MOLLER, E. M.; BAHNWEIG, G.; SANDERMANN, H.; GEIGER, H.H. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 20, n. 22, p. 6115-6116, 1992.

MORATH, S. U.; HUNG, R.; BENNETT, J. W. Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. **Fungal Biology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 73-83, 2012.

MUELLER, U. G.; REHNER, S. A.; SCHULTZ, T. R. The evolution of agriculture in ants. **Science**, Washington, v. 281, n. 5385, p. 2034-2038, 1998

MUELLER, U. G.; SCHULTZ, T. R.; CURRIE, C. R.; ADAMS, R. M. M; MALLOCH, D. **The origin of the Attine Ant-Fungus Mutualism.** *The Quarterly Review of Biology.* New York, v. 76, n.2, p. 169-197, 2001.

MURAHASHI, S. Über die riechstoffe des matsutake. *Sci Pap Inst Phys Chem Res* v 34, [s.n], p155–172, 1938.

NAIR, M. K. M. et al. Antibacterial effect of caprylic acid and monocaprylin on major bacterial mastitis pathogens. *Journal of dairy science*, v. 88, n. 10, p. 3488-3495, 2005.

NEMCOVIC M, JAKUBIKOVA L, VIDEN I, FARKAS V. Induction of conidiation by endogenous volatile compounds in *Trichoderma* spp. *FEMS Microbiology Letters*, v. 284, n. 2, p. 231-236, 2008.

NORRMAN, J. Production of volatile organic compounds by the yeast fungus *Dipodascus aggregatus*. *Archiv für Mikrobiologie*, v. 68, n. 2, p. 133-149, 1969.

OGUNLESI, M.; OKIEI, W.; OSIBOTE, E. A.. Analysis of the essential oil from the leaves of *Sesamum radiatum*, a potential medication for male infertility factor, by gas chromatography-mass spectrometry. *African Journal of Biotechnology*, v. 9, n. 7, p. 1060-1067, 2010.

OLIVEIRA, M.A.; ARAÚJO, M.S.; MARINHO, C.G.S; RIBEIRO, M.M.R.; DELLA LUCIA, T.M.C. Manejo de formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T.M.C (Ed.) **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo.** Viçosa: Ed. UFV, 2011, p. 400-419.

OKULL, D. O.; BEELMAN, R. B.; GOURAMA, H.. Antifungal activity of 10-oxo-trans-8-decenoic acid and 1-octen-3-ol against *Penicillium expansum* in potato dextrose agar medium. *Journal of food protection*, v. 66, n. 8, p. 1503-1505, 2003.

ORTIZ, A.; ORDUZ, S. In vitro evaluation of *Trichoderma* and *Gliocladium* antagonism against the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. *Mycopathologia*, v. 150, n. 2, p. 53–60, 2000.

PAGANS, E.; FONT, X.; SÁNCHEZ, A.. Emission of volatile organic compounds from composting of different solid wastes: abatement by biofiltration. *Journal of hazardous materials*, v. 131, n. 1, p. 179-186, 2006.

PAGNOCCA, F.C.; MASIULIONIS, V.E.; RODRIGUES, A. Specialized Fungal Parasites and Opportunistic Fungi in Gardens of Attine Ants. *Psyche: A Journal of Entomology*, Cambridge, v. 2012, [s.n.], p. 1-9, 2012.

PICHETTE, A., LAROUCHE, P.-L. LEBRUN, M., LEGAULT, J. Composition and antibacterial activity of *Abies balsamea* essential oil. *Phytotherapy Research*, v. 20, n. 5, p. 371-373, 2006.

POTTER, T. L. Essential oil composition of cilantro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 44, n. 7, p. 1824-1826, 1996.

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

ROBINSON, P. M.; PARK, D. Volatile inhibitors of spore germination produced by fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 49, p. 639-649, 1966.

RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O.C.; PFENNING, L.H.; BACCI Jr., M. Assessment of microfungi in fungus gardens free of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 46, n. 2, p. 329-334, 2005.

RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F.C.; BACCI Jr., M.; HEBLING, M.J.A.; BUENO, O.C.; PFENNING, L.H. Variability of non-mutualistic filamentous fungus associated with *Atta sexdens rubropilosa* Nests. 32 **Folia Microbiologica**, v. 50, n. 5, p. 421-425, 2005.

ROZE, L. V.; BEAUDRY, R. M.; LINZ, J. E. Analysis of volatile compounds emitted by filamentous fungi using solid-phase microextraction-gas chromatography/mass spectrometry. In: KELLER, N. P.; TURNER, G. (Eds.). **Fungal secondary metabolism: methods and protocols**. Humana Press, 2012. p. 113- 142.

STROBEL, G. A.; DIRKSE, E.; SEARS, J.; MARKWORTH, C. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus* a novel endophytic fungus. **Microbiology**, Reading, v. 147, p. 2943-2950, 2001.

STROBEL, G. A.; SINGH, S. K.; RIYAZ-UI-HASSAN, S.; MITCHELL, A. M.; GEARY, B.; SEARS, J. Anendophytic/pathogenic *Phoma* sp. from creosote bush producing biologically active volatile compounds having fuel potential. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 320, p. 87-94, 2011.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. **Mycological Research**, v. 100, n. 8, p. 923-935, 1996.

SANTOS, A. V.; DE OLIVEIRA, B. L.; SAMUELS, R. I.. Selection of entomopathogenic fungi for use in combination with sub-lethal doses of imidacloprid: perspectives for the control of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). **Mycopathologia**, v. 163, n. 4, p. 233-240, 2007.

SCHMID-HEMPEL, P.. Parasites in social insects – monographs in behavior and ecology. **Princeton University Press**, 409 p. 1998

SCHULTZ, T.R.; BRADY, S.G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America**, Washington, v.105, n.14, p.5435-5441, 2008.

SILVA, A.; BACCI, M. Jr.; SIQUEIRA, C.G.; BUENO, O.C.; PAGNOCCA, F.C.; HEBLING, M.J.A. Survival of *Atta sexdens* workers on a different food sources. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 49. n.4, p. 307-313, 2003.

SILVA, A.; BACCI, M.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. Starch metabolism in *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. **Microbiological research**, v. 161, n. 4, p. 299-303, 2006.

SINGH, G., MARIMUTHU, P., DE HELUANI, C. S., CATALAN, C. A. Antioxidant and biocidal activities of *Carum nigrum* (seed) essential oil, oleoresin, and their selected components. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 1, p. 174-181, 2006.

SOLOMON, S. E.; BACCI, M. Jr.; MARTINS, J. Jr.; VINHA, G. G.; MUELLER, U. G. Paleodistributions and comparative molecular phylogeography of leaf-cutter ants (*Atta* sp.) provide new insight into the origins of amazonian diversity. **PLoS One**, California, v. 3, n.7, e. 2738, 2008.

SUNG, G.H.; HYWEL-JONES, N.L.; SUNG, J.M.; LUANGSA-ARD, J.J.; SHRESTHA, B.; SPATAFORA, J.W. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. **Studies in Mycology**, v. 57, n.1, p.5-59, 2007.

STENBERG, J. A.; HEIL, M.; ÅHMAN, I.; BJÖRKMAN, C. Optimizing Crops for Biocontrol of Pests and. **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 11, p. 699, 2015.

ST. LEGER R. J. Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, n. 3, p. 271-276, 2008.

STROBEL, Gary. Harnessing endophytes for industrial microbiology. **Current opinion in microbiology**, v. 9, n. 3, p. 240-244, 2006.

SYLVESTRE, M., LEGAULT, J., DUFOUR, D., PICHETTE, A. Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L. **Phytomedicine**, v. 12, n. 4, p. 299-304, 2005.

SYLVESTRE, M., PICHETTE, A., LONGTIN, A., LEGAULT, J. Composition and cytotoxic activity of the leaf essential oil of *Comptonia peregrina* (L.) Coulter. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 6, p. 536-540, 2007.

TAERUM, S. J.; CAFARO, M. J.; LITTLE, A. E. F.; SCHULTZ, T. R.; CURRIE, C. R. Low host-pathogen specificity in the leaf-cutting ant-microbe symbiosis. **Proceeding of the Royal Society of London, Series B**, London, v. 274, n. 1621, p. 1971-1978, 2007.

THOLL, D., BOLAND, W., HANSEL, A., LORETO, F., RÖSE, U. S., SCHNITZLER, J. P. Practical approaches to plant volatile analysis. **The Plant Journal**, v. 45, n. 4, p. 540-560, 2006.

WANG, Y.; MUELLER, U G.; CLARDY, J. Antifungal diketopiperazines from symbiotic fungus of fungus-growing ant *Cyphomyrmex minutes*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, n. 4, p. 935-941, 1999.

WEBER, N. A. Gardening ants: The Attines. **Philadelphia: American Philosophical Society**, v. 92, 1972. 146 p.

WERNER, S.; POLLE, A.; BRINKMANN, N. Belowground communication: impacts of volatile organic compounds (VOCs) from soil fungi on other soil-inhabiting organisms. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 20, p. 8651-8665, 2016

WHEATLEY, R.; HACKETT, C.; BRUCE, A.; KUNDZEWICZ, A. Effect of substrate composition on production of volatile organic compounds from *Trichoderma* spp. inhibitory to wood decay fungi. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 39, n. 2, p. 199-205, 1997.

WHITE, N. A.; BODDY, L. Extracellular enzyme localization during interspecific fungal interactions. **FEMS Microbiology Letters**, v. 98, n. 1-3, p. 75-79, 1992.

XUE H, LU C, LIANG L, SHEN Y. Secondary Metabolites of *Aspergillus* sp. CM9a, an Endophytic Fungus of *Cephalotaxus mannii*. **Records of Natural Products**, v. 6, n. 1, p. 28, 2012.

ZHENG, G.Q.; KENNEY, P. M.; LAM, LUKE K.T. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. **Journal of natural products**, v. 55, n. 7, p. 999-1003, 1992.

ANEXO I – Fungos isolados a partir de ninhos iniciais da formiga *A. sexdens rubropilosa*: identificação em nível de gênero com base nas características macromorfológicas

Código	Origem	Identificação
A129	Fazenda Alvorada	<i>Fusarium</i> sp.
A217-2*	Fazenda Alvorada	<i>Fusarium</i> sp.
A036*	Fazenda Alvorada	<i>Fusarium</i> sp.
A158	Fazenda Alvorada	<i>Fusarium</i> sp.
A027	Fazenda Alvorada	<i>Fusarium</i> sp.
A125	Fazenda Alvorada	<i>Fusarium</i> sp.
A178-2	Fazenda Alvorada	<i>Fusarium</i> sp.
A142*	Fazenda Alvorada	<i>Fusarium</i> sp.
A031-2*	Fazenda Alvorada	<i>Fusarium</i> sp.
A071*	Fazenda Alvorada	<i>Fusarium</i> sp.
A206	Fazenda Alvorada	<i>Fusarium</i> sp.
A172	Fazenda Alvorada	<i>Fusarium</i> sp.
A170-2*	Fazenda Alvorada	<i>Fusarium</i> sp.
A203	Fazenda Alvorada	<i>Fusarium</i> sp.
A008-2	Fazenda Alvorada	<i>Fusarium</i> sp.
V017	Fazenda Suzano	<i>Fusarium</i> sp.
A057-2	Fazenda Alvorada	<i>Fusarium</i> sp.
A089	Fazenda Alvorada	<i>Fusarium</i> sp.
V007	Fazenda Suzano	<i>Fusarium</i> sp.
A019	Fazenda Alvorada	<i>Trichoderma</i> sp.
A187	Fazenda Alvorada	<i>Trichoderma</i> sp.
A031-1	Fazenda Alvorada	<i>Trichoderma</i> sp.
A155*	Fazenda Alvorada	<i>Trichoderma</i> sp.
A183-1	Fazenda Alvorada	<i>Trichoderma</i> sp.
A102-2*	Fazenda Alvorada	<i>Trichoderma</i> sp.
A022-3	Fazenda Alvorada	<i>Trichoderma</i> sp.
A013	Fazenda Alvorada	<i>Trichoderma</i> sp.
A184-1*	Fazenda Alvorada	<i>Trichoderma</i> sp.
A144-1	Fazenda Alvorada	<i>Trichoderma</i> sp.
A204	Fazenda Alvorada	<i>Trichoderma</i> sp.
A144	Fazenda Alvorada	<i>Trichoderma</i> sp.
A020*	Fazenda Alvorada	<i>Trichoderma</i> sp.
A151	Fazenda Alvorada	<i>Trichoderma</i> sp.
A165-2*	Fazenda Alvorada	<i>Trichoderma</i> sp.
A196*	Fazenda Alvorada	<i>Trichoderma</i> sp.
A215-2*	Fazenda Alvorada	<i>Trichoderma</i> sp.
A174-1*	Fazenda Alvorada	<i>Trichoderma</i> sp.
A047	Fazenda Alvorada	<i>Cunninghamella</i> sp.
A004	Fazenda Alvorada	<i>Cunninghamella</i> sp.
A021	Fazenda Alvorada	<i>Cunninghamella</i> sp.
A170-2	Fazenda Alvorada	<i>Cunninghamella</i> sp.
A182	Fazenda Alvorada	<i>Cunninghamella</i> sp.
A181-1	Fazenda Alvorada	<i>Cunninghamella</i> sp.
A124	Fazenda Alvorada	<i>Cunninghamella</i> sp.
A138	Fazenda Alvorada	<i>Cunninghamella</i> sp.

(Continuação) ANEXO I – Pré-identificação a nível de gênero baseada em características macroscópicas

Código	Origem	Gênero
A058	Fazenda Alvorada	<i>Cunninghamella</i> sp.
A001-E	Fazenda Alvorada	<i>Cunninghamella</i> sp.
A066	Fazenda Alvorada	<i>Cunninghamella</i> sp.
A139-E*	Fazenda Alvorada	<i>Aspergillus</i> sp.
A017-E	Fazenda Alvorada	<i>Aspergillus</i> sp.
A140*	Fazenda Alvorada	<i>Aspergillus</i> sp.
A120-1	Fazenda Alvorada	<i>Mucor</i> sp.
A165-3	Fazenda Alvorada	<i>Mucor</i> sp.
A002	Fazenda Alvorada	<i>Mucor</i> sp.
A068	Fazenda Alvorada	<i>Mucor</i> sp.
A030	Fazenda Alvorada	<i>Mucor</i> sp.
A178	Fazenda Alvorada	<i>Mucor</i> sp.
A073-1*	Fazenda Alvorada	<i>Mucor</i> sp.
A060-1	Fazenda Alvorada	<i>Mucor</i> sp.
A206-1	Fazenda Alvorada	<i>Mucor</i> sp.
A183-2	Fazenda Alvorada	<i>Mucor</i> sp.
A040	Fazenda Alvorada	<i>Mucor</i> sp.
A154	Fazenda Alvorada	<i>Mucor</i> sp.
A186	Fazenda Alvorada	<i>Mucor</i> sp.
A193	Fazenda Alvorada	<i>Mucor</i> sp.
A168	Fazenda Alvorada	<i>Mucor</i> sp.
A023	Fazenda Alvorada	<i>Mucor</i> sp.
V006*	Fazenda Alvorada	<i>Mucor</i> sp.
A039-2	Fazenda Alvorada	<i>Mucor</i> sp.
A110	Fazenda Alvorada	<i>Mucor</i> sp.
A228	Fazenda Alvorada	<i>Mucor</i> sp.
A010-E	Fazenda Alvorada	<i>Mucor</i> sp.
A102-1	Fazenda Alvorada	<i>Mucor</i> sp.
A101-E	Fazenda Alvorada	<i>Mucor</i> sp.
A135-2	Fazenda Alvorada	<i>Mucor</i> sp.
A031-1	Fazenda Alvorada	Sem identificação
A198	Fazenda Alvorada	Sem identificação
A215-2	Fazenda Alvorada	Sem identificação
A140	Fazenda Alvorada	Sem identificação
A196	Fazenda Alvorada	Sem identificação
A038-1	Fazenda Alvorada	Sem identificação
A217-1	Fazenda Alvorada	Sem identificação
A078*	Fazenda Alvorada	Sem identificação
A165-2	Fazenda Alvorada	Sem identificação
A167*	Fazenda Alvorada	Sem identificação

*Fungos selecionados para os testes e que tiveram posterior identificação molecular (ver tabela 1, página 26).