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

**PROSPECÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE
BIOLÓGICO DE FORMIGAS CORTADEIRAS**

MARIA CAROLINA CANALI

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).

Abril - 2017

PROSPECÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE
BIOLÓGICO DE FORMIGAS CORTADEIRAS

MARIA CAROLINA CANALI

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: Fernando Carlos Pagnocca

Rio Claro

2017

595.796 Canali, Maria Carolina
C212p Prospecção de fungos entomopatogênicos para o controle
 biológico de formigas cortadeiras / Maria Carolina Canali. -
Rio Claro, 2017
 117 f. : il., figs., tabs.

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

 1. Formiga. 2. Patogenicidade. 3. Biocontrole. 4. Atta sp.
5. Antagonismo. 6. Compostos orgânicos voláteis. I. Título.


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: PROSPECÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE FORMIGAS CORTADEIRAS


AUTORA: MARIA CAROLINA CANALI

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. ANDRE RODRIGUES
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB-Rio Claro


Profa. Dra. MARIA SANTINA DE CASTRO MORINI
Núcleo de Ciências Ambientais / Universidade de Mogi das Cruzes

Rio Claro, 17 de fevereiro de 2017

*Aos meus pais, Vanilde e Nelson, e ao meu querido João Gabriel,
por desenharem a vida junto a mim.*

Dedico.

Agradecimentos

Ao final de mais esta etapa agradeço a Deus por todas as conquistas e, deixo registrada aqui, a minha gratidão por todos aqueles que contribuíram de alguma forma com o meu desenvolvimento científico e pessoal.

Aos meus pais, Vanilde e Nelson, por serem meus exemplos de honestidade, dedicação e comprometimento. Agradeço pelo cuidado, por cada gesto de confiança e pela preocupação diária. Foi através do incentivo e amor de vocês que eu pude chegar até aqui.

Ao meu amor, João Gabriel, por me apoiar em todas as decisões e ouvir com tanto zelo as minhas incertezas. Obrigada por compartilhar comigo os meus melhores e piores dias e, acima de tudo, agradeço pela leveza que você traz à minha vida.

Aos meus familiares, em especial à minha prima Camila e ao meu tio José Donizete, por serem sempre muito presentes. Agradeço por torcerem e se orgulharem em todas as conquistas. Obrigada por todo o carinho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca, por todos esses anos de convivência e aprendizado. Agradeço por ter proporcionado o meu primeiro contato com a microbiologia e, a partir deste, despertar a busca por mais conhecimentos. Talvez, dentre tantas contribuições, a mais preciosa foi ter conduzido meu crescimento profissional me estimulando a pensar e a chegar às minhas próprias conclusões. Nesta nova fase que se inicia, espero ter o privilégio de trabalhar com outras pessoas como você. Agradeço imensamente por todas as conversas e por todas as oportunidades.

À minha amiga querida, Daiane Polezel, que me ajudou em todos os momentos (desde a graduação). Saber que você faz parte dos meus dias me trouxe alegria e serenidade, mesmo nos dias em que nada dava certo. Obrigada por dividir esses anos comigo. Faltam palavras para expressar o enorme carinho que sinto por você.

Às minhas queridas amigas, Weilan Paixão e Daniela Tura, pelos inúmeros momentos de carinho e amizade. Gostaria também de agradecer a Dra Weilan pelos ensinamentos durante

a iniciação científica, eles contribuíram com a realização de cada experimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. André Rodrigues, por todos os ensinamentos sobre sistemática de fungos. Agradeço ainda ao LESF pela colaboração na identificação molecular do Escovopsis.

Ao Prof Dr. Odair Correa Bueno, por disponibilizar as colônias utilizadas nesse trabalho. Agradeço também pela confiança e por todos os aprendizados referentes às formigas-cortadeiras.

Ao doutorando Sérgio Kakazu pela preciosa contribuição com a identificação molecular dos fungos.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia, Ana Paula, Virgínia e Beatriz, pelas contribuições e convivência. Agradeço à Virgínia pelos ensinamentos sobre VOC's, edição de sequências e pela amizade.

À todos do Laboratório de Formigas Cortadeiras, por serem tão gentis e prontos a ajudar, em especial as alunas Thais e Nathalia. Obrigada por todos os ensinamentos com relação à manutenção dos ninhos de formigas-cortadeiras.

À todo o pessoal do CEIS, principalmente à Necis, por toda colaboração e atenção.

À CAPES pelo financiamento deste trabalho.

RESUMO

As formigas cortadeiras, gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, mantêm uma associação mutualística com o basidiomiceto *Leucoagaricus gongylophorus*, cultivado para alimento, o qual é responsável pela produção de enzimas despolimerases que degradam o material vegetal transportado para o interior dos ninhos. Devido a enorme quantidade de material vegetal que as formigas necessitam cortar, estas são consideradas pragas, principalmente em locais alterados por atividades antrópicas, como áreas de agricultura e reflorestamento. Frente à necessidade de manejo das formigas cortadeiras, o controle biológico representa um método ambientalmente amigável e promissor. Vários estudos relatam o potencial dos fungos entomopatogênicos no biocontrole de insetos. Contudo, os insetos sociais, como as formigas cortadeiras, possuem eficientes mecanismos de defesa do saueiro, e para estas, até o momento, não há um método de biocontrole satisfatório. Desta maneira, buscamos explorar o potencial patogênico de diversos fungos filamentosos isolados a partir do cadáver de rainhas jovens de *Atta sexdens rubropilosa*. Após isolamento, caracterização e identificação molecular, os fungos foram testados quanto a sua patogenicidade em diferentes escalas, desde operárias isoladas do saueiro, passando pelas subcolônias até chegar às colônias completas. A combinação de dois fungos entomopatogênicos mostrou-se particularmente promissora, principalmente as compostas por *Beauveria bassiana* (ENT13) com *Aspergillus nomius* (ENT22) e *B. bassiana* (ENT13) com *Isaria farinosa* (ENT02). Adicionalmente, utilizando ensaios de antagonismo “in vitro” verificamos, através de microscopia eletrônica de varredura, como ocorre a interação dos fungos entomopatogênicos com o fungo mutualista. Os resultados indicaram que as linhagens de *A. nomius* (ENT22) e *Purpureocillium lilacinum* (ENT19), além de mortais para as operárias, causaram a degradação de estruturas (hifas e gongilídeos) do *L. gongylophorus*. Os fungos entomopatogênicos também foram avaliados quanto à interação com o micoparasita especializado *Escovopsis*. O perfil de compostos orgânicos voláteis (VOC's) secretados aos sete e 14 dias de crescimento das culturas individuais de *B. bassiana* (ENT13), *I. farinosa* (ENT02) e *Escovopsis* sp. (ESC2), bem como dos co-cultivos entre entomopatógenos e micoparasita foram estudados através de análises de GC/MS. Observamos que o micoparasita interage com os entomopatógenos *B. bassiana* (ENT13) e *I. farinosa* (ENT02) através dos VOC's, cujo significado precisa ser melhor estudado.

Palavras chave: Patogenicidade. Biocontrole. *Atta* sp. Antagonismo. Compostos orgânicos voláteis.

ABSTRACT

Leaf-cutting ants, genus *Atta* and *Acromyrmex*, maintain a mutualistic association with the basidiomycete *Leucoagaricus gongylophorus*, cultivated for food, which is responsible for the production of depolymerase enzymes that degrade the plant material transported into the nests. Due to the huge amounts of plant material that the ants need to cut, they are considered pests, mainly in places altered by anthropic activities, such as agriculture and reforestation. Due to a need for handling leaf-cutting ants, biological control represents an environmentally friendly and promising method. Several studies report the potential of entomopathogenic fungi in insect biocontrol. However, social insects, such as leaf-cutting ants, have efficient defense mechanisms for the anthill, and for these, currently, there isn't a satisfactory biocontrol method. Thus, we seek to explore the pathogenic potential of several filamentous fungi isolated from the corpse of young foundress queens of *Atta sexdens rubropilosa*. After isolation, characterization and molecular identification, the fungi were tested for their pathogenicity at different scales, from workers isolated from the anthill, through the subcolonies until reaching the complete lab colonies. The combination of two entomopathogenic fungi was particularly promising, especially *Beauveria bassiana* (ENT13) with *Aspergillus nomius* (ENT22) and *B. bassiana* (ENT13) with *Isaria farinosa* (ENT02). Additionally, using "in vitro" antagonism assays, we verified, through scanning electron microscopy, how the interaction of entomopathogenic fungi with the fungus mutualist occurs. The results indicated that the strains of *A. nomius* (ENT22) and *Purpureocillium lilacinum* (ENT19), as well as mortalities for the workers, caused the degradation of structures (hyphae and gongylidia) of *L. gongylophorus*. The entomopathogenic fungi were also evaluated for their interaction with the specialized mycoparasite *Escovopsis*. The profile of volatile organic compounds (VOC's) secreted at seven and 14 days of growth of the individual cultures of *B. bassiana* (ENT13), *I. farinosa* (ENT02) and *Escovopsis* sp. (ESC2), as well as the co-cultures between entomopathogens and mycoparasite were studied through GC/MS analyzes. We observed that the mycoparasite interacts with the entomopathogens *B. bassiana* (ENT13) and *I. farinosa* (ENT02) through VOC's.

Keywords: Pathogenicity. Biocontrol. *Atta* sp. Antagonism. Volatile organic compounds

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1 Formigas da tribo Attini.....	13
2.2 Fungicultura.....	13
2.3 O Jardim de fungo.....	15
2.4 Manutenção e proteção do jardim de fungo.....	17
2.5 Controle biológico das formigas cortadeiras.....	18
2.6 Fungos entomopatogênicos.....	20
2.7 Fungos micoparasitas.....	22
2.8 Compostos orgânicos voláteis.....	24
3 CAPÍTULO 1 - Potencial dos fungos entomopatogênicos no controle biológico de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>.....	26
Resumo.....	27
3.1 Introdução.....	28
3.2 Objetivos.....	29
3.3 Material e Métodos.....	30
3.3.1 Isolamento, cultivo e preservação dos fungos entomopatogênicos.....	30
3.3.2 Identificação dos isolados.....	30
3.3.2.1 Identificação morfológica e seleção dos isolados.....	30
3.3.2.2 Identificação molecular.....	31
3.3.3 Viabilidade dos conídios.....	32
3.3.4 Teste “ <i>in vitro</i> ” da patogenicidade de fungos entomopatogênicos em operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	32
3.3.5 Teste de patogenicidade em subcolônias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	33
3.3.6 Teste de patogenicidade em subcolônias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> utilizando combinações de fungos.....	34
3.3.7 Teste de patogenicidade em colônias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> utilizando combinações de fungos.....	34
3.3.8 Avaliação de métodos de inoculação dos conídios: patogenicidade em colônias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> através do polvilhamento.....	35

3.3.9 Avaliação de métodos de inoculação dos conídios: patogenicidade em colônias <i>Atta sexdens rubropilosa</i> através da nebulização.....	36
3.4 Resultados.....	37
3.4.1 Isolamento e identificação morfológica e molecular.....	37
3.4.2 Teste “ <i>in vitro</i> ” da patogenicidade de fungos entomopatogênicos em operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	40
3.4.3 Teste de patogenicidade em subcolônias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	43
3.4.3.1 Controle negativo (Tween 80 0,05%).....	43
3.4.3.2 Controle positivo (Ballveria®).....	44
3.4.3.3 <i>Isaria farinosa</i> (ENT02).....	44
3.4.3.4 <i>Beauveria bassiana</i> (ENT13).....	44
3.4.3.5 <i>Purpureocillium lilacinum</i> (ENT19).....	44
3.4.3.6 <i>Aspergillus nomius</i> (ENT22).....	45
3.4.3.7 <i>Metharhizium anisopliae</i> (ENT25), <i>Purpureocillium lilacinum</i> (ENT29(2) e ENT36) <i>Aspergillus nomius</i> (ENT62).....	45
3.4.4 Teste de patogenicidade em subcolônias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> utilizando combinações de fungos.....	46
3.4.4.1 <i>Isaria farinosa</i> (ENT02) + <i>Aspergillus nomius</i> (ENT22).....	46
3.4.4.2 <i>Purpureocillium lilacinum</i> (ENT19) + <i>Isaria farinosa</i> (ENT02) <i>Purpureocillium lilacinum</i> (ENT19) + <i>Aspergillus nomius</i> (ENT22).....	46
3.4.4.3 <i>Beauveria bassiana</i> (ENT13) + <i>Isaria farinosa</i> (ENT02) <i>Beauveria bassiana</i> (ENT13) + <i>Purpureocillium lilacinum</i> (ENT19) <i>Beauveria bassiana</i> (ENT13) + <i>Aspergillus nomius</i> (ENT22) <i>Isaria farinosa</i> (ENT02) + <i>Beauveria bassiana</i> (ENT13) + <i>Purpureocillium lilacinum</i> (ENT19) + <i>Aspergillus nomius</i> (ENT22).....	47
3.3.5 Teste de patogenicidade em colônias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> utilizando combinações de fungos.....	49
3.4.5.1 <i>Beauveria bassiana</i> (ENT13) + <i>Isaria farinosa</i> (ENT02).....	49
3.4.5.2 <i>Beauveria bassiana</i> (ENT13) + <i>Aspergillus nomius</i> (ENT22).....	51
3.4.5.3 <i>I. farinosa</i> (ENT02) + <i>B. bassiana</i> (ENT13) + <i>P. lilacinum</i> (ENT19) + <i>A. nomius</i> (ENT22).....	53
3.4.6 Avaliação de métodos de inoculação dos conídios: patogenicidade em colônias <i>Atta sexdens rubropilosa</i> através do polvilhamento de conídios.....	53

3.4.6.1 Controle negativo.....	53
3.4.6.2 <i>Beauveria bassiana</i> (ENT13) + <i>Isaria farinosa</i> (ENT02).....	54
3.4.6.3 <i>Beauveria bassiana</i> (ENT13) + <i>Aspergillus nomius</i> (ENT22).....	54
3.4.7 Avaliação de métodos de inoculação dos conídios: patogenicidade em colônias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> através da nebulização de conídios.....	55
3.4.7.1 <i>Beauveria bassiana</i> (ENT13) + <i>Isaria farinosa</i> (ENT02).....	55
3.4.7.1 <i>Beauveria bassiana</i> (ENT13) + <i>Aspergillus nomius</i> (ENT22).....	55
3.5 Discussão.....	56
3.6 Conclusão.....	62
4 CAPÍTULO 2 - Interações microbianas: ação dos fungos entomopatogênicos frente ao fungo mutualista das formigas cortadeiras e ao micoparasita <i>Escovopsis</i>....	63
Resumo.....	64
4.1 Introdução.....	65
4.2 Objetivos.....	67
4.3 Material e Métodos.....	68
4.3.1 Interações microbianas.....	68
4.3.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	70
4.3.3 Compostos orgânicos voláteis (VOC's).....	70
4.4 Resultados.....	72
4.4.1 Interações microbianas.....	72
4.4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	74
4.4.3 Compostos orgânicos voláteis.....	79
4.4.3.1 <i>Beauveria bassiana</i> (ENT13).....	79
4.4.3.2 <i>Isaria farinosa</i> (ENT02).....	81
4.4.3.3 <i>Escovopsis</i> sp. (ESC2).....	84
4.4.3.4 Co-cultivo de <i>Beauveria bassiana</i> (ENT13) com <i>Escovopsis</i> sp. (ESC2).....	87
4.4.3.5 Co-cultivo de <i>Isaria farinosa</i> (ENT02) e <i>Escovopsis</i> sp. (ESC2).....	89
4.5 Discussão.....	93
4.6 Conclusão.....	98
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	99
REFERÊNCIAS.....	100

1 INTRODUÇÃO

O controle biológico das formigas cortadeiras 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).

Frente a necessidade de desenvolver métodos de controle menos agressivos ao ambiente, o estudo dos fungos entomopatogênicos como agentes do biocontrole merece atenção (CHARNLEY, 1997; BOARETTO; FORTI, 1997). Normalmente, estes fungos são estudados quanto à mortalidade que causam nas formigas (DELLA LUCIA; VILLELA, 1993). Já quando o alvo do método de biocontrole é o fungo mutualista são empregados fungos antagonistas e micoparasitas, tais como aqueles dos gêneros *Acremonium*, *Trichoderma*, *Escovopsis*, *Mucor* e *Syncephalastrum* (SILVA et al., 2006; BARCOTO et al., 2016; FOLGARAIT et al., 2011). O estudo de compostos orgânicos voláteis secretados por micro-organismos também pode representar uma fonte de compostos promissores ao controle biológico de insetos (HEIL, 2008; STENBERG et al., 2015; KANDASAMY et al., 2016; MITHÖFER et al., 2016; WERNER et al., 2016). Contudo esta é uma área ainda pouco explorada e, apesar de muitos compostos serem detectados, as informações sobre sua atividade biológica ainda são escassas (von REUSS et al., 2010; PIECHULLA; DEGENHARDT, 2014).

O presente trabalho teve como objetivo estudar o potencial de fungos entomopatogênicos no controle biológico de formigas cortadeiras e elucidar como estes podem atuar não apenas quanto à mortalidade de operárias, mas também na complexa interação mutualística presente nos saúveiros. 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 determinar a atividade entomopatogênica de fungos filamentosos isolados de cadáveres de rainhas jovens de *Atta sexdens rubropilosa*, selecionando as linhagens mais promissoras aos métodos de biocontrole. No Capítulo 2, os estudos prosseguiram com as linhagens mais patogênicas (selecionadas no Capítulo 1) no sentido de verificar a interação destas com o fungo mutualista e com o micoparasita especializado das formigas cortadeiras. Estudos de microscopia eletrônica de varredura e

análises dos compostos orgânicos voláteis foram empregados na elucidação dos mecanismos de interação entre esses micro-organismos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Formigas da tribo Attini

As formigas da tribo Attini (Hymenoptera: Formicidae) correspondem a um grupo monofilético composto por aproximadamente 300 espécies descritas dentro de 15 gêneros (SCHUTZ; BRANDY, 2008; JEŠOVNIK; GONZÁLEZ; SCHULTZ, 2016). Elas são caracterizadas pela dependência do cultivo de fungos como alimento (MUELLER et al., 2001; PAGNOCCA et al., 2001; BRANDÃO, MAYHÉ-NUNES; SANHUDO, 2011). Como sugerido por Kusnezov (1964), a tribo Attini pode ser subdividida em dois clados, Paleoattini e Neoattini. O clado Paleoattini é constituído pelos gêneros *Apterostigma*, *Myrmicocrypta* e *Mycocepurus*. Já Neoattini (conhecido como Attini derivadas), engloba os demais gêneros, incluindo *Acromyrmex* e *Atta*, os quais correspondem às chamadas formigas cortadeiras (FISHER; STRADLING; PEGLER, 1994; HÖLLDOBLER; WILSON, 2010).

As formigas cortadeiras utilizam material vegetal recém- cortado como substrato ao desenvolvimento de seu fungo mutualista (MARICONI, 1970; WEBER, 1972). Desta maneira necessitam cortar uma elevada quantidade de material vegetal e, por isso, são considerados os herbívoros dominantes dos Neotrópicos (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Apesar de serem consideradas generalistas, algumas espécies cortam apenas gramíneas, já outras se especializaram em *Magnoliopsidas* (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; BEATTIE; HUGHES, 2003). As demais formigas da tribo Attini, não atacam plantas e por isso tem recebido menor atenção (FISHER; STRADLING; PEGLER, 1994; HÖLLDOBLER; WILSON, 2010).

2.2 Fungicultura

O cultivo de fungos como alimento originou-se há aproximadamente 67 milhões de anos e, ao longo da história evolutiva, as formigas cortadeiras e os fungos passaram a não mais sobreviver separadamente (SCHULTZ; BRADY, 2008). De acordo Mueller et al. (2001), a relação dos fungos como principal fonte de alimento evoluiu de maneira independente duas vezes entre as formigas: (i) formigas cultivadoras de fungos, dependentes do cultivo de um fungo mutualista para a alimentação; (ii) formigas *Megalomyrmex silvestrii*, parasitas sociais da tribo Attini e que consomem o fungo cultivado por sua hospedeira.

Ainda, segundo Mueller et al. (2001), a origem da fungicultura pode ser explicada por meio de dois modelos principais, o modelo tradicional e o modelo alternativo. A principal diferença entre os dois modelos é o momento evolutivo da transmissão de fungos especializados em relação às origens do consumo e cultivo. O modelo tradicional (e amplamente aceito) propõe a existência de uma fase em que fungos não especializados cresciam acidentalmente em formigueiros e passaram a compor a dieta das formigas. Posteriormente, as formigas desenvolveram a capacidade de cultivá-los e finalmente foram capazes de transmitir esses fungos para novos ninhos. O segundo modelo, conhecido como modelo alternativo, postula os mesmos fatos propostos pelo modelo tradicional, mas de maneira reordenada. Segundo este, inicialmente as formigas não se alimentavam de fungos, elas eram apenas usadas por fungos especializados como vetores de dispersão. Em um segundo momento, as formigas passaram a se alimentar destes fungos e evoluiu a capacidade de cultivá-los.

Os fungos cultivados pela tribo Attini são basidiomicetos pertencentes à família Agaricaceae (Agaricales: Basidiomycota) e estão distribuídos em 12 gêneros distintos (CHAPELA et al., 1994; CURRIE et al., 1999a). Ainda, entre os sistemas de cultivo desenvolvidos, o cultivo do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* realizado pelas formigas cortadeiras, gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, representa o mais complexo sistema de monocultura estudado (CURRIE et al., 1999a, MUELLER et al., 1998).

A reprodução sexuada do fungo mutualista na natureza foi raramente relatada (MUELLER et al., 1998; MUELLER et al., 2001; PAGNOCCA; RODRIGUES; BACCI JR, 2011). Desta maneira, o fungo *L. gongylophorus* é transmitido verticalmente entre as gerações de formigas cortadeiras de modo vegetativo. Isso ocorre quando a rainha virgem deixa o ninho parental com uma pequena quantidade de fungo na cavidade infrabucal, sendo este inóculo fúngico utilizado na fundação de um novo ninho (WEBER, 1972; QUINLAN; CHERRETT, 1979). Há ainda, a possibilidade de uma formiga coletar o fungo (de vida livre ou de outra formiga) e passar a cultivá-lo em seu ninho, processo denominado de aquisição horizontal (CHAPELA et al, 1994; MUELLER et al., 1998; SCHULTZ et al., 2008). No entanto, segundo Bot et al. (2001), a transmissão horizontal não foi observada na natureza, apenas induzida em ninhos laboratoriais.

Sendo assim, o fungo mutualista possui uma pequena variabilidade genética (CURRIE et al., 1999a; CURRIE, 2001). Esta baixa variabilidade genética foi confirmada no estudo de Mueller et al. (2010), no qual constatou-se que apenas uma linhagem do fungo mutualista é mantida pelas operárias de *Atta texana*, ou seja, trata-se de uma monocultura. A uniformidade

genética apresentada pelo mutualista contribui para sua vulnerabilidade a infecções por parasitas (CURRIE et al., 1999a; CURRIE, 2001).

2.3 O Jardim de fungo

O fungo mutualista *L. gongylophorus*, desenvolve-se nos chamados jardins de fungo, os quais são constituídos por material vegetal, secreções de formigas e biomassa do próprio fungo (MOREIRA; ERTHAL Jr; SAMUELS, 2011). A relação simbiótica entre as formigas cortadeiras e o *L. gongylophorus* envolve interações complexas entre os dois organismos. O sucesso desta associação se deve, provavelmente, a habilidade metabólica do fungo e sua capacidade de produzir várias enzimas despolimerases, tais como pectinases e celulases (BACCI et al., 1995; SIQUEIRA et al., 1998; SILVA et al., 2006). Estas enzimas promovem a degradação extracelular dos polissacarídeos que compõem a matéria vegetal, disponibilizando açúcares simples, como a glicose (BACCI et al., 1995). O conteúdo nutritivo é armazenado em hifas especializadas, denominadas gongilídeos (HÖLLDOBLER et al., 1990). Segundo Hölldobler et al. (1990), os gongilídeos são a única fonte de alimento das larvas, rainha e alados. Já a dieta das operárias é mais variável e estas podem complementar sua nutrição com a seiva vegetal ou com carboidratos solúveis presentes nos jardins de fungo. Em troca, as formigas fornecem um ambiente altamente propício ao desenvolvimento fúngico, além de substrato para o seu crescimento e proteção contra competidores e parasitas (MUELLER, 2001; CURRIE et al., 2003; SIQUEIRA et al., 1998; ERTHAL Jr. et al., 2009; PAGNOCCA; RODRIGUES; BACCI Jr, 2011).

De acordo com Currie et al. (2003), a relação simbiótica presente em Attini envolve, além das formigas cortadeiras e seu fungo mutualista, mais dois grupos de micro-organismos: os parasitas fúngicos pertencentes ao gênero *Escovopsis* (Ascomycota; Hypocreales) e as supostamente benéficas bactérias filamentosas do gênero *Pseudonocardia* (família Pseudonocardiaceae). Ainda, em muitos estudos, os formigueiros são considerados como um “organismo” composto por uma complexa microbiota. Além do gênero *Pseudonocardia*, vários gêneros de bactérias já foram isolados dos jardins de fungo, sendo que alguns desses gêneros também exercem importante papel na inibição do parasita *Escovopsis*. Leveduras e diversos fungos filamentosos também fazem parte dos jardins de fungo e da microbiota presente no microambiente mais próximo das formigas cortadeiras (CRAVEN et al., 1970; CURRIE; STUART, 2001; AUGUSTIN; DIEHL; SAMUELS; ELLIOT, 2011).

A ocorrência de actinobactérias, gênero *Pseudonocardia*, foi primeiramente descrita por Currie et al. (1999b). Segundo esses autores, elas produzem antibióticos capazes de inibir o crescimento do micoparasita *Escovopsis*, e conseqüentemente, podem contribuir com a defesa do jardim de fungo. Essas bactérias são encontradas predominantemente na cutícula das operárias, mais especificamente em regiões modificadas (propleura, por exemplo) do exoesqueleto conectadas a glândulas exócrinas. Provavelmente, essas glândulas secretam nutrientes que são utilizados no crescimento das colônias de *Pseudonocardia* sp. A transmissão de *Pseudonocardia*, ocorre verticalmente, por meio de um inóculo inicial presente na cutícula de fêmeas aladas, com posterior propagação às operárias (CURRIE et al., 2003; CAFARO et al., 2010).

Com relação ao gênero *Escovopsis*, o primeiro relato de sua presença em colônias da tribo Attini foi realizado por Möller (1893), um dos pioneiros no estudo dessas formigas. No entanto, naquele momento, *Escovopsis* foi considerado uma expressão mais vigorosa do fungo mutualista (MÖLLER, 1893). O reconhecimento do gênero como micoparasita ocorreu apenas em 1999 (CURRIE et al., 1999a). Segundo, Reynolds e Currie (2004), o fungo *Escovopsis* não utiliza os nutrientes presentes no jardim de fungos para a sua nutrição, mas sim o conteúdo citoplasmático das hifas do fungo mutualista, sendo considerado um micoparasita necrótrofo de contato. No entanto, apesar de tratar-se de uma relação especializada, Meirelles et al. (2015a) sugerem que qualquer gênero de Attini derivada pode compartilhar infecções por linhagens relacionadas do fungo *Escovopsis*. Não havendo uma estreita correspondência entre gêneros (ou espécies) de atíneas derivadas e diferentes linhagens de *Escovopsis*.

O estudo de Currie et al. (1999a) com ninhos da tribo Attini de ocorrência natural na América Central, estimou que 28,1% a 77,5% dos ninhos apresentam contaminação por *Escovopsis*, dependendo do gênero de formiga. O principal efeito da infecção por *Escovopsis* é a redução da biomassa do jardim, além do dispêndio de energia pelas operárias para conter a contaminação, o que causa impactos negativos no desenvolvimento da colônia (CURRIE; STUART, 2001).

Atualmente, o gênero *Escovopsis* é composto por sete espécies, a saber: *Escovopsis weberi* isolada de *Atta* sp. (MUCHOVEJ; DELLA LUCIA, 1990), *Escovopsis aspergilloides* isolada de *Trachymyrmex ruthae* (SEIFERT et al., 1995), *Escovopsis lentecrescens*, *Escovopsis microspora* e *Escovopsis moelleri* isoladas de *Acromyrmex* spp. (AUGUSTIN et al., 2013), *Escovopsis kreiselii* isolada de *Mycetophylax morschi* (MEIRELLES et al., 2015b) e *Escovopsis trichodermoides* isolada de *Mycocetopus goeldii* (MASIULIONIS et al., 2015).

De acordo com Currie (2001) e Little et al. (2006) a transmissão do micoparasita *Escovopsis* está relacionada à veiculação de esporos assexuados que aderem ao corpo de artrópodes que visitam os ninhos. Já o estudo de Augustin et al. (2011) indica que uma possível fonte de transmissão do micoparasita seja o material de refugio proveniente do jardim de fungos. Isto porque, algumas espécies de formigas dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* retiram fragmentos infectados por *Escovopsis* do jardim de fungos e depositam esse material fora dos ninhos. O fungo *Escovopsis* é capaz de se desenvolver e esporular utilizando esse substrato e os esporos podem ser dispersos por fatores ambientais, como vento e chuva, podendo contaminar as operárias forrageadoras de outras colônias.

2.4 Manutenção e proteção do jardim de fungo

Assim que o substrato vegetal chega à colônia, as formigas iniciam o processo de preparação do mesmo. O material é cortado em fragmentos muito pequenos, ao mesmo tempo em que são lambidos e mastigados. Esta etapa elimina alguns micro-organismos presentes na superfície foliar, além de desestabilizar a estrutura da folha, a qual é naturalmente resistente à invasão fúngica. O processo resulta não apenas no aumento da área superficial disponível ao fungo mutualista, mas também promove uma desinfecção local através da adição de secreções glandulares e de fluido fecal. Acredita-se que, desta maneira, enzimas hidrolíticas produzidas pelo próprio fungo mutualista e que foram ingeridas pelas formigas, retornam ao jardim de fungo, uma vez que não são alteradas pela passagem no trato digestivo das operárias. O fungo leva aproximadamente seis semanas para degradar completamente o substrato vegetal e, durante esse período, materiais frescos são adicionados novamente ao jardim, resultando em um processo contínuo (CURRIE, 2001).

O material vegetal exaurido, além de cadáveres de operárias, larvas e pupas, mais fragmentos envelhecidos do jardim de fungo, são removidos frequentemente e depositados em uma pilha de detritos localizada em pontos específicos das colônias, e às vezes também externamente. Este material de descarte ainda contém nutrientes e matéria orgânica que podem promover o desenvolvimento de patógenos, representando uma ameaça a saúde das formigas e de seu jardim de fungos (BOT et al., 2001). Dentre esses patógenos encontram-se fungos como *Trichoderma viride*, *Aspergillus flavus* e *Fusarium* sp., além do *Escovopsis* (LACERDA; DELLA LUCIA; SOUZA, 2011; FARJI-BRENER; MEDINA, 2000; AUGUSTIN et al., 2013).

Além do manejo do material de descarte, outros comportamentos praticados pelas formigas cortadeiras resultam na proteção de seus ninhos. Entre esses comportamentos, destaca-se a remoção física de contaminantes, denominado “*grooming*”. Esporos e tecidos de fungos removidos por este processo acumulam-se na cavidade infrabucal e posteriormente são descartados na forma de *pellets*, nas pilhas de descarte. Ainda, segundo Currie e Stuart (2001), ocorrendo contaminação do jardim de fungos, as operárias realizam o comportamento denominado “*weeding*”, que consiste na remoção das partes contaminadas, evitando o desenvolvimento do patógeno. O desenvolvimento do invasor também pode ser suprimido pela produção de compostos químicos (antibióticos), secretados pelas glândulas metapleurais e mandibulares (CURRIE, 2001; FISHER; STRADLING; PEGLER, 1994; KNAPP et al., 1994). Em conjunto, esses comportamentos são mecanismos de proteção eficientes, dificultando a utilização de inimigos naturais para o controle desses insetos.

2.5 Controle biológico das formigas cortadeiras

É inegável a importância ecológica das formigas cortadeiras em seus ecossistemas naturais, sendo que suas atividades de forrageamento contribuem com a produtividade e a ciclagem de nutrientes e energia no ambiente (FOWLER et al., 1989). Além disso, a atividade das formigas cortadeiras altera os componentes bióticos e abióticos do solo, promovendo sua aeração e drenagem, possibilitando uma melhor mineralização dos nutrientes (FOWLER et al., 1989). No entanto, devido ao desfolhamento de plantas economicamente importantes em áreas da agricultura e reflorestamento, estas formigas são caracterizadas como pragas em diversos países da América do Sul (CHERRETT, 1986; DELLA LUCIA; GANDRA; GUEDES, 2014). Além dos danos causados pelo desfolhamento, o desenvolvimento dos ninhos pode resultar em erosões nas imediações do formigueiro e, conseqüentemente, em danos físicos aos animais e aos equipamentos mecânicos, com possível desvalorização das propriedades infestadas (FOWLER et al., 1990; DELLA LUCIA, 1999).

No entanto, ao contrário das outras pragas comuns à agricultura, as formigas cortadeiras exibem uma complexa estrutura social, com inúmeras adaptações de forrageamento, cultivo de fungo e higiene, o que dificulta seu controle e manejo (BOARETTO; FORTI, 1997). Desta maneira, devido à associação obrigatória entre as formigas cortadeiras e seu fungo mutualista, o sucesso do método de controle depende de: (i) atingir as formigas cortadeiras resultando na morte da rainha, ou impactando de forma maciça as operárias, as quais correspondem à casta responsável pelos cuidados à rainha, larvas, pupas

e ao jardim de fungo; (ii) atingir o seu fungo mutualista e assim causar a morte do saubeiro por falta de nutrientes; (iii) causar danos em ambos, formigas e fungo mutualista.

Neste contexto, atualmente, existem poucas opções eficazes para o controle das formigas cortadeiras, sendo os métodos químicos os mais eficientes em aplicações de larga escala (BOARETTO; FORTI, 1997; DELLA LUCIA; GANDRA; GUEDES, 2014). O controle químico pode ser realizado através da aplicação direta do produto nos ninhos ou através de iscas granuladas que são distribuídas próximas às trilhas e orifícios do formigueiro e introduzidas na colônia através das operárias. Até 1993, o dodecacloro aplicado à polpa cítrica foi a melhor alternativa no controle químico das formigas. Atualmente, a sulfluramida (perfluoroctano sulfonamida) é o principal substituto do dodecacloro. Nas colônias, as iscas contendo sulfluramida são incorporadas e em até 18 horas após a sua distribuição, 50 a 70% das operárias tornam-se contaminadas. O metabólito perfluoroctano sulfonamida (DESFA) atua na fosforilação oxidativa e interrompe a síntese de ATP na matriz mitocondrial. Após o quarto dia da aplicação é observada intensa desorganização da colônia (DELABIE, 1989; BOARETTO; FORTI, 1997).

Entretanto, esses compostos químicos não são biodegradados e acumulam-se no ambiente, resultando em efeitos tóxicos para organismos não alvos (GOOSEY, 2010). Sendo assim, torna-se necessário buscar um método de controle eficiente, menos tóxico e mais específico. Nessa situação, o controle biológico é uma área de pesquisa promissora. É sabido que ocorre elevada mortalidade (99,95%) das rainhas de formigas cortadeiras antes da fundação dos ninhos (BOARETTO; FORTI, 1997). Essa elevada mortalidade é imposta por predadores, parasitoides e micro-organismos patogênicos que, em conjunto, controlam a população de insetos (BOARETTO; FORTI, 1997).

Os fungos compõem um grupo promissor ao desenvolvimento de inseticidas biológicos. Isto porque, eles são naturalmente adaptados às condições microclimáticas do formigueiro e têm demonstrado capacidade patogênica e antagonista contra formigas e seu fungo mutualista. Ainda, dentro da grande diversidade de fungos existente, os fungos entomopatogênicos destacam-se pela sua alta capacidade de causar a morte do hospedeiro infectado (LOPEZ; ORDUZ, 2003; SANTOS et al., 2007; AUGUSTIN; DIEHL, SAMUELS; ELLIOT, 2011).

2.6 Fungos entomopatogênicos

Os fungos entomopatogênicos são inimigos naturais de uma ampla variedade de insetos, atacando larvas e adultos. Os conídios (esporos assexuais), em geral, representam a forma infectante dos fungos entomopatogênicos, compartilhando o ambiente com seus hospedeiros potenciais. Geralmente, esses fungos são muito virulentos e após a infecção, produzem metabólitos secundários capazes de degradar os órgãos internos dos insetos, causando obrigatoriamente a morte de seus hospedeiros (SCHMID-HIMPEL, 1998; AUGUSTIN; DIEHL; SAMUELS; ELLIOT, 2011).

Após o contato entre os esporos e o inseto, a infecção fúngica se desenvolve em três etapas principais. Primeiramente, ocorre a adesão e germinação do esporo fúngico na cutícula externa do inseto. Após a germinação do esporo, ocorre a formação de um tubo germinativo, sendo que este inicia a fase de penetração na cutícula do inseto. A penetração do tubo germinativo depende da produção de enzimas líticas, tais como proteases, quitinases, fosfolipases C e catalases capazes de degradar a cutícula do hospedeiro (FRAZZON et al., 2000, BARRETO et al., 2004; BOLDO et al., 2009; BUTT et al., 2016). Os monômeros resultantes da atividade enzimática podem ser metabolizados pelo tubo germinativo impulsionando seu desenvolvimento. Desta maneira, muitas vezes o nível de produção de enzimas é diretamente relacionado com a agressividade do fungo entomopatogênico (SAMSON et al., 1988; SCHMID-HIMPEL, 1998).

No interior da hemocele do hospedeiro, o fungo entomopatogênico é atacado pelo sistema imunológico. No entanto, o fungo é capaz de superar os mecanismos imunológicos através de duas estratégias principais: (i) desenvolvimento de formas crípticas que não são identificadas pelo sistema imunológico; (ii) produção de imuno-moduladores capazes de suprimir a resposta imunológica do hospedeiro. Assim, no interior do inseto, os fungos entomopatogênicos produzem micotoxinas e conseguem invadir tecidos específicos, causando a morte do hospedeiro infectado. O crescimento fúngico irá resultar na produção de esporos reprodutivos e na sua dispersão, finalizando o ciclo de vida (SAMSON et al., 1988; SCHMID-HIMPEL, 1998; SCHRANK; VAINSTEIN, 2010; BUTT et al., 2016).

Devido ao elevado sucesso da infecção por fungos entomopatogênicos, eles foram os primeiros agentes utilizados no controle microbiano de insetos. Atualmente, são conhecidas aproximadamente 750 espécies de fungos entomopatogênicos, sendo os gêneros *Beauveria*, *Metarhizium*, *Lecanicillium* e *Isaria* os mais utilizados comercialmente devido à fácil obtenção de biomassa fúngica (VEGA et al., 2009; AUGUSTIN; DIEHL; SAMUELS;

ELLIOT, 2011; BUTT et al., 2016). No entanto, 80% dos bioinseticidas formulados utilizando fungos entomopatogênicos e que estão disponíveis comercialmente baseiam-se apenas nos gêneros *Metarhizium* e *Beauveria* (DE FARIA; WRAIGHT, 2007).

Os ascomicetos *Metarhizium* e *Beauveria* são associados aos hospedeiros principalmente terrestres, sendo que os insetos que cavam ninhos no solo são mais susceptíveis à infecção (SUN et al., 2008). Com relação à patogenicidade desses fungos e sua potencialidade no controle biológico de formigas cortadeiras, experimentos realizados por Jaccoud et al. (1999) demonstraram que uma quantidade de 0,5 g de esporos secos de *Metarhizium anisopliae* misturados à polpa cítrica foi capaz de causar a mortalidade de 100 % de subcolônias laboratoriais após 34 dias da inoculação. Essas subcolônias eram compostas por 75 mL de jardim de fungos e indivíduos de todas as castas (com exceção da rainha) de *Atta sexdens rubropilosa*. Segundo o autor, nas condições experimentais empregadas, as minicolônias não infectadas sobrevivem por aproximadamente quatro meses. Resultados similares foram obtidos por Diehl-Fleig et al. (1991) utilizando *Beauveria bassiana* contra colônias naturais de *Acromyrmex striatus*. Nestes estudos, a mortalidade máxima das colônias foi observada com 34 e 75 dias, respectivamente, após a contaminação.

O gênero *Metarhizium* é amplamente distribuído na natureza, sendo encontrado na rizosfera de plantas, no solo e em cadáveres de uma ampla diversidade de insetos. A espécie *M. anisopliae* var. *anisopliae* é considerada um dos principais parasitas de insetos e ocorrem com relativa abundância nas proximidades de ninhos de algumas espécies de *Acromyrmex* e *Atta* (particularmente nos 5 cm de terra ao redor do ninho) (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010; RUIZ-SANCHEZ et al. 2010). Dentre os metabólitos secundários produzidos pelo gênero *Metarhizium*, há prevalência de hexadepsipeptídeos cíclicos, também denominados deuteróxinas (dtxs), sendo estes capazes de acelerar a morte do inseto infectado. Os efeitos da deuteróxina nos hospedeiros incluem atividades imunossupressoras, anti-inflamatórias, antibióticas e antitumorais. Tais atividades decorrem de diversos eventos tecido e espécie específicos, tais como alteração no fluxo de íons cálcio, fosforilação de proteínas, inibição da H⁺ATPase e supressão da imunidade inata (PEDRAS et al., 2002; SCHRANK; VAINSTEIN, 2010; RUIZ-SANCHEZ et al., 2010; LIU; TZENG, 2012).

Com relação ao gênero *Beauveria*, este também engloba espécies capazes de infectar uma ampla diversidade de hospedeiros, destacando-se a morfoespécie *B. bassiana sensu lato* capaz de infectar mais de 200 espécies de insetos. Os fungos do gênero *Beauveria* são generalistas, não apresentando especificidade quanto ao hospedeiro. Além de sua distribuição no solo, este fungo pode ocorrer como endófito de plantas (AUGUSTIN; DIEHL;

SAMUELS; ELLIOT 2011). Segundo Genthner et al. (1994), o ascomiceto *Beauveria*, produz uma micotoxina denominada beauvericina. Ainda, de acordo com Xu et al. (2008), a beauvericina é um ionóforo capaz de transportar cátions monovalentes através da membrana plasmática e desempenha atividades antibióticas, antifúngicas, herbicidas e inseticidas; no entanto, seu papel na patogenicidade do gênero *Beauveria* não foi completamente elucidado.

Atualmente, a espécie *Purpureocillium lilacinum* (inicialmente *Paecilomyces lilacinus*) foi utilizada como agente de controle biológico em *Acromyrmex lundii* (GOFFRÉ; FOLGARAIT, 2015). O estudo realizado por Goffré e Folgarait (2015), utilizando ensaios *in vitro* com operárias isoladas do saúveiro, demonstrou que a espécie *P. lilacinum* foi responsável pela morte de 80 – 90% das formigas inoculadas com 10^6 conídios/ mL. Além disso, o patógeno foi transmitido entre as operárias, e neste caso, 40-60% das operárias não inoculadas também morreram devido a infecção por *P. lilacinum*.

2.7 Fungos micoparasitas

Na busca por métodos de controle biológico, os fungos entomopatogênicos são comumente testados em relação à mortalidade das formigas (DELLA LUCIA; VILLELA, 1993). No entanto, a sua ação frente ao fungo mutualista cultivado pelas formigas cortadeiras permanece desconhecido. Apenas o estudo de Folgarait et al. (2011) avaliou a ação do fungo entomopatogênico *Leucanicillium lecani* contra o *L. gongylophorus*, verificando que houve interferência com o crescimento do mutualista (FOLGARAIT et al., 2011). Desta maneira, os estudos até agora realizados objetivando a seleção de linhagens fúngicas para o controle biológico das formigas cortadeiras via ataque ao mutualista, comumente utilizam apenas fungos micoparasitas.

Os fungos micoparasitas são aqueles capazes de utilizar outro fungo como fonte de nutrientes (BARNETT, 1964; GOH; VUJANOVIC, 2010). Ainda, de acordo com os mecanismos de ação do parasita e os efeitos causados no hospedeiro, os micoparasitas podem ser subdivididos em dois tipos: biotróficos ou necrotróficos. Os micoparasitas biotróficos, obtêm nutrientes a partir do citoplasma do hospedeiro vivo e, apesar de causarem danos, não provocam a morte do hospedeiro. Trata-se de uma interação especializada, na qual o parasita produz estruturas especiais de infecção, como os haustórios. Devido a esta especialização, os fungos biotróficos infectam uma faixa restrita de hospedeiros (BARNETT, 1964).

Já os micoparasitas necrotróficos podem atingir diversos hospedeiros, uma vez que seus mecanismos de ação não são especializados. Esta associação causa a morte do

hospedeiro pela secreção de enzimas líticas que degradam sua parede celular. Neste caso de micoparasitismo, as hifas do parasita crescem em associação com as hifas do hospedeiro, podendo ocorrer penetração ou não (BARNETT, 1964). Desta maneira, os micoparasitas necrotróficos podem ser subdivididos como necrótrofos *de contato* ou necrótrofos *invasivos*. No caso dos necrótrofos de contato, a degradação das hifas do hospedeiro ocorre sem a penetração das hifas do micoparasita. Já os micoparasitas necrótrofos invasivos penetram suas hifas no tecido hospedeiro (JEFFRIES; YOUNG, 1994).

Com relação aos estudos utilizando micoparasitas ou antagonistas ao jardim de fungos das formigas cortadeiras, os ensaios realizados *in vitro* por Silva et al. (2006) demonstraram que os fungos *Acremonium kiliense*, *Trichoderma harzianum* e *Escovopsis weberi* suprimem o crescimento do fungo mutualista. Ainda, as cepas mais agressivas de *T. harzianum* e *E. weberi* degradaram quase totalmente as colônias de *L. gongylophorus* após 15 dias de infecção. Com relação ao fungo *Syncephalastrum racemosum*, estudos *in vitro* realizados por Barcoto et al. (2016) demonstraram que este inibe o crescimento do *L. gongylophorus*. Ainda, em uma escala maior, Barcoto et al. (2016) utilizando subcolônias de *Atta sexdens rubropilosa* verificaram que a infecção por *S. racemosum* causou a morte das subcolônias.

Ainda, com relação ao fungo do gênero *Escovopsis*, seu crescimento micelial é extremamente rápido e em ensaios de laboratório o micoparasita pode ocupar todo o espaço destinado ao jardim de fungos em 72 horas (PAGNOCCA et al., 2011). Apesar da reconhecida agressividade do gênero *Escovopsis* frente ao mutualista, o trabalho de Zamunér (2015) demonstrou que a aplicação de esporos em colônias saudáveis mantidas em laboratório não é eficaz no controle biológico das formigas cortadeiras. Isto porque, em colônias saudáveis, os mecanismos de proteção são muito eficientes e logo após a inoculação dos esporos do parasita, as operárias retiram os fragmentos contaminados e a infecção não se estabelece. Desta maneira, fica evidenciado que o sucesso no controle dessas formigas depende de ações sucessivas combinadas. Um bom começo é promover o desequilíbrio da colônia antes da inoculação do micoparasita. Essa desestruturação pode ser realizada pela presença de um entomopatógeno, o qual pode reduzir o número de operárias, e consequentemente, a capacidade das formigas em remover os fragmentos contaminados por *Escovopsis* (HUGHES; BOOMSMA, 2004; FOLGARAIT et al., 2011). Sendo assim, para o desenvolvimento desta promissora estratégia há necessidade de se pesquisar quais as melhores linhagens de fungos entomopatogênicos que podem ser associadas ao principal micoparasita do jardim de fungos das formigas cortadeiras, buscando combinações que sejam eficientes para o biocontrole.

2.8 Compostos orgânicos voláteis

O estudo dos compostos orgânicos voláteis (VOC's) representa outra vertente promissora ao desenvolvimento de métodos de biocontrole de insetos, uma vez que estes apresentam efeitos tóxicos, repelentes ou antimicrobianos (HEIL, 2008; STENBERG et al., 2015; MITHÖFER et al., 2016; WERNER et al., 2016). O trabalho de Chen et al. (2015) demonstra o potencial do composto trans-2-Hexenal no controle biológico da mosca *Bradysia odoriphaga*. Os autores relataram que concentrações de 0,5 – 0,8 µg/L de trans-2-Hexenal são capazes de causar a morte em diferentes fases de desenvolvimento da *B. odoriphaga*. Kandasamy et al. (2016) descreveram a utilização de compostos orgânicos voláteis no controle biológico de besouros que atacam coníferas. Entre esses compostos estão alcoóis, terpenos, compostos aromáticos e alcoóis alifáticos produzidos por fungos Ascomicetos pertencentes aos gêneros *Ophiostoma*, *Grosmannia* e *Endoconidiophora*. Ainda, outros trabalhos sugerem o emprego de substâncias atraentes aos insetos a fim de atraí-los e matá-los, reduzindo assim os efeitos sobre organismos não-alvo (ABRAHAM et al., 2015; GEORGE et al., 2016; SARKAR et al., 2016).

De acordo com Beck et al. (2016), dentre as diversas fontes de compostos voláteis, os compostos secretados por micro-organismos são ideais em aplicações agrícolas, pois são específicos ao organismo que se deseja controlar. No entanto, apenas recentemente a riqueza de compostos orgânicos voláteis microbianos começou a ser estudada (PIECHULLA; DEGENHARDT, 2014). Ainda, as condições de cultivo, tais como umidade, temperatura, pH e disponibilidade de oxigênio podem influenciar na composição de voláteis secretados (CRESPO et al., 2008; EFFMERT et al., 2012; FARAG et al., 2013).

O perfil de voláteis secretados durante interações microbianas também pode ser distinto daquele observado durante os cultivos individuais (EFFMERT et al., 2012; FARAG et al., 2013; PEÑUELAS et al., 2014). Desta forma, trata-se de um campo de estudo extremamente amplo, e não apenas as atividades biológicas desses compostos devem ser desvendadas como também suas estruturas químicas (von REUSS et al., 2010; PIECHULLA; DEGENHARDT, 2014).

O primeiro relato de compostos orgânicos voláteis produzidos por fungos entomopatogênicos foi realizado por Crespo et al. (2008). O estudo explorou o perfil de voláteis secretados pela espécie *Beuaveria bassiana* cultivada em duas fontes de carbono distintas. As análises revelaram que as linhagens cultivadas em glicose produziram principalmente diisopropilnaftalenos, etanol e sesquiterpenos, enquanto que as culturas

crecidas na presença de alcanos secretaram predominantemente o composto n-decano. Com relação à presença de alcanos, o trabalho de Hussain et al. (2010) verificou que linhagens mais virulentas das espécies de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* secretam uma pequena quantidade de alcanos ramificados, em comparação com linhagens não virulentas. O estudo ainda sugere que os compostos 2-fenilpropanal, 2,5,5-trimetil-1-hexeno, n-tetradecano e 2,6-dimetilheptadecano são responsáveis pela elevada mortalidade de insetos infectados, isto porque esses compostos foram detectados apenas em linhagens virulentas. O gênero *Paecilomyces*, o qual engloba espécies patogênicas e sapróbias, também teve seu perfil de VOC's explorado. Segundo Mohammadi et al. (2016) o gênero *Paecilomyces* é capaz de secretar compostos com efeitos inibitórios e citotóxicos a outros micro-organismos.

Apesar destes estudos, não há relatos sobre a interação dos fungos entomopatogênicos frente ao micoparasita *Escovopsis*, fungo este comumente associado as formigas da tribo Attini. Considerando os efeitos deletérios que ambos os organismos causam no ambiente do saueiro, o estudo desta interação pode revelar produtos naturais com potencial ao desenvolvimento de bioinseticidas ou outras aplicações industriais.

CAPÍTULO 1

Potencial dos fungos entomopatogênicos no controle biológico de *Atta sexdens rubropilosa*

Resumo

Os fungos entomopatogênicos são reconhecidos pela sua virulência e capacidade de infectar diversos insetos. No interior da hemocele, estes fungos produzem metabólitos secundários que resultam na morte de seu hospedeiro. Neste trabalho, estruturamos uma coleção de microfungos isolados da cutícula de rainhas jovens de *Atta sexdens rubropilosa* mortas com sinal de infecção por fungos. Após a identificação morfológica e molecular desses fungos, o potencial patogênico dos mesmos foi analisado. As primeiras análises foram realizadas com operárias isoladas de um formigueiro adulto. A partir destas, os fungos mais virulentos foram selecionados e os testes evoluíram até atingir colônias completas de *Atta sexdens rubropilosa* variando a forma de aplicação. Combinações das linhagens mais promissoras de fungos entomopatogênicos foram utilizadas a fim de averiguar um eventual sinergismo patogênico destas. Os resultados demonstraram que rainhas de *Atta sexdens rubropilosa* podem ser infectadas por diversos fungos (sete gêneros distintos no presente estudo), o que pode resultar na redução do número de novos ninhos. Entre esses fungos, os isolados de *Beauveria bassiana* (ENT13), *Isaria farinosa* (ENT02), *Aspergillus nomius* (ENT22) e *Purpureocillium lilacinum* (ENT19) apresentaram maior potencial patogênico. Apesar dos eficientes mecanismos de defesa do saúveiro, estas linhagens interferiram com a rotina de colônias adultas de laboratório causando inclusive a morte de algumas rainhas. Além disso, as linhagens de *Aspergillus nomius* (ENT22) e *Purpureocillium lilacinum* (ENT19) parecem causar danos adicionais ao jardim de fungos, sendo que a linhagem de *Aspergillus* é capaz de desenvolver-se utilizando fragmentos do jardim como substrato. Estas informações enfatizam o potencial desses fungos entomopatogênicos no biocontrole de formigas cortadeiras.

Palavras chave: Fungos filamentosos. Formigas cortadeiras. Patogenicidade. Bioinseticida.

3.1 Introdução

As formigas cortadeiras cultivam o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* sobre material vegetal e devido ao impacto que o forrageamento causa nos ambientes em que elas ocorrem, muitas vezes, elas são consideradas espécies-chave (FOWLER et al., 1989). De acordo com Cherrett (1986) e Fowler et al. (1989), no ecossistema natural desses insetos, a desfolha praticada pode estimular o crescimento das plantas e até mesmo contribuir para a diversidade de espécies vegetais. Ainda, a atividade dessas formigas promove a aeração e a drenagem do solo, facilitando a penetração de raízes e aumentando a quantidade de matéria orgânica no local. No entanto, como também observado por esses autores, em locais modificados pelas atividades antrópicas, principalmente áreas de monocultura, não existem inimigos naturais das formigas cortadeiras, e estas se tornam endêmicas, praticando uma desfolha muito intensa o que as caracteriza como pragas (CHERRETT, 1986; FOWLER et al., 1989).

Atualmente, os métodos mais eficazes de controle dessas formigas envolvem produtos químicos. A aplicação desses produtos pode ser realizada através de pós secos, termonebulização, fumigação ou pelo uso de iscas tóxicas, sendo este o método mais utilizado. Na formulação das iscas tóxicas, a sulfuramida (N-etil perfluooctano sulfonamida) é amplamente empregada. Porém, assim como outros compostos perfluorinados, a sulfuramida possui fortes ligações entre seus componentes (carbono e flúor), tornando-se altamente inerte. Sendo assim, esses pesticidas não são biodegradados sob as condições ambientais e podem contaminar solo, água e bioacumular-se na cadeia alimentar (BOARETTO; FORTI, 1997; OLIVEIRA et al., 2011).

Neste contexto, torna-se necessário buscar métodos de controle mais sustentáveis e menos agressivos ao meio ambiente. O uso de inimigos naturais representa uma estratégia potencial no controle das formigas cortadeiras. Entre os inimigos naturais, destacam-se o uso de fungos patogênicos contra formigas e seu mutualista, isto porque estes micro-organismos possuem alta especificidade, abundância e baixo custo relativo (CHARNLEY, 1997; BOARETTO; FORTI, 1997). Portanto, faz-se necessário ampliar os registros sobre a diversidade de fungos filamentosos encontrados em cadáveres de rainhas de formigas cortadeiras, bem como selecionar linhagens potencialmente patogênicas a fim de obter um agente de biocontrole eficaz.

3.2 Objetivos

- Ampliar os registros de ocorrência de microfungos isolados de rainhas jovens de *Atta sexdens rubropilosa* coletadas logo após o voo de acasalamento.
- Determinar a atividade entomopatogênica dos isolados, visando ao desenvolvimento de métodos alternativos de controle das formigas cortadeiras.
- Estruturar uma coleção desses fungos na Central de Recursos Microbianos da UNESP, Rio Claro/SP, para estudos futuros.

3.3 Material e Métodos

3.3.1 Isolamento, cultivo e preservação dos fungos entomopatogênicos

As rainhas de *Atta sexdens rubropilosa* utilizadas no isolamento foram doadas pelo Laboratório de Formigas Cortadeiras do Centro de Estudos de Insetos Sociais – UNESP, Rio Claro. A coleta das rainhas ocorreu no dia 09 de novembro de 2014 na Floresta Estadual Edmundo Navarro de Andrade, Rio Claro, São Paulo, Brasil (22°24'23,86''S; 47°31'28,69''O) e foi realizada aproximadamente uma hora após o voo nupcial (ou seja, no momento em que as formigas retornaram ao solo e começaram a cavar o túnel). As formigas foram mantidas sem nutrição em laboratório e armazenadas em recipientes de plástico esterilizados por UV (250 mL de volume). Os recipientes tiveram seu fundo previamente preenchidos com gesso visando a manutenção da umidade para proporcionar o crescimento dos fungos.

O isolamento dos fungos foi realizado a partir de 100 içás jovens mortas e com sinal de infecção por fungos. O micélio fúngico ou os esporos presentes na cutícula das rainhas foram semeados em placas contendo o meio *Potato Dextrose Agar* (PDA) adicionado de cloranfenicol (0.01% p/v). As placas foram incubadas a 25°C por um período de 4 a 7 dias, no escuro (DOMSCH et al., 1980), sendo verificadas diariamente. Após a purificação, as linhagens foram armazenadas em tubos de cultura contendo ágar extrato de malte 2% inclinado e mantidas a 10° C. Todas as culturas também foram preservadas em *ultrafreezer* mediante técnica de criopreservação dos conídios em glicerol 10 % a -80° C.

3.3.2 Identificação dos isolados

3.3.2.1 Identificação morfológica e seleção dos isolados

A identificação preliminar dos fungos foi realizada mediante técnicas morfológicas macro e microscópica. Para tanto, os fungos foram semeados em meio PDA e os gêneros determinados utilizando chaves de identificação (DOMSCH et al., 1980; SAMSON et al., 2000).

A seleção dos isolados utilizados nos testes de patogenicidade baseou-se na identificação morfológica e no grau de infestação dos cadáveres das rainhas jovens das quais foram isolados. Buscou-se utilizar ao menos um representante de cada gênero, incluindo isolados aparentemente de espécies distintas.

3.3.2.2 Identificação molecular

Após análise morfológica, as linhagens consideradas distintas foram submetidas às análises moleculares para identificação em nível de espécie. A fim de garantir a pureza, foram utilizadas culturas monospóricas para a extração do DNA genômico. A extração do DNA bruto foi realizada pelo método CTAB (Cetiltrimetil Brometo de Amônio) (Möller et al., 1992). Para as análises filogenéticas, primeiramente foi amplificada a região ITS (Internal Transcribed Spacer) de cada linhagem. Para tanto foram utilizados os primers ITS4 e ITS5 sob as seguintes condições: 94 °C/3min, seguido de 35 ciclos a 94 °C/1min, 55 °C/1min, 72 °C/2min, 10 °C/∞. A purificação dos produtos de amplificação foi realizada com *Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega).

No caso dos isolados em que o marcador ITS foi insuficiente para a identificação, foram amplificadas também as regiões LSU (large subunit RNA) e β – Tubulina. Para a amplificação da região LSU foram empregados os primers LSU1Fd e LR5 sob 96 °C/2min, seguido de 35 ciclos a 96 °C/45s, 52 °C/30s, 72 °C/90s e posteriormente, 72 °C/2min. Já na amplificação da região β – Tubulina foram utilizados os primers Bt2a e Bt2b sob 94 °C/3min seguindo 35 ciclos de 94 °C/1min, 58 °C/90s, 72 °C/2min, 10 °C/∞.

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando *BigDye Terminator v.3.1 Sequencing Kit* (Life Technologies) e os *primers* da reação foram os mesmos empregados na amplificação. A reação foi conduzida sob as seguintes condições: 95 °C/2min seguido de 28 ciclos de 95 °C/45s, 50 °C/30s, 60 °C/4 min, 10 °C/∞. Em todas as reações de amplificação e sequenciamento foram adicionados 5% de DMSO. As sequências foram geradas no sequenciador automático 3130 Genetic Analyser – model 627-0040 e foram manualmente editadas e alinhadas através do programa BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.5.3 (HALL, 1999). Após alinhamento, os contigs foram comparados com sequências homólogas depositadas no banco de dados do Centraalbureau voor Schimmelcultures - Fungal Biodiversity Centre (Utrecht, The Netherlands) e National Center for Biotechnology Information (NCBI) - GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando BLASTn (ALTSCHUL et al., 1997).

3.3.3 Viabilidade dos conídios

A fim de determinar a quantidade de conídios viáveis, ou seja, com potencial para infectar as operárias, foi realizado um teste de viabilidade dos conídios dos 14 fungos selecionados no item 3.2.2.1. Para tanto, as linhagens foram cultivadas a 25 °C em meio *Potato Dextrose Agar* (PDA) por 14 dias. Após este período, os conídios foram suspensos em Tween 80 0,05% (utilizado no inóculo dos testes de patogenicidade) e, utilizando placas de Elisa, foram preparadas diluições de 10³, 10⁴, 10⁵ e 10⁶ conídios.mL⁻¹. As porcentagens de viabilidade de cada linhagem foram calculadas a partir da contagem em câmara de Neubauer dos conídios apresentando tubo germinativo após 24 e 48 horas.

3.3.4 Teste “*in vitro*” da patogenicidade de fungos entomopatogênicos em operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

Foram utilizadas operárias de *Atta sexdens rubropilosa*, com massa corpórea variando de 15 a 25 mg coletadas de um formigueiro adulto (18 anos) mantido no Laboratório de Formigas Cortadeiras do Centro de Estudos de Insetos Sociais – UNESP, Rio Claro. Foram utilizadas 50 operárias para cada fungo testado, divididas em grupos de 10 formigas e mantidas em cinco placas de Petri de 10 cm de diâmetro forradas com papel filtro. A manutenção das formigas isoladas do formigueiro foi realizada utilizando a dieta artificial sólida proposta por Bueno et al. (1997).

Foi averiguado o potencial patogênico de 14 fungos selecionados como descrito no item 3.2.2.1. Para a obtenção dos conídios foram utilizadas culturas com 14 dias de crescimento, cultivadas a 25 °C em meio *Potato Dextrose Agar* (PDA). Após raspagem da colônia e suspensão em Tween 80 0,05%, os tubos foram agitados em vortex para a separação dos conídios. A quantificação dos conídios foi realizada em câmara de Neubauer padronizando-se a concentração de 10⁸ conídios/mL como proposto por Hughes et al. (2004).

As formigas foram imersas, individualmente, em 1,0 mL de suspensão conidial por aproximadamente 10 segundos. Além disso, foram estabelecidos dois controles (i) controle negativo: formigas imersas em solução de 0,05% de Tween 80; (ii) controle positivo: formigas imersas em suspensão de Ballveria® (bioinseticida de *Beauveria bassiana* comercializado pela empresa Ballagro). O experimento foi mantido a temperatura de 25° C e umidade relativa acima de 70%. O período experimental foi de 25 dias, levando-se em conta o

período de sobrevivência das formigas mantidas com dieta artificial. Ainda, a fim de evitar contaminações, a dieta artificial foi trocada a cada 48 horas (BUENO et. al, 1997).

Os bioensaios foram examinados diariamente para a retirada e anotação do número de formigas mortas. Ainda, a mortalidade ocasionada pelos fungos entomopatogênicos foi confirmada pela extrusão dos mesmos nos cadáveres após desinfecção. Para tanto, as operárias mortas foram desinfetadas de acordo com o protocolo proposto por Araújo et al. (2002) e mantidas em câmara úmida (placa de Petri contendo algodão umedecido) a 25 °C, no escuro.

A análise gráfica foi realizada através da determinação das porcentagens acumuladas de sobrevivência *versus* tempo. Posteriormente, o tempo de sobrevivência mediano foi determinado e as curvas de sobrevivência de operárias tratadas com o primeiro controle e com o segundo controle foram comparadas através do teste não paramétrico “log-rank” ao nível de significância de 95% (ELANDT - JOHNSON et al., 1980), utilizando o *software* Graph-Pad Prism v 3.0.

3.3.5 Teste de patogenicidade em subcolônias de *Atta sexdens rubropilosa*

As subcolônias foram estruturadas em conjuntos de três recipientes plásticos de 80 mL interligados por tubos plásticos de 0,5 cm de diâmetro. Todas as réplicas foram compostas por fragmentos de jardim e operárias de todas as castas de *Atta sexdens rubropilosa* coletadas de uma colônia de 18 anos de idade mantida no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS). A câmara central destinou-se ao jardim de fungos e os demais recipientes ao forrageamento e ao descarte do material de refugio. Além disso, uma camada de gesso foi adicionada a câmara central a fim de garantir a umidade adequada. A quantidade de jardim de fungos foi padronizada para 70 mL, aproximadamente.

As subcolônias foram mantidas a 25° C por cinco dias antes da inoculação dos fungos (período de aclimatação). Para cada fungo a ser testado foram utilizadas quatro subcolônias e a manutenção do saueiro foi realizada pela adição diária de folhas de *Eucalyptus* sp. na câmara de forrageio.

Foi averiguada a patogenicidade de oito fungos entomopatogênicos previamente selecionados nos testes “*in vitro*” (item 3.3.4). A suspensão dos conídios foi preparada conforme descrito no segundo parágrafo do item 3.3.4. Em cada subcolônia foi gotejado 1,0 mL da suspensão de 10⁸ conídios/mL sobre o jardim de fungos. Além disso, foram estruturados dois grupos controle. No controle positivo foram inoculados 10⁸ conídios/mL de

Ballveria® (bioinseticida de *Beauveria bassiana* comercializado pela empresa Ballagro) e no controle negativo foi inoculado apenas Tween 80 na concentração de 0,05%.

O experimento teve duração de 21 dias e diariamente foram adicionadas folhas de *Eucalyptus* sp. na câmara de forrageio. A quantificação (%) das alterações no corte e incorporação de folhas no jardim de fungos, a mortalidade de operárias, as condições gerais da subcolônia, bem como a produção de material de refugio foi avaliada seguindo a metodologia descrita por Barcotto (2015, p. 43).

3.3.6 Teste de patogenicidade em subcolônias de *Atta sexdens rubropilosa* utilizando combinações de fungos

Para averiguar uma possível potencialização da patogenicidade em subcolônias de *Atta sexdens rubropilosa*, quatro isolados previamente selecionados no item 3.3.5 foram inoculados em combinações de dois a dois e também os quatro, concomitantemente. O procedimento de estruturação das subcolônias, aclimação, manutenção, o preparo dos inóculos e a avaliação dos resultados foram realizados conforme descrito no item 3.3.5. Para os ensaios, tanto os fragmentos de jardim como as operárias de *Atta sexdens rubropilosa* foram coletados de diferentes colônias adultas (2 a 3 anos de idade) cedidas pelo Laboratório de Formigas Cortadeiras do Centro de Estudos de Insetos Sociais – UNESP, Rio Claro. Foram utilizados 0,5 mL da suspensão de 10^8 conídios/mL de cada fungo, no caso das combinações contendo dois isolados e 0,25 mL da suspensão de 10^8 conídios/mL de cada fungo na combinação contendo os quatro isolados, ambos totalizando 1,0 mL de inóculo. Apenas o controle negativo (Tween 80 0,05%) foi utilizado neste experimento

3.3.7 Teste de patogenicidade em colônias de *Atta sexdens rubropilosa* utilizando combinações de fungos

Foram utilizadas colônias de *Atta sexdens rubropilosa* com nove meses de idade contendo aproximadamente 800 mL de jardim de fungos, mantidas no Laboratório de Formigas Cortadeiras do Centro de Estudos de Insetos Sociais – UNESP, Rio Claro.

A patogenicidade de três combinações de fungos entomopatogênicos foi averiguada, sendo estas: i) ENT 02 + ENT 13 + ENT 19 + ENT 22; ii) ENT 13 + ENT 02; iii) ENT 13 + ENT 22, ambas selecionadas no item 3.3.6. A obtenção dos conídios foi realizada conforme descrito no item 3.3.4, no entanto, a concentração de conídios foi padronizada para 10^9

conídios/mL, uma vez que as colônias possuem volume fúngico aproximadamente 10 vezes maior.

Em cada colônia foi gotejado 2,0 mL da suspensão de 10^9 conídios/mL, sendo utilizados 1,0 mL da suspensão de 10^9 conídios/mL de cada fungo, no caso das combinações contendo dois isolados e 0,5 mL da suspensão de 10^9 conídios/mL de cada fungo na combinação contendo os quatro isolados. Além disso, como controle negativo, foram utilizadas colônias contendo apenas Tween 80 na concentração de 0,05%.

As colônias foram mantidas a 25° C e diariamente foram adicionadas na câmara de forrageio folhas de *Eucalyptus* sp., *Mangifera* sp. ou flocos de aveia (*Avena sativa*). O experimento foi realizado em triplicata e teve duração de 21 dias. A quantificação (%) das alterações no corte de folhas, mortalidade de operárias, condições gerais da subcolônia, bem como a produção de material de refugio foi avaliada seguindo a metodologia descrita por Barcotto (2015, p. 43).

3.3.8 Avaliação de métodos de inoculação dos conídios: patogenicidade em colônias de *Atta sexdens rubropilosa* através do polvilhamento

Foram utilizadas colônias de *Atta sexdens rubropilosa* com nove meses de idade contendo aproximadamente 800 mL de jardim de fungos, mantidas no Laboratório de Formigas Cortadeiras do Centro de Estudos de Insetos Sociais – UNESP, Rio Claro.

A patogenicidade de duas combinações de fungos entomopatogênicos (ENT 13 + ENT 02 e ENT 13 + ENT 22), selecionados no item 3.3.7 foi averiguada. A obtenção dos conídios foi realizada conforme descrito no item 3.3.4. Após a homogeneização da suspensão em vortéx, esta foi transferida para placas de petri 60x15 estéreis e mantidas em estufa a 30° C para secagem. Após a obtenção dos conídios secos, padronizou-se o peso de conídios necessário a concentração de 10^9 conídios. A esta concentração foram adicionados 0,5 g de maltodextrina e 0,5 g de amido de milho. Neste caso, o controle negativo foi composto pela mistura entre a maltodextrina e o amido de milho. A fim de verificar se a temperatura utilizada para secagem interferiu na viabilidade dos conídios, uma alíquota contendo 10^3 conídios/mL foi plaqueada em placas contendo meio PDA, seguindo-se incubação por 48h a 25 °C.

A dispersão do pó composto pela mistura de conídios, açúcar e amido, foi realizada utilizando placas de Petri com as tampas contendo vários pequenos furos. O material foi distribuído sobre o jardim de fungos.

3.3.9 Avaliação de métodos de inoculação dos conídios: patogenicidade em colônias *Atta sexdens rubropilosa* através da nebulização

Assim como no item 3.3.8, foram utilizadas colônias de *Atta sexdens rubropilosa* com nove meses de idade contendo aproximadamente 800 mL de jardim de fungos, mantidas no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS). Ainda foram utilizadas as mesmas combinações fúngicas (ENT 13 + ENT 02 e ENT 13 + ENT 22), a fim de avaliar qual método de dispersão se adéqua melhor ao controle biológico das formigas cortadeiras a partir de fungos entomopatogênicos. A obtenção dos conídios foi realizada conforme descrito no item 3.3.4 e a concentração utilizada foi de 10^9 conídios/mL.

A dispersão dos conídios foi conduzida com o auxílio de um compressor de ar. Em cada réplica foram nebulizados 5,0 mL de suspensão de conídios na câmara de jardim de fungos. No controle negativo foram utilizados 5,0 mL de Tween 80 na concentração de 0,05%.

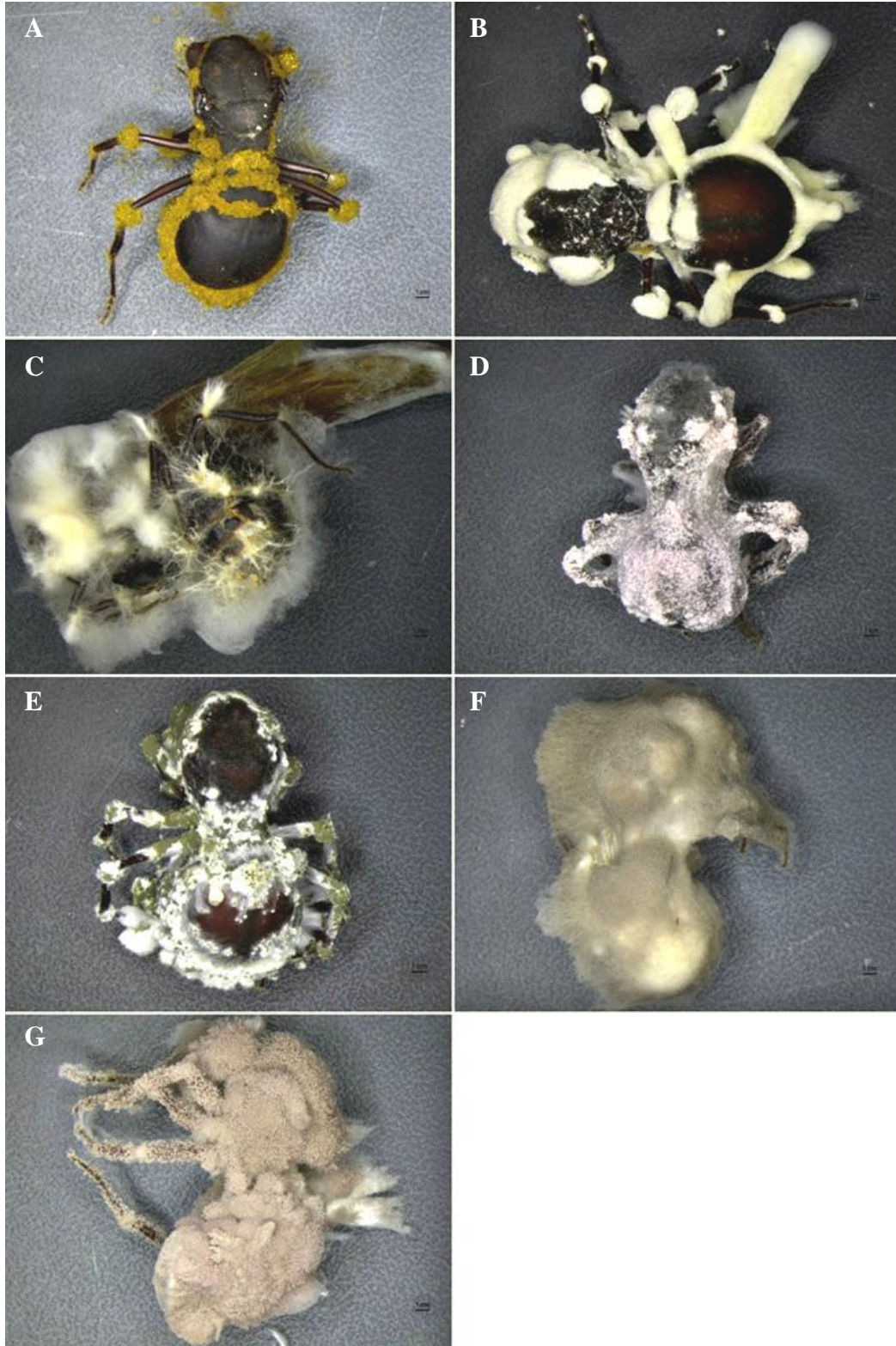
3.4 Resultados

3.4.1 Isolamento e identificação morfológica e molecular

Do total de 100 cadáveres de rainhas de *Atta sexdens rubropilosa* visivelmente contaminadas, apenas três rainhas apresentavam dois fungos entomopatogênicos distintos em sua cutícula, sendo que as demais resultaram em apenas um isolado cada. Além disso, em alguns casos (15 rainhas), não houve crescimento fúngico após transferência para o meio de cultura. Desta maneira, foi constituída uma coleção composta por 88 fungos, os quais receberam a codificação de ENT01 a ENT88.

Após identificação morfológica preliminar, os 88 fungos foram agrupados em sete gêneros: *Aspergillus*, *Beauveria*, *Fusarium*, *Isaria*, *Metarhizium*, *Mucor* e *Purpureocillium* (Figura 1). Dentre estes, o gênero de maior representatividade foi o gênero *Fusarium* com 43 isolados, seguido pelo gênero *Aspergillus* com 23 fungos. Já os demais gêneros, representaram juntos, apenas 25% dos isolados, sendo nove de *Purpureocillium*, oito de *Mucor*, três de *Beauveria*, três de *Metarhizium* e apenas um de *Isaria*.

Figura 1 - Fungos filamentosos encontrados em cadáveres de rainhas jovens de *Atta sexdens rubropilosa*. (A) *Aspergillus*; (B) *Beauveria*; (C) *Fusarium*; (D) *Isaria*; (E) *Metarhizium*; (F) *Mucor*; (G) *Purpureocillium*



Fonte: Dados da pesquisa

Foram selecionados 14 isolados para a identificação molecular e para os experimentos de patogenicidade, sendo este grupo composto por um representante de cada gênero e também por fungos agrupados no mesmo gênero, mas com alguma diferença morfológica, indicando, a princípio, serem espécies distintas. Após a identificação molecular, foi verificado que os fungos ENT19, ENT29(2) e ENT36 pertenciam a mesma espécie, *Purpureocillium lilacinum*. O mesmo ocorreu com os isolados ENT22, ENT62 e ENT74(2), os quais apesar de algumas diferenças morfológicas em suas colônias pertenciam a espécie *Aspergillus nomius*. A identificação molecular de cada um dos 14 isolados bem como as informações obtidas através da ferramenta Blast encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Identificação molecular das linhagens distintas de fungos filamentosos isolados de cadáveres de rainhas de *Atta sexdens rubropilosa*

Código	Espécie	Marcador molecular	Genbank		Código de acesso
			pb ¹	%	
ENT01	<i>Aspergillus flavus</i>	LSU	613	99%	JF951750.1
ENT 02	<i>Isaria farinosa</i>	LSU	752	99%	JF415979.1
ENT12	<i>Fusarium</i> sp.	ITS	510	99%	FJ210582.1
ENT13	<i>Beauveria bassiana</i>	ITS	583	100%	KF937310.1
ENT19	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	LSU	791	99%	KJ443114.1
ENT22	<i>Aspergillus nomius</i>	β – Tubulina	538	99%	KJ634095.1
ENT25	<i>Metarhizium anisopliae</i>	ITS	437	99%	KP213288.1
ENT29(2)	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	LSU	822	99%	EF468844.1
ENT36	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	LSU	777	100%	KJ443114.1
ENT39	<i>Aspergillus calidoustus</i>	β – Tubulina	419	99%	HG931682.1
ENT58	<i>Mucor circinelloides</i>	ITS	407	100%	KX349462.1
ENT62	<i>Aspergillus nomius</i>	LSU	614	99%	KC253960.1
ENT74(2)	<i>Aspergillus nomius</i>	LSU	599	99%	KC253960.1
ENT82	<i>Aspergillus insuetus</i>	LSU	583	99%	FJ878628.1

Fonte: Dados da pesquisa

O teste de viabilidade dos conídios revelou que a taxa de germinação em Tween 80 0,05% é maior nas espécies de *Beauveria bassiana*, *Purpureocillium lilacinum* e *Fusarium* sp., os quais apresentaram, respectivamente, 92%, 89% e 81%. Já entre as linhagens pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Isaria* os valores variaram entre 70 a 78%. A menor

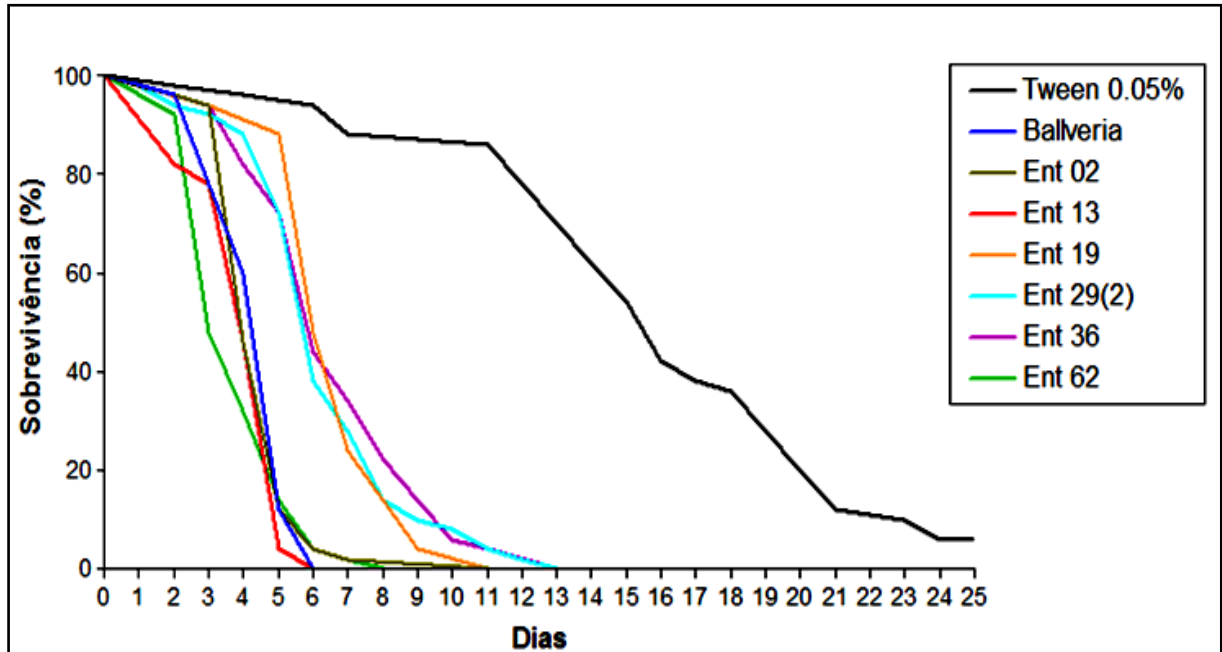
taxa de germinação foi verificada no gênero *Mucor*, sendo que neste a viabilidade observada foi de 67%.

3.4.2 Teste “*in vitro*” da patogenicidade de fungos entomopatogênicos em operárias de *Atta sexdens rubropilosa*

O potencial patogênico de alguns dos 14 fungos foi revelado nas primeiras 48 horas após a imersão das operárias na suspensão de conídios. Neste período, o controle positivo (grupo tratado com Ballveria®) causou a morte de 4% (2/50) das operárias. Já os isolados de *A. nomius* (ENT22 e ENT62) e *M. anisopliae* (ENT25) foram responsáveis pela morte de 8% (4/50) e o de *B. bassiana* (ENT13) por 18% (9/50).

A sobrevivência das operárias apresentou redução de 50% a partir do terceiro dia no tratamento com o *A. nomius* (ENT22) e no quarto dia nos tratamentos com *I. farinosa* (ENT02) e *B. bassiana* (ENT13). O mesmo resultado foi observado entre o quarto e o quinto dia para o controle positivo e no sexto dia para os isolados da espécie *P. lilacinum* (ENT19, ENT29(2) e ENT36). Além disso, no sexto dia, os tratamentos com o controle positivo e com *B. bassiana* (ENT13) causaram a mortalidade das 50 operárias utilizadas no experimento. Nos isolados de *I. farinosa* (ENT02), *P. lilacinum* (ENT19, ENT29 (2) e ENT36) e *A. nomius* (ENT62) a mortalidade total foi obtida entre o oitavo e o décimo terceiro dia. Em todos esses tratamentos a mortalidade foi confirmada pela extrusão do fungo entomopatogênico após lavagem dos cadáveres. A porcentagem de sobrevivência das operárias nesses tratamentos e nos controles em relação ao tempo experimental esta apresentada na Figura 2.

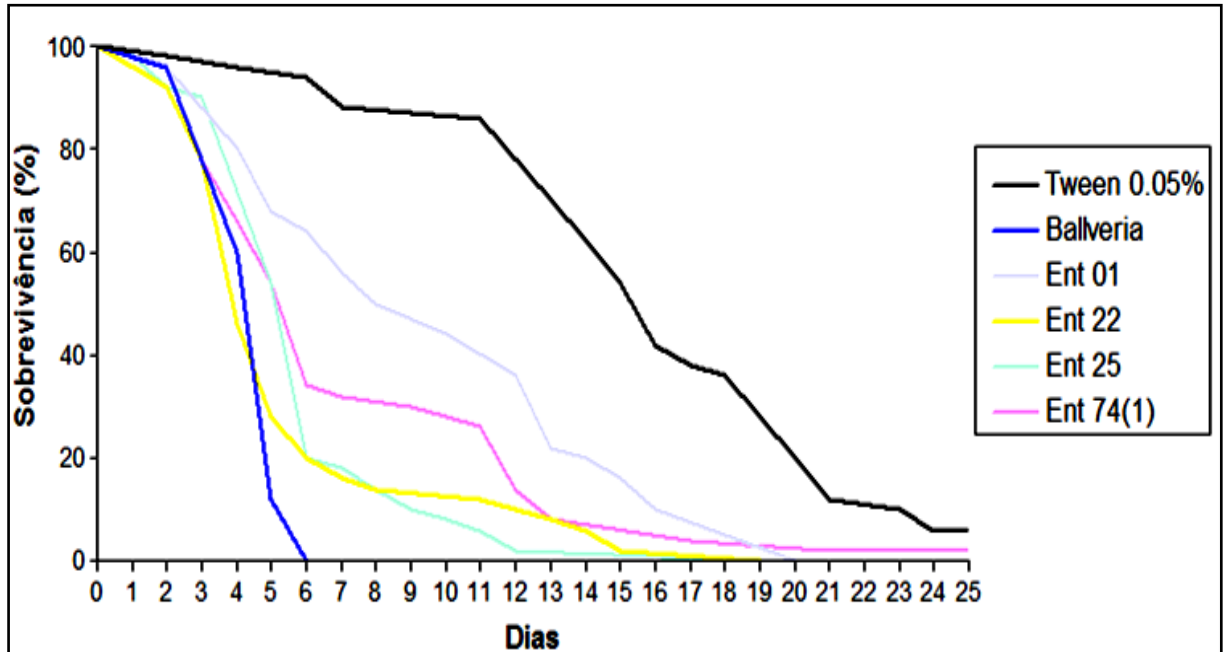
Figura 2 – Sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* após tratamento com isolados de *A. nomius* (ENT62), *B. bassiana* (ENT13) *I. farinosa* (ENT02) e *P. lilacinum* (ENT19, ENT29(2) e ENT36) em função do tempo experimental.



Fonte: Dados da pesquisa

Os tratamentos com *A. flavus* (ENT01), *A. nomius* (ENT22 E ENT74(1)) e *M. anisopliae* (ENT25) diminuíram a sobrevivência das operárias em 50% entre o quarto e o oitavo dia. Apesar de este período assemelhar-se ao apresentado pelo controle positivo, esses isolados foram considerados de virulência mediana devido ao maior tempo requerido (mais de 15 dias) para causar a morte total das operárias. A ação letal desses fungos também foi confirmada pela extrusão dos entomopatógenos nos cadáveres. A Figura 3 apresenta a porcentagem de sobrevivência das operárias nesses tratamentos e nos controles em relação ao tempo experimental.

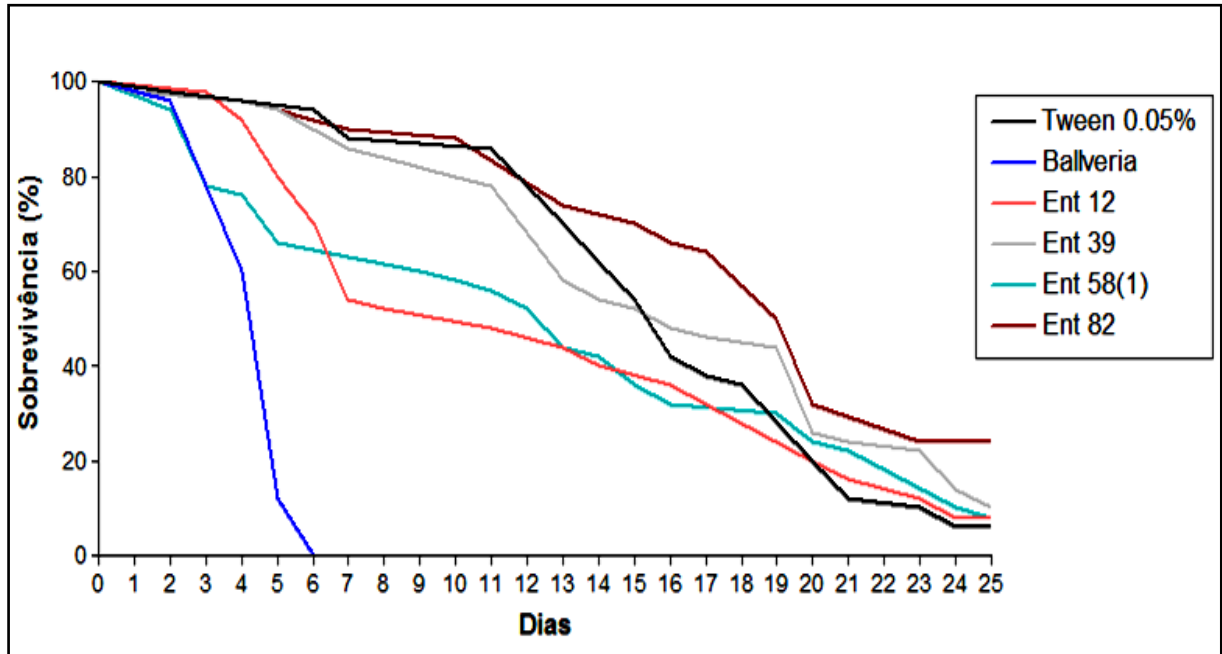
Figura 3 – Sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* após tratamento com isolados de *A. flavus* (ENT01), *A. nomius* (ENT22 E ENT74(1)) e *M. anisopliae* (ENT25) em função do tempo experimental.



Fonte: Dados da pesquisa

Os demais isolados, *Fusarium* sp. (ENT12), *A. calidoustus* (ENT39), *M. circinelloides* (ENT58(1)) e *A. insuetus* (ENT82) não causaram redução relevante na sobrevivência das operárias. Na Figura 4 é possível verificar que as porcentagens de sobrevivência obtidas para esses isolados assemelham-se às taxas observadas no controle negativo (grupo tratado com Tween 80 0,05%). Além disso, após desinfecção dos cadáveres e incubação, não houve crescimento do fungo inoculado.

Figura 4 – Sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* após tratamento com isolados de *Fusarium* sp. (ENT12), *A. calidoustus* (ENT39), *M. circinelloides* (ENT58(1)) e *A. insuetus* (ENT82) em função do tempo experimental.



Fonte: Dados da pesquisa

Dos 14 fungos avaliados quanto à patogenicidade em operárias de *Atta sexdens rubropilosa*, oito linhagens (*A. nomius* (ENT62 e ENT22), *B. bassiana* (ENT13) *I. farinosa* (ENT02), *P. lilacinum* (ENT19, ENT29(2) e ENT36) e *M. anisopliae* (ENT25)) foram selecionadas para os ensaios utilizando subcolônias.

3.4.3 Teste de patogenicidade em subcolônias de *Atta sexdens rubropilosa*

Todos os fungos entomopatogênicos causaram perturbações nas subcolônias, embora, em níveis diferentes. As alterações causadas em cada tratamento são descritas a seguir.

3.4.3.1 Controle negativo (*Tween 80 0,05%*)

Não foi observada nenhuma alteração nas condições gerais do saueiro, sendo considerada normal a quantidade de lixo produzida, bem como a mortalidade de operárias e as atividades de corte e manutenção do jardim de fungos.

3.4.3.2 Controle positivo (*Ballveria*®)

A aplicação de *Ballveria*® em subcolônias de *Atta sexdens rubropilosa* causou algumas alterações nas subcolônias. Entre o primeiro e o 12° dia não houve atividades de corte e incorporação de folhas; ainda, em algumas réplicas, observou-se redução de volume do jardim de fungos. Além disso, a mortalidade observada foi um pouco acima do normal, com aproximadamente 25% das operárias mortas no quinto dia, mas após este período ocorreu estabilização. Após o décimo segundo dia, as operárias retomaram as atividades e o jardim se manteve sem alterações.

3.4.3.3 *Isaria farinosa* (ENT02)

Após a inoculação da linhagem de *I. farinosa* não houve corte e incorporação de folhas no jardim de fungos ao longo dos 21 dias experimentais. Desta maneira, o jardim de fungos apresentou diminuição a partir do quarto dia. No décimo dia de tratamento a mortalidade atingiu nível 2,0 segundo avaliação proposta em Barcotto (2015, p. 43), ou seja, aproximadamente 50% das operárias estavam mortas. Além disso, neste período, duas réplicas apresentaram contaminação no jardim de fungos, sendo que esta não foi controlada pelas operárias. Ao final do experimento, as condições gerais do saueiro decaíram em 50%.

3.4.3.4. *Beauveria bassiana* (ENT13)

As condições gerais do saueiro, em todas as réplicas, decaíram em aproximadamente 50% após quatro dias, sendo que neste período, a mortalidade das operárias também atingiu 50% e contaminações com outros fungos surgiram no recipiente de refugo ou no descarte acumulado na câmara destinada ao jardim. Não houve corte e incorporação de folhas entre o primeiro e o 12° dia experimental e após este período, apenas 25% do substrato vegetal oferecido foi utilizado. No entanto, mesmo com a retomada da incorporação de folhas no jardim, este não conseguiu recuperar-se e continuou reduzido e com aspecto envelhecido.

3.4.3.5 *Purpureocillium lilacinum* (ENT19)

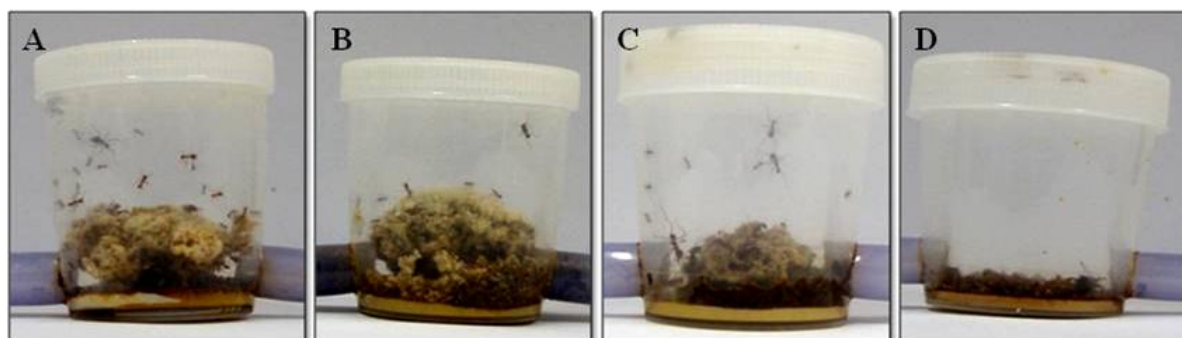
Todas as réplicas tiveram as atividades de corte e incorporação de folhas suspensas a partir do primeiro dia experimental e desta maneira, no quinto dia, o jardim de fungos já

apresentava redução. Entre o segundo e o oitavo dia as condições gerais do formigueiro decaíram em todas as réplicas, sendo que no oitavo dia, uma réplica apresentava 25% de alteração nas condições gerais da subcolônia e as outras três réplicas 50%. Além disso, ao final dos 21 dias o jardim de fungos não se recuperou e todas as réplicas apresentavam contaminação por outros fungos.

3.4.3.6 *Aspergillus nomius* (ENT22)

No primeiro dia após inoculação do *A. nomius* (ENT22) já foi possível observar um elevado acúmulo de lixo quando comparado ao controle negativo. Além disso, entre o primeiro e 14º dia não houve corte de folhas, sendo que, após este período, muitas vezes as folhas eram cortadas, mas não eram incorporadas no jardim de fungos. As condições gerais do saueiro começaram a decair no segundo dia e em uma das réplicas o decaimento atingiu 75% no oitavo dia, enquanto as outras apresentavam 50%. No 15º dia uma das réplicas estava completamente morta e as outras com elevada alteração (Figura 5).

Figura 5 – Condições gerais do saueiro após 15 dias de inoculação do *A. nomius* (ENT22). (A), (B) e (C) Apresentaram 75% de decaimento; (D) Morte total do saueiro.



Fonte: Dados da pesquisa

3.4.3.7 *Metharhizium anisopliae* (ENT25), *Purpureocillium lilacinum* (ENT29(2) e ENT36) *Aspergillus nomius* (ENT62)

Os tratamentos com ENT25, ENT29(2), ENT36 e ENT62 causaram alterações pouco relevantes nas subcolônias. Entre o primeiro e o 14º dia, o corte e a incorporação de folhas no jardim foram suspensos e neste período o jardim de fungos de algumas réplicas sofreu diminuição de até 25% do volume original. No entanto, após este período as atividades foram

retomadas e o fungo mutualista começou a se recuperar. Além disso, a mortalidade das formigas não atingiu 50% em todas as réplicas. Algumas subcolônias inoculadas com as linhagens de *P. lilacinum* apresentaram contaminações com outros fungos, mas de maneira geral, assim como nos tratamentos com ENT25 e ENT62, as condições gerais do saueiro sofreram poucas alterações.

Desta maneira, apenas os isolados de *Isaria farinosa* (ENT02), *Beauveria bassiana* (ENT13), *Purpureocillium lilacinum* (ENT19) e *Aspergillus nomius* (ENT22) foram selecionados para prosseguir nos estudos. A fim de potencializar a ação patogênica, os ensaios avançaram utilizando combinações desses fungos filamentosos.

3.4.4 Teste de patogenicidade em subcolônias de *Atta sexdens rubropilosa* utilizando combinações de fungos

Algumas combinações de fungos não foram capazes de causar perturbações relevantes na estrutura e manutenção das subcolônias, enquanto outras levaram à morte total do saueiro. A seguir, estão descritas as principais alterações observadas.

3.4.4.1 *Isaria farinosa* (ENT02) + *Aspergillus nomius* (ENT22)

Imediatamente após a inoculação das linhagens de *I. farinosa* e *A. nomius*, as formas jovens do saueiro foram removidas do jardim pelas operárias e levadas para as câmaras de forrageamento e de refugio. Estas não foram recolocadas na câmara de jardim e, no decorrer dos dias, o material de refugio foi sendo depositado sobre elas. O corte e a incorporação de folhas foram interrompidos após três dias da inoculação e as condições gerais do saueiro sofreram redução de aproximadamente 25% a partir do quinto dia. No entanto, não houve diminuição drástica do jardim de fungos e a mortalidade das formigas não atingiu 50%.

3.4.4.2 *Purpureocillium lilacinum* (ENT19) + *Isaria farinosa* (ENT02)

Purpureocillium lilacinum (ENT19) + *Aspergillus nomius* (ENT22)

A combinação de *P. lilacinum* com *Isaria farinosa*, assim como a combinação de *P. lilacinum* com *A. nomius* não resultou em alterações superiores a 25% nas condições gerais da subcolônia. Em ambos, o corte de folhas sofreu redução nos primeiros 10 dias experimentais, contudo, após este período, a incorporação de folhas no jardim de fungos foi retomada. A

mortalidade atingiu aproximadamente 50% apenas em duas réplicas de cada combinação, enquanto que nas demais réplicas, a mortalidade não superou a porcentagem de 25%.

3.4.4.3 *Beauveria bassiana* (ENT13) + *Isaria farinosa* (ENT02)

Beauveria bassiana (ENT13) + *Purpureocillium lilacinum* (ENT19)

Beauveria bassiana (ENT13) + *Aspergillus nomius* (ENT22)

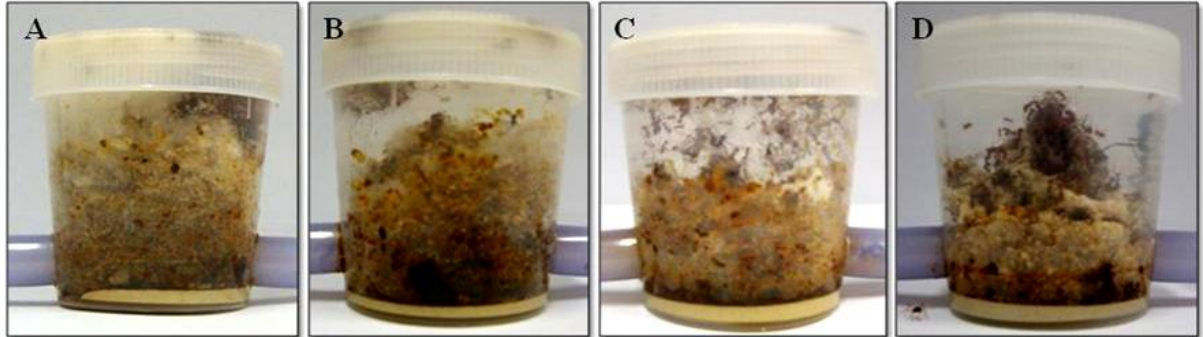
Isaria farinosa (ENT02) + *Beauveria bassiana* (ENT13) + *Purpureocillium lilacinum* (ENT19) + *Aspergillus nomius* (ENT22)

Todos esses tratamentos foram capazes de causar a morte de aproximadamente 50% das operárias entre o terceiro e quinto dia experimental. Além disso, entre o quinto e o sexto dia foi observado a presença de contaminante. Em um total de 16 subcolônias utilizadas, 10 apresentaram crescimento de um fungo branco. O contaminante foi observado nas quatro réplicas da combinação de *B. bassiana* com *A. nomius* e também nas quatro subcolônias inoculadas com os quatro fungos entomopatogênicos. As combinações entre *B. bassiana* e *I. farinosa* e entre *B. bassiana* e *P. lilacinum* exibiram contaminação em apenas uma réplica.

No sexto dia experimental todas as réplicas da combinação entre *B. bassiana* e *A. nomius* estavam completamente mortas (Figura 6). Ainda, no oitavo dia foi observada a morte de duas réplicas inoculadas com a combinação dos quatro fungos, e as demais réplicas morreram no 14º dia (Figura 7). Nas combinações de *B. bassiana* com *I. farinosa* e de *B. bassiana* com *P. lilacinum*, obteve-se a morte completa das réplicas contaminadas no décimo dia de observação.

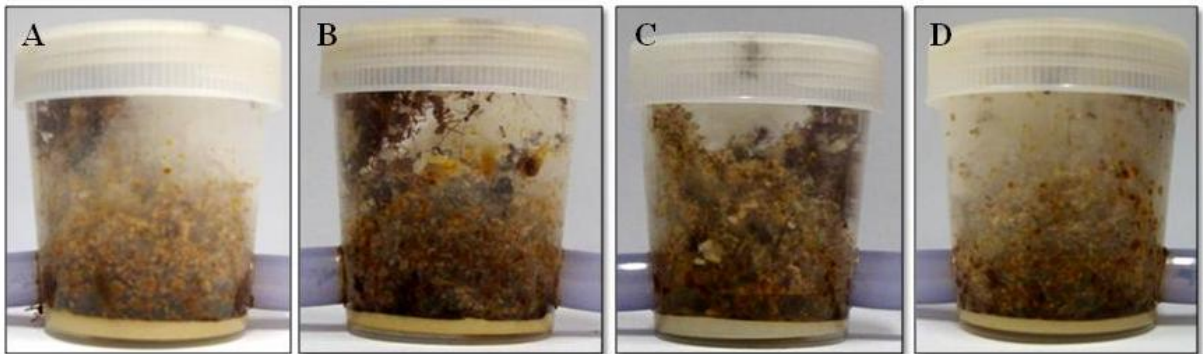
As demais réplicas da combinação de *B. bassiana* com *P. lilacinum* apresentaram alteração média das condições gerais do saueiro (aproximadamente 50%) e uma das réplicas apresentou crescimento de contaminantes sobre o jardim de fungos. No entanto, o tratamento não resultou na morte total das subcolônias (Figura 8). Já a combinação entre *B. bassiana* e *I. farinosa* resultou em uma mortalidade de aproximadamente 50% das operárias após cinco dias da inoculação, ainda, ao final dos 21 dias experimentais, duas das três réplicas restantes apresentavam 75% de mortalidade e uma 100% (Figura 8).

Figura 6 – Condições gerais do saueiro após seis dias de inoculação da combinação entre *B.bassiana* (ENT13) e *A. nomius* (ENT22). Todas as réplicas contaminadas por um fungo branco



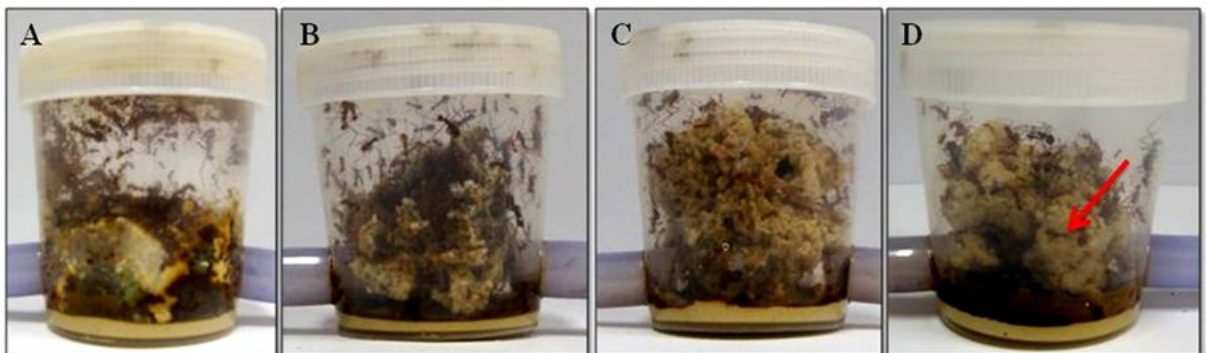
Fonte: Dados da pesquisa

Figura 7 – Condições gerais do saueiro após 14 dias de inoculação da combinação dos quatro fungos. Todas as réplicas contaminadas por um fungo branco.



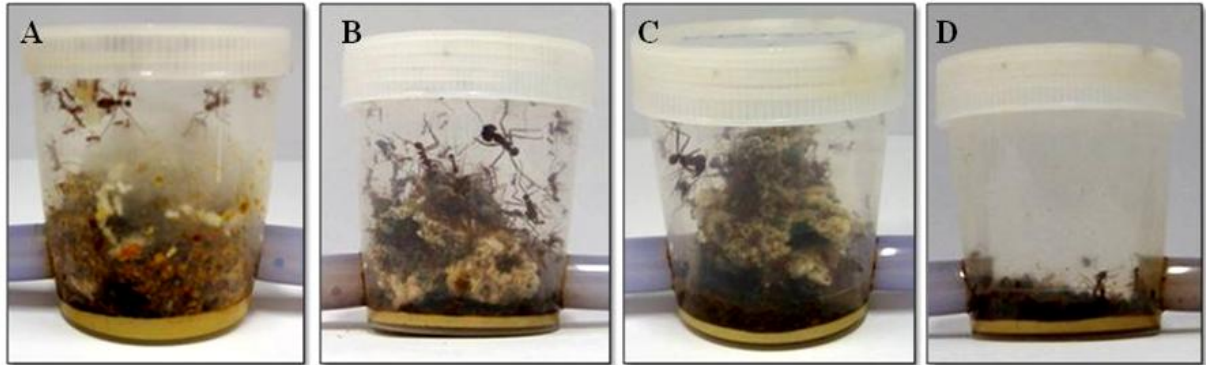
Fonte: Dados da pesquisa

Figura 8 - Condições gerais do saueiro após 21 dias de inoculação da combinação entre *B. bassiana* (ENT13) e *P. lilacinum* (ENT19). (A) Réplica contaminada com fungo branco; (B), (C) e (D) Réplicas com 50 % de decaimento. Seta em (C) indica presença de contaminantes



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 9 - Condições gerais do saueiro após 21 dias de inoculação da combinação entre *B. bassiana* (ENT13) e *I. farinosa* (ENT02). (A) Réplica contaminada com fungo branco; (B) e (C) Réplicas com 75% de decaimento (D) Réplica completamente morta.



Fonte: Dados da pesquisa

Sendo assim, os tratamentos apresentados no item 3.4.4.3 foram selecionados para ensaios utilizando colônias completas de *Atta sexdens rubropilosa*, com exceção da combinação de *B. bassiana* com *P. lilacinum*, a qual causou a morte apenas na réplica que desenvolveu contaminação com o fungo branco. Além disso, todas as subcolônias contaminadas tiveram o fungo branco isolado segundo a metodologia descrita no item 3.3.1. A identificação molecular do contaminante foi realizada pelo Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos da UNESP/Rio Claro, utilizando o marcador molecular TEF. A sequência utilizada para a busca no NCBI através da ferramenta BLAST tinha 814 pb e apresentou 99% de similaridade com a espécie *Escovopsis* sp., cujo código de acesso é AAO06293.

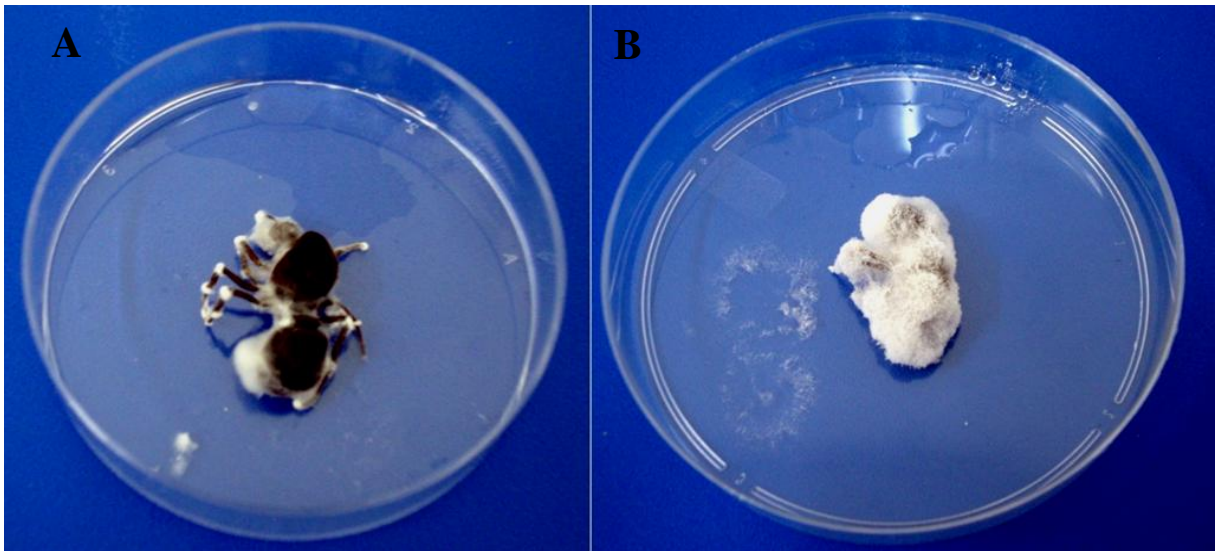
3.3.5 Teste de patogenicidade em colônias de *Atta sexdens rubropilosa* utilizando combinações de fungos

3.4.5.1 *Beauveria bassiana* (ENT13) + *Isaria farinosa* (ENT02)

O corte e incorporação do material vegetal foram reduzidos em 50% entre o quinto e o décimo dia. Além disso, neste período foi observada uma intensa produção de lixo com fragmentos do jardim sendo retirados constantemente (*weeding*). Desta maneira, o fungo mutualista sofreu redução de aproximadamente 50%; no entanto, a partir do décimo dia, as formigas retomaram o corte de folhas e o jardim apresentou um pequeno crescimento.

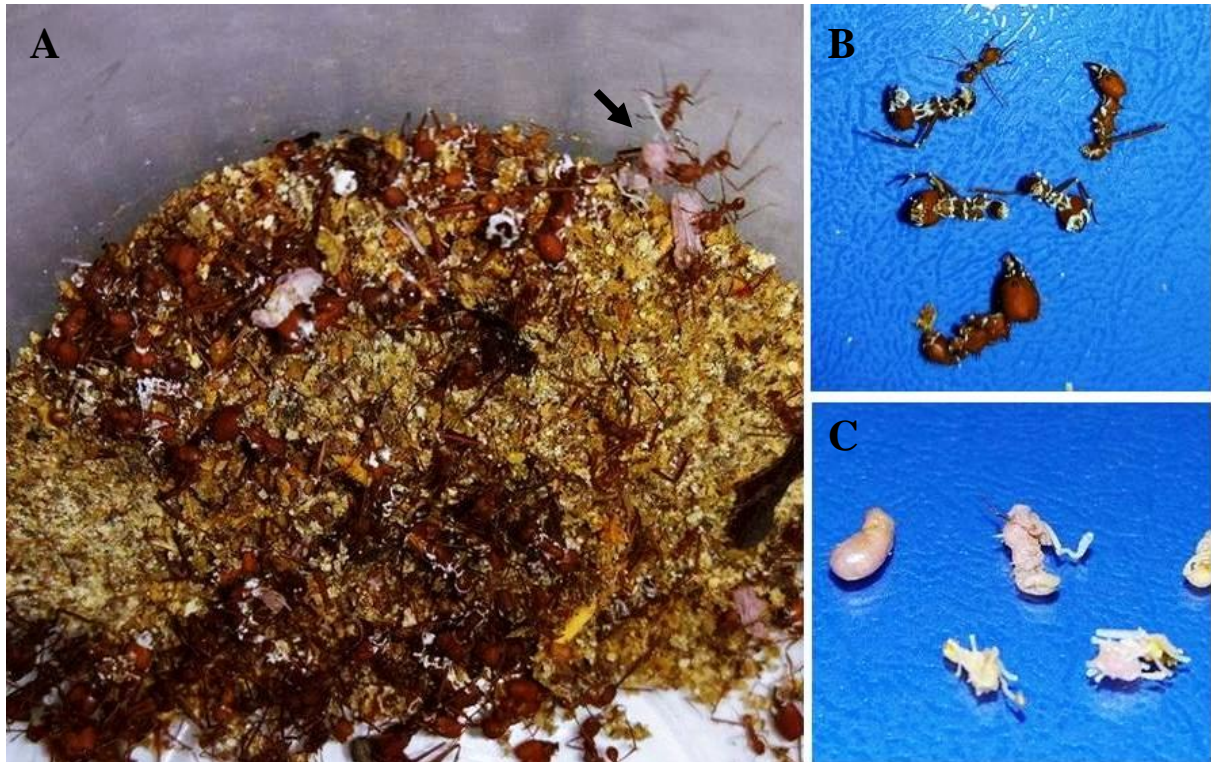
Duas rainhas morreram entre o sexto e o décimo dia. Após análise microscópica e morfológica dos fungos presentes nos cadáveres verificamos que em uma das rainhas houve extrusão de *B. bassiana* e em outra de *I. farinosa* (Figura 10). A mortalidade das operárias também atingiu aproximadamente 50% até o sexto dia, sendo possível observar a extrusão de *B. bassiana* em cadáveres presentes na câmara de lixo. Ainda, no material de refugio estavam presentes pupas com coloração rosada (Figura 11).

Figura 10 – Rainhas mortas após 10 dias de inoculação da combinação entre *B. bassiana* (ENT13) e *I. farinosa* (ENT02). (A) Rainha com extrusão de *B. bassiana* (ENT13); (B) Rainha com extrusão de *I. farinosa* (ENT02).



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 11 – (A) Material de refugio acumulado após a inoculação das linhagens de *B. bassiana* e *I. farinosa*. Seta: destaque para pupas com coloração rosada. (B) Extrusão de *B. Bassiana* (ENT13) em cadáveres de operárias. (C) Pupas com alteração na coloração.



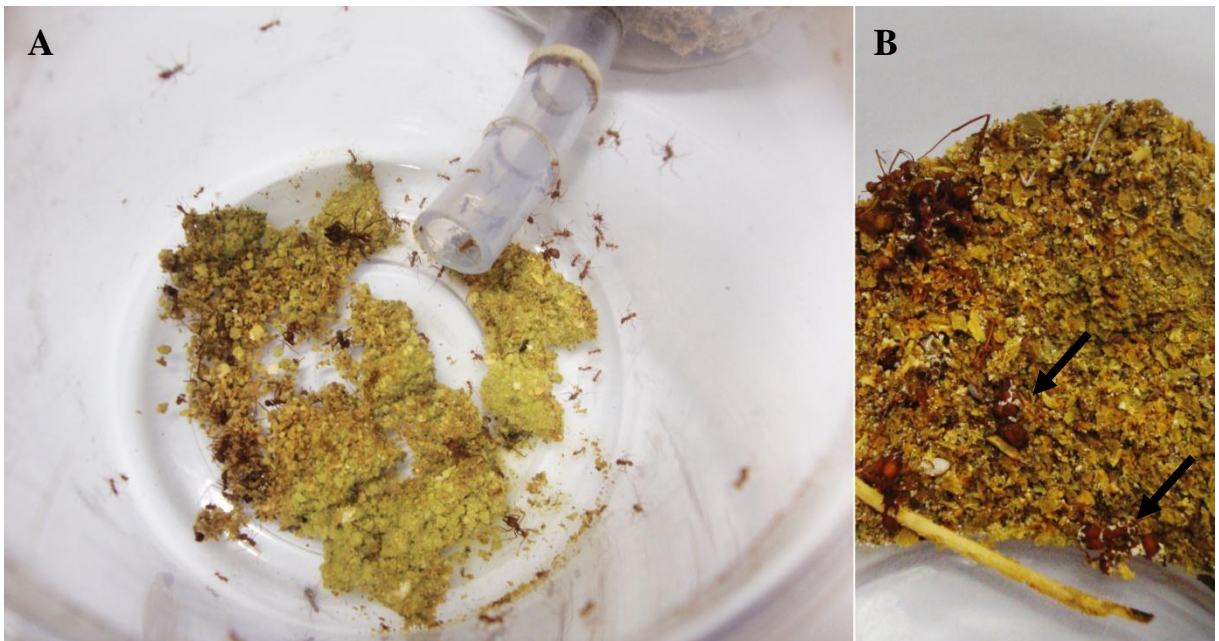
Fonte: Dados da pesquisa

3.4.5.2 *Beauveria bassiana* (ENT13) + *Aspergillus nomius* (ENT22)

No segundo dia houve um grande descarte de material para a área de refugio (lixo). Esse material estava contaminado por *Aspergillus* e com umidade elevada (Figura 12A). Além disso, o corte e a incorporação de folhas no jardim de fungos foram reduzidos em aproximadamente 75% durante todo o período experimental. O jardim de fungos reduziu continuamente a partir do terceiro dia e ao final dos 21 dias, as condições gerais do saueiro atingiram 75% de redução em uma das réplicas e 50% nas demais (Figura 13).

A mortalidade das operárias foi de aproximadamente 50% no sexto dia e no lixo haviam operárias cobertas com *B. bassiana* (Figura 12B). Além disso, duas rainhas morreram, sendo que uma morreu no oitavo dia e outra no décimo sétimo. Em uma das rainhas, foi observada a extrusão de *B. bassiana*, mas não foi possível fazer a confirmação com a segunda rainha devido ao cadáver ter sido encontrado totalmente destruído no material de refugio (Figura 14).

Figura 12 – Material de refugio (A) Fragmentos de jardim de fungos contaminados com *Aspergillus*; (B) Cadáveres de operárias com extrusão de *B. bassiana*.



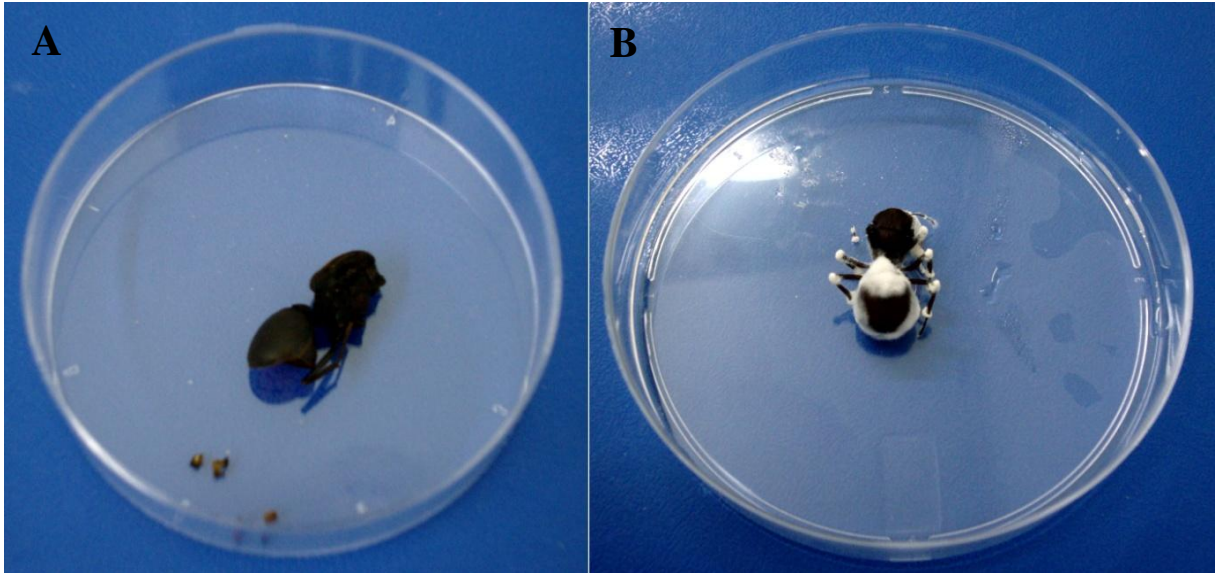
Fonte: Dados da pesquisa

Figura 13 - Condições gerais do saueiro após 21 dias de inoculação da combinação entre *B. bassiana* (ENT13) e *A. nomius* (ENT22). (A) Controle; (B), (C) e (D) Colônias tratadas com os fungos entomopatogênicos.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 14 – Rainhas mortas após 17 dias de inoculação da combinação entre *B. bassiana* (ENT13) e *A. nomius* (ENT22). (A) Cadáver encontrado destruído no material de refugio (B) Rainha com extrusão de *B. bassiana* (ENT13).



Fonte: Dados da pesquisa

3.4.5.3 *I. farinosa* (ENT02) + *B. bassiana* (ENT13) + *P. lilacinum* (ENT19) + *A. nomius* (ENT22)

Uma pequena alteração (25%) no corte de folhas foi observada entre o sexto e o 11º dia. Ainda, neste período, ocorreu intensa produção de lixo, o qual apresentava crescimento de *Aspergillus*. Desta maneira, devido à remoção de fragmentos do jardim e a redução na incorporação de material vegetal, o fungo mutualista apresentou redução de aproximadamente 50%. No entanto, após este período, o jardim de fungos retomou o crescimento e restabeleceu o volume original. A mortalidade das formigas também não ultrapassou 25%, contudo, foi possível observar a extrusão de *B. bassiana* nos cadáveres presentes na câmara de refugio.

3.4.6 Avaliação de métodos de inoculação dos conídios: patogenicidade em colônias *Atta sexdens rubropilosa* através do polvilhamento de conídios

3.4.6.1 Controle negativo

O polvilhamento da mistura composta por maltodextrina e amido de milho não causou alterações nas condições gerais do saueiro. Nem mesmo a quantidade de lixo produzida

apresentou aumento. Desta maneira, os resultados observados nos demais tratamentos referem-se ao potencial danoso dos fungos entomopatogênicos.

3.4.6.2 *Beauveria bassiana* (ENT13) + *Isaria farinosa* (ENT02)

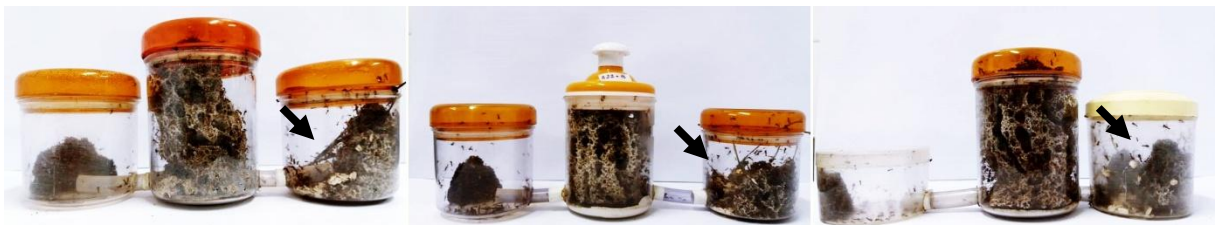
Após o polvilhamento dos conídios de *B. bassiana* e *I. farinosa* foi observado um nível de estresse elevado no saueiro, com as operárias retirando fragmentos do jardim de fungos constantemente. Devido a isto, um grande acúmulo de lixo pode ser observado já nas primeiras 24 horas. O corte e incorporação de material vegetal foram interrompidos entre o primeiro e o quinto dia, após este período, as atividades foram normalizadas.

A mortalidade das operárias atingiu 50% no quinto dia e mais uma vez pode-se observar a presença de pupas rosadas e a extrusão de *B. bassiana* em cadáveres presentes na câmara de refugio. Apesar da mortalidade relativamente alta, as operárias conseguiram controlar a infecção no saueiro e desta maneira este recuperou-se.

3.4.6.3 *Beauveria bassiana* (ENT13) + *Aspergillus nomius* (ENT22)

A combinação de *B. bassiana* e *A. nomius* também causou alterações comportamentais nas operárias de *Atta sexdens rubropilosa*, sendo que após inoculação das linhagens as formigas transferiram parte do jardim de fungos para a câmara destinada ao forrageamento. Este comportamento foi observado nas três réplicas (Figura 15).

Figura 15 – Condições gerais das três réplicas após 21 dias de inoculação da combinação entre *B. bassiana* (ENT13) e *A. nomius* (ENT22). Detalhe para o cultivo do jardim de fungos também na câmara de forrageamento



Fonte: Dados da pesquisa

A mortalidade das operárias atingiu 25% em todas as réplicas e o material de refugio apresentou contaminação por *Aspergillus*. Com relação às condições gerais do saueiro,

apenas após o quinto dia ocorreu um decaimento de 25%, no entanto, a colônia manteve suas atividades de forrageamento e incorporação de folhas durante todo o período experimental.

3.4.7 Avaliação de métodos de inoculação dos conídios: patogenicidade em colônias de *Atta sexdens rubropilosa* através da nebulização de conídios

3.4.7.1 *Beauveria bassiana* (ENT13) + *Isaria farinosa* (ENT02)

A nebulização dos conídios de *B. bassiana* e *I. farinosa* não causou alterações no corte e incorporação de material vegetal. Ainda, as condições gerais do saueiro decaíram em 25% devido à morte de aproximadamente 25% das operárias a partir do quinto dia experimental. Mais uma vez foi observada alteração na coloração das pupas, as quais ficaram rosadas. As câmaras de jardim de fungos e material de refugio permaneceram muito úmidas durante os 21 dias.

3.4.7.1 *Beauveria bassiana* (ENT13) + *Aspergillus nomius* (ENT22)

Após 24 horas da nebulização da combinação entre *B. bassiana* e *A. nomius* foi observada uma intensa remoção de fragmentos do jardim de fungos. Além disso, neste momento não ocorreu corte e incorporação de folhas. A mortalidade atingiu 50% em todas as réplicas após o sétimo dia experimental. No entanto, o jardim de fungos não sofreu alterações superiores a 25%. A umidade das colônias permaneceu elevada durante todo o período experimental.

3.5 Discussão

Os resultados demonstraram que rainhas de *Atta sexdens rubropilosa* podem ser infectadas por diversos fungos. De acordo com Carrión et al. (1996) a contaminação das rainhas de formigas cortadeiras pode ocorrer no ambiente, principalmente no momento de escavação do novo ninho. Isto é provável de ocorrer, uma vez que os gêneros *Aspergillus*, *Beauveria*, *Fusarium*, *Isaria*, *Metarhizium*, *Mucor* e *Purpureocillium*, isolados no presente trabalho, também são comumente encontrados no solo (DOMSCH et al., 1980; HUGHES et al., 2004; PAGNOCCA et al., 2008; SUN et al., 2008; RODRIGUES et al., 2010). Apesar da esporulação prolífera desses gêneros sobre os cadáveres das rainhas, não podemos atribuir a sua morte exclusivamente aos fungos isolados. Isto porque, assim como observado no estudo de Rodrigues et al. (2010), as rainhas podem ter morrido devido a outros fatores, como fome, por exemplo.

Os gêneros *Beauveria*, *Isaria* e *Metarhizium* são reconhecidamente entomopatogênicos pela sua capacidade de infectar uma ampla variedade de insetos (DOMSCH et al., 1980; DIEHL-FLEIG et al., 1991; JACCOUD et al., 1999). Já os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Purpureocillium* são comumente descritos como fungos sapróbios (DOMSCH et al., 1980; CARDOSO, 2010; RODRIGUES et al., 2009). No entanto, alguns isolados de *Fusarium* e *Aspergillus* já foram caracterizados como patógenos a insetos (STEENBERG; HUMBER 1999; HUGHES BOOMSMA, 2004). Da mesma maneira, o gênero *Purpureocillium* possui representantes entomopatogênicos e há relatos da espécie *P. lilacinum* causar doenças inclusive em formigas cortadeiras da espécie *Acromyrmex lundii* (ALVES, 1998; INGLIS; TIGANO 2006; GOFFRÉ; FOLGARAIT, 2015). Com relação ao gênero *Mucor*, este foi descrito até o momento apenas infectando o jardim de fungos das formigas cortadeiras (RODRIGUES et al., 2008).

O teste de patogenicidade “*in vitro*” demonstrou que as espécies *A. flavus*, *A. calidoustus*, *A. insuetus*, *Fusarium* sp. e *M. circinelloides*, não diferiram do controle negativo, ou seja, a mortalidade observada nestes casos decorreu do esgotamento das condições experimentais e não da infecção por estes fungos. Assim, a presença dessas espécies sobre os cadáveres das rainhas cortadeiras, sugere que estes podem se comportar como patógenos oportunistas. De acordo com Casadevall e Pirofski (2000), os patógenos oportunistas são aqueles micro-organismos que podem causar uma infecção após o organismo hospedeiro ter sofrido alguma perturbação, tais como ferimentos, infecções primárias, imunodeficiência e envelhecimento. Contudo, em hospedeiros saudáveis, os patógenos oportunistas não são

capazes de desencadear uma doença (CASADEVALL; PIROFSKI, 2000). Uma segunda hipótese é a de que esses isolados apenas utilizaram os cadáveres das rainhas como substrato ao seu crescimento, reforçando assim sua natureza sapróbia.

Com relação às espécies *B. bassiana*, *I. farinosa* e *M. anisopliae*, *P. lilacinum* e *A. nomius* encontramos uma sobrevivência menor das operárias tratadas com esses fungos em comparação aos controles. Além disso, após a desinfecção dos cadáveres, foi possível observar a extrusão desses fungos na superfície das operárias mortas, confirmando assim que esses foram os responsáveis pela infecção e morte dos indivíduos. Sendo assim, podemos concluir que estes gêneros podem atuar como patógenos de *Atta sexdens rubropilosa*. Esta observação está de acordo com a definição descrita por Casadevall e Pirofski (2000), segundo os quais um micro-organismo pode ser considerado patógeno quando é capaz de causar danos ao hospedeiro.

Ainda quanto à ação patogênica desses fungos, observou-se que as linhagens de *B. bassiana*, *I. farinosa* e *A. nomius* são mais virulentas e causaram a morte de 50% das operárias em 3-4 dias. Já as linhagens de *M. anisopliae* e *P. lilacinum* necessitaram de 5-6 dias para atingir 50% de mortalidade. O trabalho de De Souza Loureiro e Monteiro (2005), no qual utilizaram linhagens de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Paecilomyces farinosus* mostrou que o inóculo de 10^8 conídios/mL dessas linhagens causou a morte de 50% das operárias de *Atta sexdens sexdens* em 2,72-3,05 dias. Contudo, nestes experimentos, as operárias foram mantidas sem alimentação, o que pode torná-las mais debilitadas e suscetíveis à infecção. O estudo de Ribeiro et al. (2012) mostrou uma mortalidade de 50% das operárias de *Atta bisphaerica* após quatro dias da inoculação de 10^8 e 10^9 conídios/mL de *Beauveria bassiana* e 10^9 conídios/mL de *Aspergillus ochraceus*, sendo a dieta das operárias composta por água e mel (1:1). Com relação ao gênero *Isaria*, Cardoso (2010) descreveu que a concentração de 10^8 conídios/mL de *Isaria fumosorosea* foi responsável pela morte de 50% das operárias de *Atta sexdens rubropilosa* após 2,30-2,96 dias, sem alimentação. No estudo realizado por Goffré e Folgarait (2015) o inóculo de 10^6 conídios/mL da espécie *P. lilacinum* causou a morte de metade das operárias após 6-7 dias. Estes dados demonstram que as linhagens selecionadas no presente trabalho são potencialmente mais patogênicas que as linhagens já estudadas por outros autores.

No entanto, embora as condições de acondicionamento (temperatura, umidade e dieta) empregadas “*in vitro*” tenham sido próximas das observadas no ambiente natural, a manipulação das operárias gerou estresse entre os indivíduos. Assim, a significativa mortalidade observada no teste “*in vitro*” pode ter sido favorecida pelo estresse e pelo

isolamento social presente no experimento, como também observado por Ribeiro et al. (2012). Por esta razão, acreditamos que o teste utilizando subcolônias de *Atta sexdens rubropilosa* foi fundamental para comprovar a patogenicidade dos microfungos.

O potencial patogênico observado nos testes “*in vitro*” com as linhagens de *B. bassiana* (ENT13), *I. farinosa* (ENT02), *A. nomius* (ENT22) e *P. lilacinum* (ENT19) foram confirmados nos ensaios posteriores. Assim, a inoculação dessas linhagens causou uma expressiva mortalidade das operárias e jardineiras das subcolônias. Desta maneira, com a redução do número de indivíduos responsáveis pela manutenção do jardim de fungos, este passou a ter uma aparência envelhecida e contaminações instalaram-se sobre o fungo mutualista. A mortalidade das operárias foi o aspecto mais expressivo da infecção por *B. bassiana* (ENT13) e *I. farinosa* (ENT02); por outro lado, as linhagens de *A. nomius* (ENT22) e *P. lilacinum* (ENT19), além de causarem a morte das formigas, impactaram negativamente o jardim de fungos. Em ambos os casos, o jardim de fungos apresentou uma pronunciada redução já nos primeiros dias experimentais e na infecção por *A. nomius* (ENT22) o fungo mutualista de uma das réplicas foi totalmente eliminado. Esta observação impulsionou o desenvolvimento dos estudos descritos no Capítulo 2. Isto porque não há relatos sobre a ação dos fungos entomopatogênicos sobre o fungo mutualista e, uma vez considerada a forte interação simbiótica presente entre o *L. gongylophorus* e as formigas cortadeiras, é de grande interesse selecionar um patógeno que seja capaz de interferir com ambos os indivíduos desta associação ao mesmo tempo.

Com relação ao gênero *Metarhizium*, ao contrário do observado por Jaccoud et al. (1999), o qual obteve a mortalidade de 100% das minicolônias de *Atta sexdens rubropilosa* após a inoculação de esporos secos de *Metarhizium anisopliae*, a linhagem desta espécie isolada no presente trabalho causou alterações pouco relevantes na saúde das subcolônias. Esse resultado pode estar relacionado à distribuição não uniforme dos conídios de *M. anisopliae* em suspensão. Assim como observado por Barcotto (2015, p. 67), mesmo após a homogeneização utilizando vórtex, os conídios de *M. anisopliae* tendem a manter-se agrupados e desta maneira, a dispersão utilizando a suspensão deste pode ter sido ineficiente.

Resultados pouco satisfatórios também foram observados em algumas linhagens de *A. nomius* (ENT62) e *P. lilacinum* (ENT29(2) e ENT36), as quais causaram expressiva mortalidade no teste “*in vitro*”. A redução da patogenicidade em grupos mais densos também foi observada por Goffré e Folgarait (2015). Esta redução pode estar relacionada com os mecanismos de defesa dos insetos sociais, sendo a limpeza mútua bastante intensa em grupos maiores (HUGHES et al., 2002). Além disso, testes “*in vitro*” são livres das complexas

interações existentes no ambiente do saueiro, nas quais outros organismos (fungos e bactérias) também atuam e podem interferir na patogenicidade do agente de biocontrole.

Os resultados obtidos durante o teste de coinfeção indicam que a combinação de dois ou mais fungos causa alterações acentuadas nas subcolônias, afetando todas as atividades normais do saueiro. Ainda, a inoculação dos mesmos resultou em elevado estresse no saueiro, sendo os comportamentos de defesa executados intensamente. Entre eles foi observada a intensa remoção de fragmentos do jardim de fungos (*weeding*) e após coinfeção por *I. farinosa* e *A. nomius* as formas jovens (pupas) foram removidas da câmara de jardim e levadas para a câmara de refugio onde fragmentos do jardim foram depositados sobre elas. Segundo Jaccoud et al. (1990) os indivíduos transportados estão contaminados por conídios do patógeno e são removidos da câmara de fungo a fim de evitar a contaminação dos outros indivíduos.

Além desse fato, durante os ensaios utilizando as linhagens individuais, a mortalidade de 50% das operárias foi atingida entre o quarto e o décimo dia experimental, enquanto que nos ensaios de coinfeção esta porcentagem foi obtida entre o terceiro e o quinto dia. A rápida mortalidade de aproximadamente 50% das formigas do saueiro, provavelmente favoreceu o crescimento do micoparasita especializado do jardim de fungos, o *Escovopsis*. Currie et al. (1999a), utilizando ninhos de formigas da tribo Attini de ocorrência natural na América Central, observaram que até 77,5% dos ninhos apresentam contaminação por *Escovopsis*. Até mesmo em colônias mantidas em laboratório (como a utilizada na obtenção dos fragmentos jardim do presente trabalho) a prevalência do micoparasita é elevada. Contudo, quando o saueiro encontra-se saudável, as operárias conseguem controlar a infecção através dos comportamentos de *grooming* e *weeding* (CURRIE; STUART, 2001; ZAMUNÉR, 2015). Porém, com um número reduzido de operárias, como foi observado neste estudo, os comportamentos de defesa podem ser insuficientes e a infecção pode se instalar, levando a colônia a morte. O impacto da infecção desencadeada pela presença dos fungos entomopatogênicos com o micoparasita *Escovopsis* estimulou o estudo das interações entre esses fungos. Os resultados referentes a estas interações são descritos no Capítulo 2.

O desenvolvimento de contaminantes após a inoculação de patógenos em escala de subcolônias é facilitado, pois, na ausência de rainhas, a redução no número de formigas é constante. Desta maneira, além da presença do patógeno, o qual pode infectar mais indivíduos e levá-los a morte, ainda não há a reposição de novas operárias e o saueiro entra em colapso. No caso de colônias completas este resultado seria menos provável, já que mesmo frente à morte de um grande número de operárias ainda existe a reposição das mesmas a partir da

rainha (BARCOTTO, 2015). Essa observação está de acordo com os resultados obtidos nos experimentos com colônias completas de *Atta sexdens rubropilosa*. Até mesmo o patógeno *Aspergillus nomius*, presente em elevada carga parasitária, desenvolveu-se apenas sobre os fragmentos de jardim presentes no material de refugio (Figura 12).

Nos experimentos utilizando colônias completas, apesar dos eficientes mecanismos de defesa do saueiro, as combinações de *B. bassiana* com *A. nomius* e *B. bassiana* com *I. farinosa* interferiram com a rotina das colônias adultas de laboratório causando inclusive a morte de algumas rainhas. Entre o sexto e o décimo sétimo dia após inoculação dessas combinações, quatro das seis rainhas utilizadas morreram. A morte de três delas foi confirmada pela extrusão de *B. bassiana* em duas rainhas e *I. farinosa* em uma. Este resultado demonstra o potencial dessas linhagens no controle biológico das formigas cortadeiras, uma vez que a morte da rainha leva o saueiro ao colapso por falta de reposição dos indivíduos. Embora isto represente um resultado bastante satisfatório, é importante ressaltar a escala em que o experimento foi realizado, pois neste caso, as rainhas estavam confinadas em um espaço limitado com uma elevada concentração de conídios dos patógenos. Sendo assim, estes resultados são promissores na escala em que foram realizados e indicam que os estudos com estes fungos devem prosseguir a fim de otimizar a aplicação em ninhos naturais.

Com relação à alteração na coloração das pupas em todos os ensaios utilizando a combinação de *B. bassiana* com *I. farinosa*, provavelmente está relacionada a produção da micotoxina oosporina (PADULLA, 2007; PINTO et al., 2012). A oosporina é produzida por fungos do gênero *Beauveria*. O mecanismo de ação desta micotoxina envolve reações do tipo redox, as quais oxidam proteínas e aminoácidos, além disso, a oosporina inibe a atividade da enzima ATPase, responsável pela liberação de energia (PADULLA, 2007; PINTO et al., 2012).

No que se refere aos métodos de dispersão dos conídios, os resultados demonstraram que as metodologias empregadas não são promissoras e precisam ser otimizadas. Ambos os métodos, nebulização e polvilhamento, causaram perturbações nas condições gerais das colônias. Estas perturbações foram mais pronunciadas nos dez primeiros dias, sendo que nestes as operárias dedicaram-se quase que exclusivamente aos comportamentos de *weeding* e *grooming* e a mortalidade atingiu aproximadamente 25%. Contudo, as operárias conseguiram manipular eficientemente os conídios e cobri-los com fragmentos de jardim junto ao material de refugio, evitando assim que a contaminação atingisse mais operárias. De acordo com Jaccoud et al. (1999) a utilização de conídios livres de outras formulações é mais eficiente, isto porque torna a manipulação deste mais difícil às formigas. Estes dados corroboram com

as observações do presente estudo, isto porque a inoculação por gotejamento dos conídios (item 3.3.5) não alterou a umidade da colônia e em poucas horas a suspensão havia desaparecido e os conídios dispersos. Já no caso do método de nebulização, as colônias apresentaram elevada umidade durante todo o período experimental. Esta umidade elevada pode ter propiciado a aglomeração dos conídios facilitando assim a remoção destes. Da mesma maneira, no polvilhamento de esporos, as partículas de amido presentes na formulação são relativamente maiores que os conídios, o que também pode ter facilitado a limpeza realizada pelas formigas (JACCOUD et al., 1999).

Assim como observado no presente trabalho, Jaccoud et al. (1999) descreveram uma mortalidade mais acentuada das operárias durante os 10 primeiros dias experimentais. Ainda segundo estes autores, as operárias compõem o grupo mais exposto ao risco biológico devido ao comportamento de limpeza desempenhado por elas já nas primeiras 24 horas após a inoculação dos conídios. Assim, a diminuição das atividades de corte e incorporação de folhas neste período e conseqüentemente, a diminuição no volume do jardim de fungos ocorrem devido ao fato das operárias estarem se dedicando quase que exclusivamente as atividades de limpeza, tentando assim conter a infecção. Após a remoção dos conídios do jardim de fungos e concentração destes no material de refugio, as operárias retomam as atividades normais e o saueiro se reestabelece.

3.6 Conclusão

As rainhas de *Atta sexdens rubropilosa* podem ser naturalmente infectadas por diversos parasitas fúngicos em condições de campo, causando redução no número de novos ninhos. Os isolados de *Beauveria bassiana* (ENT13), *Isaria farinosa* (ENT02), *Aspergillus nomius* (ENT22) e *Purpureocillium lilacinum* (ENT19) apresentaram um pronunciado efeito patogênico e podem ser considerados entomopatógenos de *Atta sexdens rubropilosa*. Além disso, as combinações de *Beauveria bassiana* (ENT13) com *Isaria farinosa* (ENT02) e *Beauveria bassiana* (ENT13) com *Aspergillus nomius* (ENT22) mostraram sinergismo na patogenicidade contra as formigas cortadeiras, sendo este um resultado inédito. Apesar dos comportamentos de defesa do saueiro, essas combinações foram responsáveis pela morte de algumas rainhas. As linhagens de *B. bassiana* (ENT13) e *I. farinosa* (ENT02) demonstraram elevada virulência contra as rainhas e operárias. Já os fungos *A. nomius* (ENT22) e *Purpureocillium lilacinum* (ENT19), além de causar a mortalidade das formigas, parecem interferir negativamente no jardim de fungos, sendo que a linhagem de *Aspergillus* é capaz de crescer utilizando fragmentos de jardim como substrato. Desta maneira, esforços devem ser direcionados no sentido de otimizar a aplicação dessas combinações em escalas maiores visando ao desenvolvimento de um método eficaz e mais seguro para o controle dessas formigas. Além da seleção de potenciais agentes de biocontrole, o presente capítulo proporcionou a estruturação de uma coleção composta por 88 fungos filamentosos armazenados na Central de Recursos Microbianos da UNESP, Rio Claro/SP.

CAPÍTULO 2

Interações microbianas: ação dos fungos entomopatogênicos frente ao fungo mutualista das formigas cortadeiras e ao micoparasita *Escovopsis*

Resumo

Na busca por métodos de controle biológico, os fungos entomopatogênicos são comumente testados quanto à mortalidade das formigas. No entanto, a sua ação frente ao fungo mutualista cultivado pelas formigas cortadeiras permanece desconhecido. Neste trabalho buscamos elucidar através de testes “in vitro” qual a atuação das linhagens de *Beauveria bassiana* (ENT13), *Isaria farinosa* (ENT02), *Aspergillus nomius* (ENT22) e *Purpureocillium lilacinum* (ENT19) sobre o desenvolvimento do 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 em ambos os organismos. Além disso, ponderando a elevada prevalência do micoparasita especializado *Escovopsis*, nos ninhos de formigas cortadeiras, também torna-se promissor explorar o possível sinergismo entre este e os entomopatógenos. De fato, nossos estudos macro e microscópicos, demonstraram que os fungos *A. nomius* (ENT22) e *P. lilacinum* (ENT19) podem atuar na degradação de estruturas fúngicas como os gongilídeos e as hifas do fungo mutualista e também interferem negativamente no seu desenvolvimento. Com relação ao fungo *Escovopsis*, este parece estimular o crescimento das linhagens de *B. bassiana* (ENT13) e de *I. farinosa* (ENT02) através da secreção de compostos orgânicos voláteis quando são co-cultivados. O perfil de VOC's secretado pelas culturas individuais revelou a presença de ácidos graxos tóxicos às formigas cortadeiras secretados pelas linhagens de *I. farinosa* (ENT02) e *Escovopsis* sp. (ESC2), assim como do composto 1-Octen-3-ol, produzido pela linhagem de *B. bassiana* (ENT13). Este composto é descrito como tóxico a outros insetos. O presente trabalho aponta os fungos *B. bassiana* (ENT13), *I. farinosa* (ENT02), *P. lilacinum* (ENT19) e *A. nomius* (ENT22) como patógenos promissores no controle biológico das formigas cortadeiras.

Palavras chave: Antagonismo. *Leucoagaricus gongylophorus*. *Atta*. Compostos orgânicos voláteis. Biocontrole.

4.1 Introdução

Ao longo da história evolutiva, as formigas cortadeiras e algumas poucas linhagens de fungos passaram a não mais sobreviver separadamente e desenvolveram a fungicultura mais derivada da tribo Attini (CURRIE et al., 1999, HINKLE et al., 1994, MUELLER et al., 1998; SCHULTZ; BRADY, 2008). Devido a esta associação obrigatória entre as formigas cortadeiras e o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* (Basidiomycota: Agaricaceae), o sucesso do método de biocontrole depende de desestruturar esta interação, atingindo as formigas cortadeiras, o seu fungo mutualista ou ambos.

Os fungos entomopatogênicos são comumente associados à mortalidade de insetos (DELLA LUCIA; VILLELA, 1993). Contudo, a sua ação frente ao fungo mutualista cultivado pelas formigas cortadeiras permanece desconhecida. Os danos descritos ao jardim de fungos, em trabalhos que utilizam a sua aplicação em ninhos artificiais, estão sempre relacionados à mortalidade das operárias. Colônias com número reduzido de formigas (incluindo operárias e jardineiras) diminuem as atividades de corte e incorporação de folhas; os comportamentos de defesa também são afetados e assim o jardim de fungos apresenta diminuição de volume, aspecto envelhecido e por vezes, ocorre o aparecimento de contaminantes (DIEHL-FLEIG et al., 1991; JACCOUD et al., 1999). No entanto, não há informações de pesquisas com o objetivo de caracterizar a atuação dos fungos entomopatogênicos frente ao mutualista na ausência de formigas.

Assim, os métodos de biocontrole, que tem como alvo o fungo mutualista, utilizam apenas fungos micoparasitas. Entre os potenciais antagonistas ao jardim de fungos das formigas cortadeiras, destacam-se as espécies: *Acremonium kiliense*, *Trichoderma harzianum*, *Escovopsis weberi* e *Syncephalastrum racemosum*. Todos eles são citados com ação degenerativa sobre o micélio do fungo *L. gongylophorus* (SILVA et al.; 2006; BARCOTO et al., 2016).

O gênero *Escovopsis* (Ascomycota: Hypocreales) é o mais estudado, uma vez que é considerado um micoparásita especializado do jardim de fungos das formigas cortadeiras (CURRIE et al., 1999a). O fungo *Escovopsis* é capaz de utilizar o conteúdo citoplasmático das hifas do fungo mutualista como nutriente ao seu crescimento e por isso, é considerado um micoparásita necrótrofo de contato (REYNOLDS; CURRIE, 2004). Apesar da reconhecida agressividade do gênero *Escovopsis* frente ao mutualista, o desenvolvimento deste micoparásita nas colônias saudáveis é inibido pelos eficientes mecanismos de defesa do saúveiro (ZAMUNÉR, 2015). Sendo assim, muitas vezes o seu crescimento sobre o jardim de

fungos é observado apenas após algum evento que desestruture a colônia. Essa desestruturação pode resultar de uma elevada mortalidade das formigas, causada por aplicações de inseticidas ou pela infecção por patógenos. Estes eventos reduzem a capacidade das formigas em remover os fragmentos contaminados por *Escovopsis* (HUGHES; BOOMSMA, 2004; FOLGARAIT et al., 2011).

Outra vertente que vem destacando-se na busca por métodos de biocontrole é o estudo dos compostos orgânicos voláteis (VOC's). Diversos compostos microbianos apresentam efeitos tóxicos, repelentes ou antimicrobianos (HEIL, 2008; STENBERG et al., 2015; MITHÖFER et al., 2016; WERNER et al., 2016) e podem ser promissores ao controle de insetos (CRESPO et al., 2008; HUSSAIN et al., 2010; MOHAMMADI et al., 2016). No entanto, apenas recentemente a riqueza de compostos orgânicos voláteis microbianos está sendo estudada (PIECHULLA; DEGENHARDT, 2014).

4.2 Objetivos

- Avaliar se as linhagens de *Beauveria bassiana* (ENT13), *Isaria farinosa* (ENT02), *Aspergillus nomius* (ENT22) e *Purpureocillium lilacinum* (ENT19) e suas combinações causam danos ao fungo mutualista.
- Determinar quais os mecanismos de ação dos fungos entomopatogênicos durante as interações com o *Leucoagaricus gongylophorus*.
- Elucidar como essas linhagens entomopatogênicas interagem com o micoparasita *Escovopsis*.

4.3 Material e Métodos

4.3.1 Interações microbianas

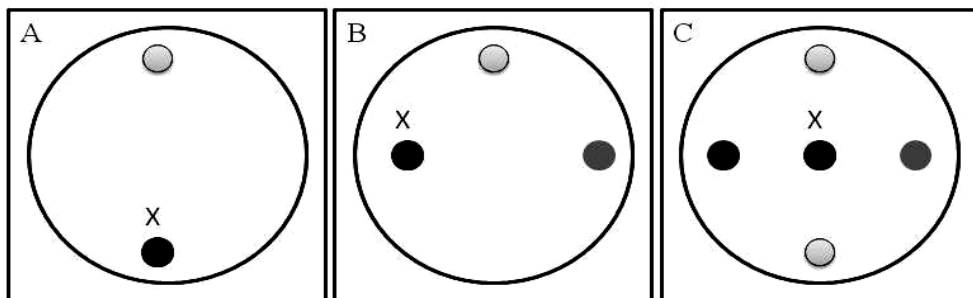
O presente trabalho avaliou a interação de quatro fungos entomopatogênicos, sendo eles as linhagens de *Isaria farinosa* (ENT02), *Beauveria bassiana* (ENT13), *Purpureocillium lilacinum* (ENT19) e *Aspergillus nomius* (ENT22), com o fungo mutualista das formigas cortadeiras (*Leucoagaricus gongylophorus*) e com o seu principal micoparasita, o fungo do gênero *Escovopsis*. Estes foram avaliados em pares e também na combinação dos quatro fungos concomitantemente, isto porque estas combinações mostraram-se promissoras no controle das formigas cortadeiras (Capítulo 1). A linhagem FF2006 do fungo mutualista *Leucoagaricus gongylophorus* utilizada nesse experimento foi isolada pelo Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca. Esta linhagem foi isolada a partir de uma colônia de laboratório de *Atta sexdens rubropilosa* existente no Laboratório de Formigas Cortadeiras do Centro de Estudos de Insetos Sociais – UNESP, Rio Claro. Já os ensaios com o gênero *Escovopsis* contaram com a linhagem da espécie *Escovopsis* sp. isolada no Capítulo 1.

Os grupos controle do estudo foram estruturados com os cultivos individuais de: i) *I. farinosa* (ENT02); ii) *B. bassiana* (ENT13); iii) *P. lilacinum* (ENT19); iv) *A. nomius* (ENT22); v) *Escovopsis* sp. (ESC2); vi) *L. gongylophorus* (FF2006). Além dos cultivos individuais, quatro co-cultivos (selecionados pelo seu potencial patogênico às formigas cortadeiras e ao seu fungo mutualista – Capítulo 1) foram utilizados: i) *I. farinosa* (ENT02) + *B. bassiana* (ENT13); ii) *B. bassiana* (ENT13) + *P. lilacinum* (ENT19); iii) *B. bassiana* (ENT13) + *A. nomius* (ENT22); iv) *I. farinosa* (ENT02) + *B. bassiana* (ENT13) + *P. lilacinum* (ENT19) + *A. nomius* (ENT22). Desta maneira, foram estruturados os desafios entre um fungo entomopatogênico e o *L. gongylophorus* (FF2006) ou o *Escovopsis* sp. (ESC2) e com as combinações de fungos entomopatogênicos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, incluindo os experimentos controle.

O estudo foi conduzido segundo a metodologia modificada de Silva et al. (2006). Para tanto, utilizou-se discos de 10 mm de diâmetro de micélio fúngico previamente crescido em meio *Potato Dextrose Agar* (PDA) a 25° C. Os discos foram colocados a 1,0 cm de distância da borda das placas também contendo meio *Potato Dextrose Agar* (PDA). A disposição das linhagens está ilustrada na Figura 16. No caso dos ensaios contendo o *L. gongylophorus* (FF2006), este foi semeado nas placas experimentais e incubado a 25°C durante 10 dias a fim de permitir o seu crescimento. Apenas após este período os demais fungos foram adicionados.

Após a adição de todas as linhagens fúngicas, as placas foram incubadas a 25 °C, durante 14 dias, no escuro.

Figura 16 – Disposição das linhagens utilizadas no estudo de interações: (A) Cultivo de uma linhagem de fungos entomopatogênico e o *L. gongylophorus* (FF2006) ou o *Escovopsis* sp. (ESC2); (B) Cultivo da combinação de duas linhagens de fungos entomopatogênicos e o *L. gongylophorus* (FF2006) ou o *Escovopsis* sp. (ESC2); (C) Cultivo das quatro linhagens de fungos entomopatogênicos e o *L. gongylophorus* (FF2006) ou o *Escovopsis* sp. (ESC2).



X: linhagens de *L. gongylophorus* (FF2006) ou o *Escovopsis* sp.

Fonte: Elaborado pela autora

O efeito de cada linhagem de fungo entomopatogênico, e suas combinações, sobre o crescimento do *L. gongylophorus* (FF2006) e do *Escovopsis* sp. (ESC2), assim como as interações entre os próprios fungos entomopatogênicos foi monitorado e registrado diariamente durante 14 dias de crescimento. Para tanto, as placas foram digitalizadas em *scanner* (HP Deskjet F2050, impressora multifuncional) e fotografadas.

4.3.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Duas combinações de fungos entomopatogênicos com o fungo mutualista (*P. lilacinum* (ENT19) + *L. gongylophorus* (FF2006) e *A. nomius* (ENT22) + *L. gongylophorus* (FF2006)) foram selecionados para análises de microscopia eletrônica de varredura a fim de avaliar a interação física entre eles. Além das combinações, foram estruturados cultivos individuais do fungo mutualista e dos fungos entomopatogênicos para comparação durante as análises microscópicas.

Os ensaios foram realizados segundo o método proposto por Nordbring-Hertz (1983). Desta maneira, foram utilizadas tiras de membrana de diálise de celulose com aproximadamente 10 cm de comprimento e 2,0 de largura. Essas membranas foram aplicadas

na superfície das placas de Petri contendo meio *Potato Dextrose Agar* (PDA) e sobre essas foram semeados discos de 10 mm de diâmetro de micélio fúngico, previamente crescido em meio PDA a 25° C. Para cada ensaio foram estruturadas três réplicas.

As placas foram monitoradas diariamente, e uma vez observado contato físico entre os micro-organismos, as amostras foram tratadas seguindo o método adaptado de Mello et al (2008). Primeiramente, as amostras foram fixadas com tetróxido de ósmio e, após quatro dias, foram retirados fragmentos da membrana de diálise contendo o local de contato entre as hifas. Os fragmentos foram desidratados em banhos sucessivos com acetona a concentrações de 50, 75, 90, 95 e 100% até atingir o ponto crítico de desidratação (Balzers CPD030). Posteriormente, o material desidratado foi colocado em suportes de alumínio e metalizado com ouro em *Sputtering* (Balzers SCD050). O exame microscópico das amostras foi realizado em microscópio eletrônico de varredura (Hitachi TM300).

4.3.3 Compostos orgânicos voláteis (VOC's)

Buscando compreender algumas interações observadas nos experimentos, foi avaliada a secreção de compostos orgânicos voláteis (VOC's) de dois fungos entomopatogênicos - *I. farinosa* (ENT02) e *B. bassiana* (ENT13)- e também de uma linhagem de *Escovopsis* sp. (ESC2), ambos em crescimento individual e em co-cultivo. Para tanto, foram realizadas os seguintes cultivos: i) Crescimento individual das linhagens de *I. farinosa* (ENT02), *B. bassiana* (ENT13) e *Escovopsis* sp. (ESC2); ii) Co-cultivo de *I. farinosa* (ENT02) com *Escovopsis* sp. (ESC2); iii) Co-cultivo de *B. bassiana* (ENT13) com *Escovopsis* sp. (ESC2); iv) Meio de cultivo sem inóculo.

Os ensaios foram conduzidos de acordo com a metodologia modificada de Strobel et al. (2001) e foram realizados em triplicata. Nestes, foram utilizadas placas de Petri (90 cm x 15 cm) com meio PDA, sendo que essas possuíam um furo lateral para introdução da fibra. Além disso, a faixa central do meio de cultivo foi retirada a fim de evitar o contato físico entre os micro-organismos testados.

As placas foram incubadas a 25°C, no escuro, e as leituras foram realizadas com sete e com 14 dias de crescimento. Para a detecção dos VOC's foi utilizado o suporte SPME (Solid-Phase Micro-Extraction) com a fibra SPME Stable Flex, 50/30 DVB/CAR/PDMS (divinylbenzene/carboxen on polydemethylsiloxane). A fibra foi exposta por cinquenta minutos no espaço sobre o meio de cultivo, e após esse período, o SPME foi inserido no cromatógrafo a gás (Agilent, Série 6890) com detector seletivo de massas e com sistema

quadruplo (GC-MSD: Agilent MS 5973 *Network*), equipado com coluna CP-Sil8 CB (30 m x 0.25 μm). Suporte de SPME: holder comercial (cat. N° 5-7330, SUPELCO).

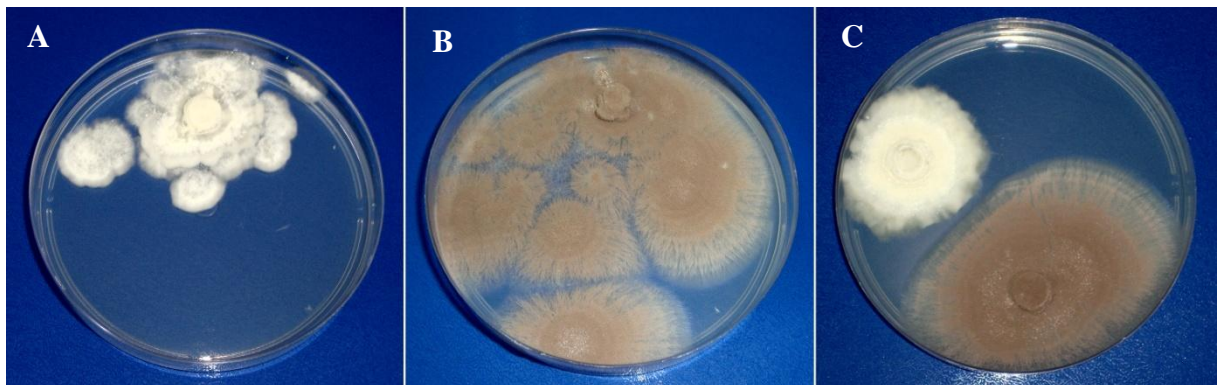
A identificação dos compostos baseou-se na comparação dos VOC's produzidos com os compostos da biblioteca NIST11. Nos casos de similaridade inferior a 60% com biblioteca NIST11, os compostos foram classificados como "composto desconhecido".

4.4 Resultados

4.4.1 Interações microbianas

Durante a interação entre os fungos entomopatogênicos, observou-se que estes não impedem o crescimento um do outro e não causam alterações morfológicas na colônia. No entanto, não ocorre a sobreposição de hifas e desta maneira, as linhagens em co-cultivo crescem até atingir o micélio umas das outras e neste momento o crescimento é interrompido. Sendo assim, as linhagens com crescimento mais lento crescem menos em comparação aos controles. Na figura 17 é possível observar um exemplo desta interação com 14 dias de crescimento.

Figura 17 – Interação entre fungos entomopatogênicos. (A) Cultivo de *B. bassiana* (ENT13); (B) Cultivo de *P. lilacinum* (ENT19); (C) Co-cultivo de *B. bassiana* (ENT13) e *P. lilacinum* (ENT19)

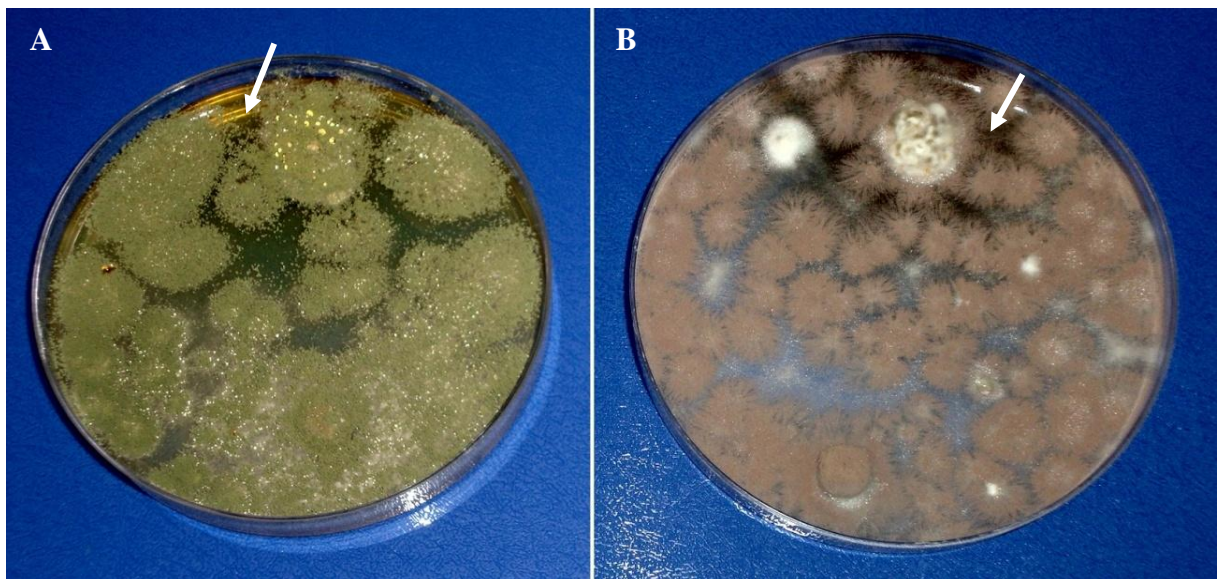


Fonte: Dados da pesquisa

Com relação aos co-cultivos envolvendo o fungo *L. gongylophorus* (FF2006), as linhagens de *I. farinosa* (ENT02) e *B. bassiana* (ENT13), não causam alterações em seu crescimento. Já nos co-cultivos com *P. lilacinum* (ENT19) e *A. nomius* (ENT22) foi observado que estes crescem totalmente sobre o fungo mutualista. Ainda, o local de encontro entre as hifas do *L. gongylophorus* (FF2006) e dos fungos entomopatogênicos apresentou escurecimento do meio de cultivo e alteração na coloração da colônia do fungo mutualista para preta. Sendo assim, essas combinações fúngicas foram selecionadas para estudos de microscopia eletrônica a fim de verificar se as hifas desses dois fungos entomopatogênicos causam danos físicos ao fungo mutualista. Na Figura 18 é possível observar a interação entre

as linhagens de *P. lilacinum* (ENT19) e *A. nomius* (ENT22) com o *L. gongylophorus* (FF2006), após 14 dias de crescimento.

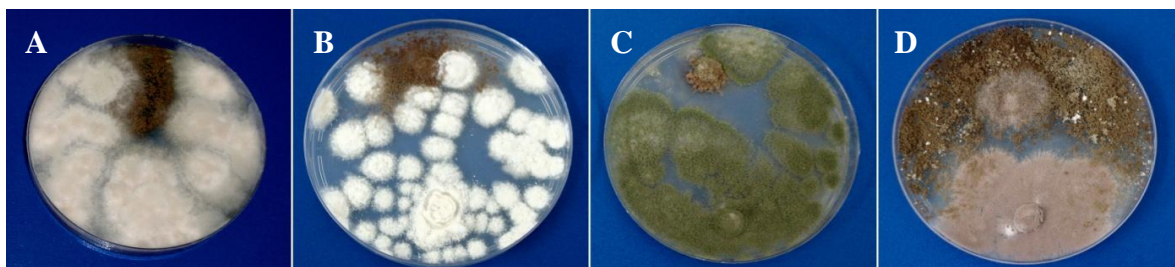
Figura 18 – Interações entre o *L. gongylophorus* (FF2006) e os fungos entomopatogênicos (A) Co-cultivo com *A. nomius* (ENT22); (B) Co-cultivo com *P. lilacinum* (ENT19). Seta: detalhe do escurecimento do meio de cultivo ao redor da cultura de *L. gongylophorus* (FF2006).



Fonte: Dados da pesquisa

Os co-cultivos com *Escovopsis* sp. (ESC2) demonstraram que as linhagens de *I. farinosa* (ENT02), *B. bassiana* (ENT13) e *A. nomius* (ENT22) inibem o crescimento do micoparasita (Figura 3A, B e C). Já em co-cultivo com *P. lilacinum* (ENT19), ambas as linhagens crescem até o momento de encontro das culturas, havendo uma pequena sobreposição de hifas (Figura 19D).

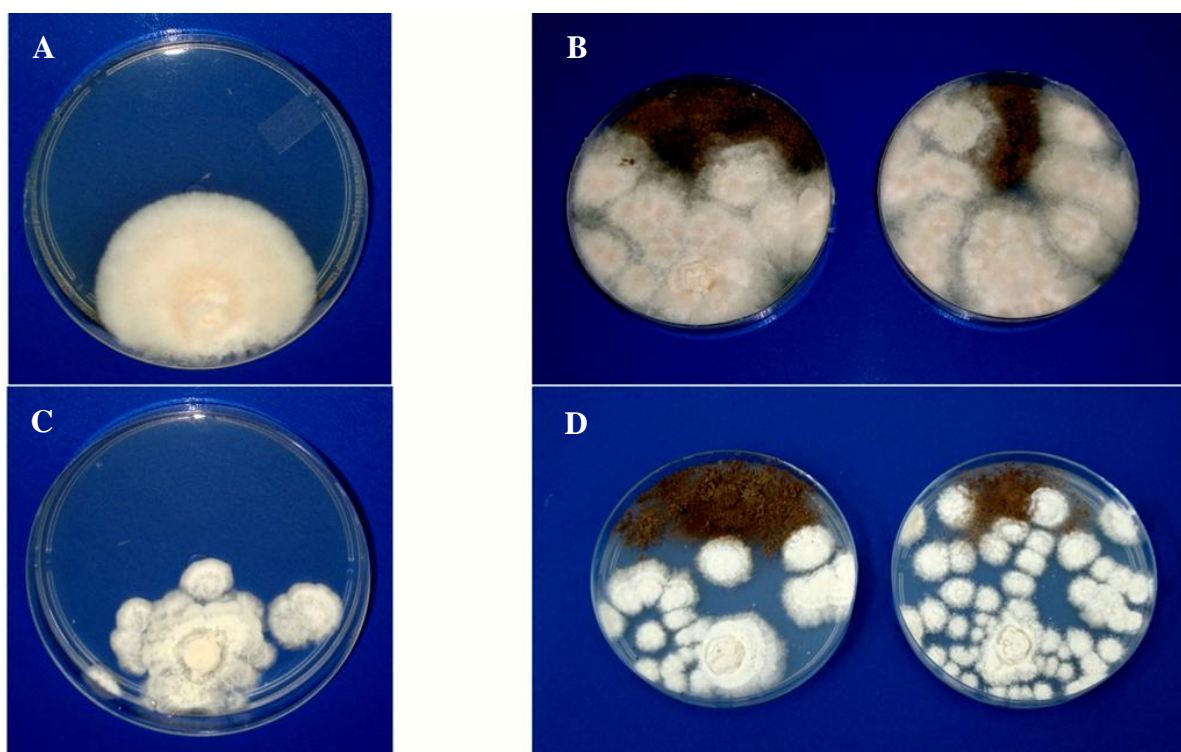
Figura 19 – Interações entre os fungos entomopatogênicos e o micoparasita *Escovopsis* sp. (ESC2). (A) Co-cultivo com *I. farinosa* (ENT02); (B) Co-cultivo com *B. bassiana* (ENT13); (C) Co-cultivo com *A. nomius* (ENT22); (D) Co-cultivo com *P. lilacinum* (ENT19)



Fonte: Dados da pesquisa

Ainda, as linhagens de *I. farinosa* (ENT02) e *B. bassiana* (ENT13) apresentaram maior crescimento, em comparação aos controles, quando co-cultivadas como fungo *Escovopsis* sp. (ESC2) (Figura 20). Desta maneira, essas combinações foram avaliadas quanto à produção de compostos orgânicos voláteis, a fim de averiguar quais compostos são produzidos pelos fungos *I. farinosa* (ENT02), *B. bassiana* (ENT13) e *E. web Escovopsis* sp. (ESC2) individualmente e em co-cultivo.

Figura 20 – Interação entre as linhagens *I. farinosa* (ENT02) e *B. bassiana* (ENT13) com *Escovopsis* sp. (ESC2). (A) Cultivo individual de *B. bassiana* (ENT13); (B) Co-cultivo de *B. bassiana* (ENT13) e *Escovopsis* sp. (ESC2); (C) Cultivo individual de *I. farinosa* (ENT02); (D) Co-cultivo de *I. farinosa* (ENT02) e *Escovopsis* sp. (ESC2)



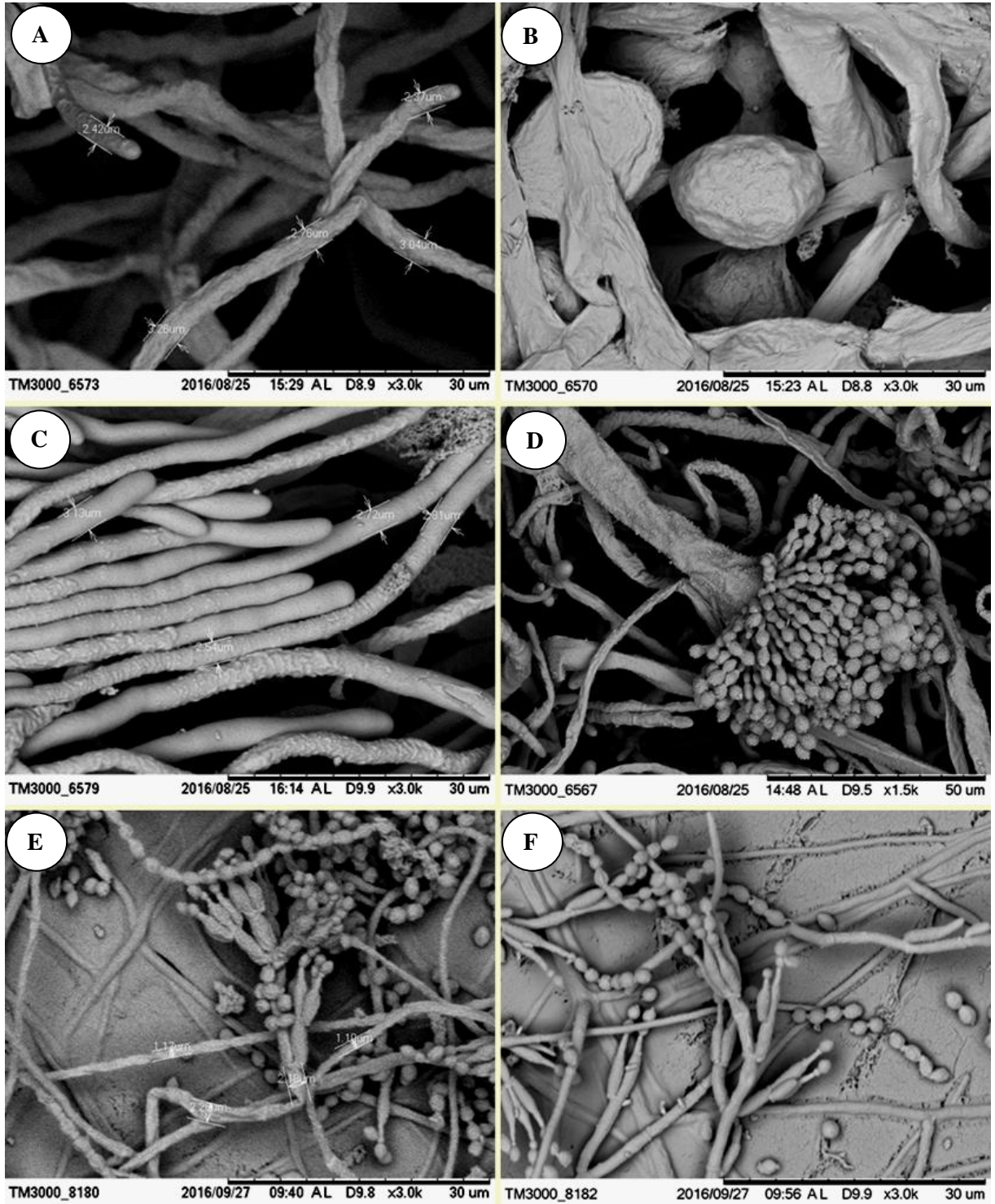
Fonte: Dados da pesquisa

4.4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A partir do estudo de microscopia eletrônica de varredura das culturas individuais de *L. gongylophorus* (FF2006), *P. lilacinum* (ENT19) e *A. nomius* (ENT22) foi possível observar as diferenças de diâmetro das hifas de cada linhagem e desta maneira diferenciá-las nos ensaios de co-cultivo. Observou-se que, no aumento de 3000x, as hifas do fungo mutualista apresentam uma média de $2,81 \pm 0,43 \mu\text{m}$ de diâmetro. As hifas do fungo *A. nomius* (ENT22)

possuem diâmetro médio semelhante com $2,83 \pm 0,88 \mu\text{m}$, sendo as hifas contendo as estruturas assexuadas as de maior diâmetro. Já a linhagem de *P. lilacinum* (ENT19), apresenta hifas mais finas, tendo média de $1,68 \pm 0,58 \mu\text{m}$ de diâmetro. Ainda, o estudo proporcionou a observação das estruturas características de cada linhagem, ou seja, os gongilídeos do *L. gongylophorus* (FF2006), bem como as estruturas assexuadas dos fungos *P. lilacinum* (ENT19) e *A. nomius* (ENT22). A Figura 21 apresenta as imagens referentes aos cultivos individuais de cada linhagem.

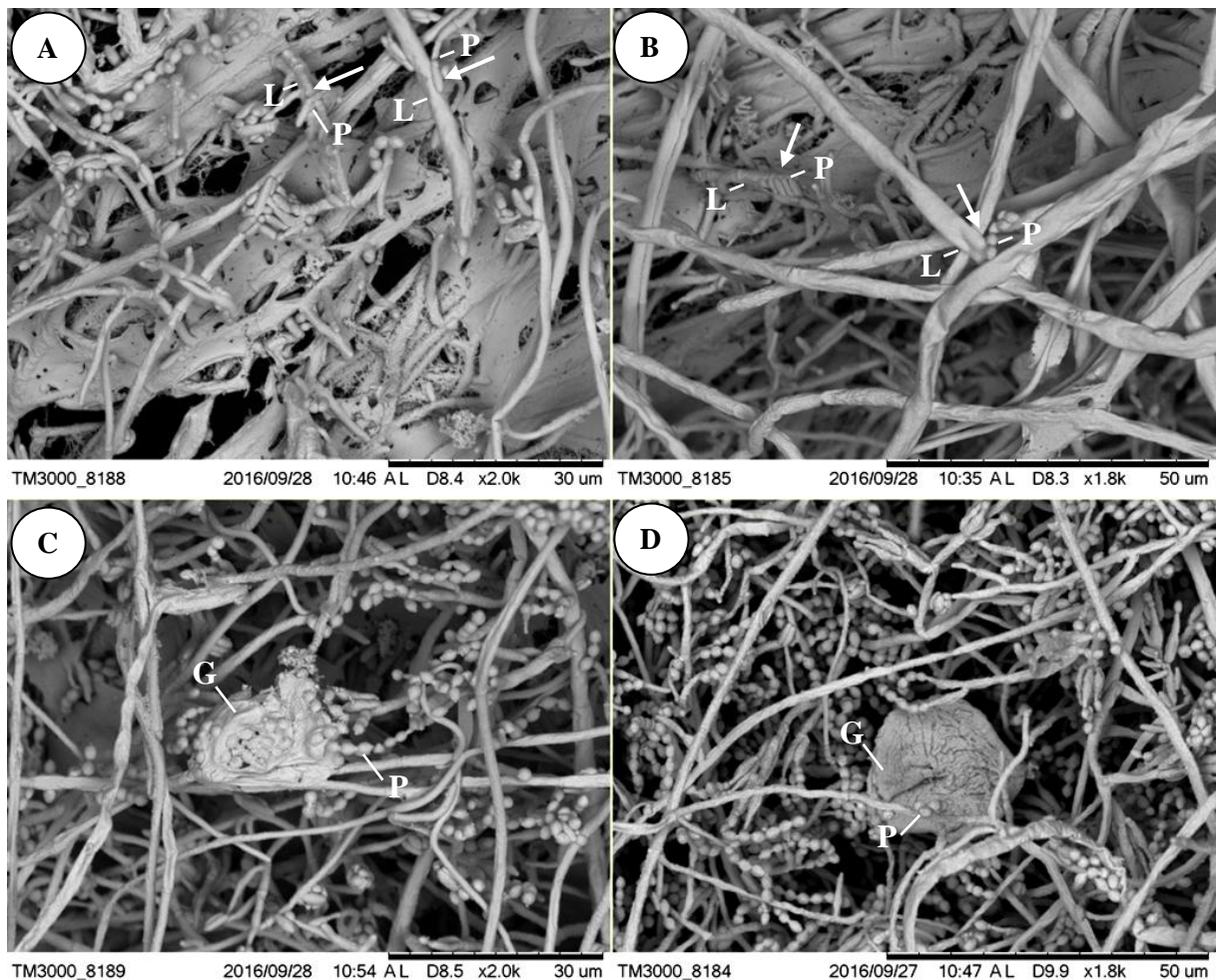
Figura 21 – Micrografias eletrônicas de varredura dos cultivos individuais. (A) Hifas do fungo *L. gongylophorus* (FF2006); (B) Gongilídeos; (C) Hifas do fungo *A. nomius* (ENT22); (D) Estrutura assexuada do *A. nomius* (ENT22); (E-F) Hifas e estruturas assexuadas do fungo *P. lilacinum* (ENT19).



Fonte: Dados da pesquisa

Em todos os ensaios de co-cultivo entre *P. lilacinum* (ENT19) e *L. gongylophorus* (FF2006) foi possível observar que o fungo entomopatogênico mantém contato físico com as hifas do fungo mutualista (Figura 22A-B). Além disso, na Figura 22B é possível observar o enrolamento da hifa do *P. lilacinum* (ENT19) na hifa do *L. gongylophorus* (FF2006). As micrografias eletrônicas de varredura também possibilitaram a observação do enrolamento de hifas e conídios do *P. lilacinum* (ENT19) nos gongilídeos, aparentemente degradados, do *L. gongylophorus* (FF2006) (Figura 22C-D). No entanto, não foi observada nenhuma estrutura especializada, como por exemplo, apressório das hifas do *P. lilacinum* (ENT19) no fungo mutualista.

Figura 22 - Micrografias eletrônicas de varredura da interação entre *P. lilacinum* (ENT19) e *L. gongylophorus* (FF2006). (A-B) Contato físico das hifas do *P. lilacinum* (ENT19) com as hifas do *L. gongylophorus* (FF2006) evidenciado pelas setas; (C-D) Gongilídeos do *L. gongylophorus* (FF2006) envoltos por hifas e conídios do *P. lilacinum* (ENT19).

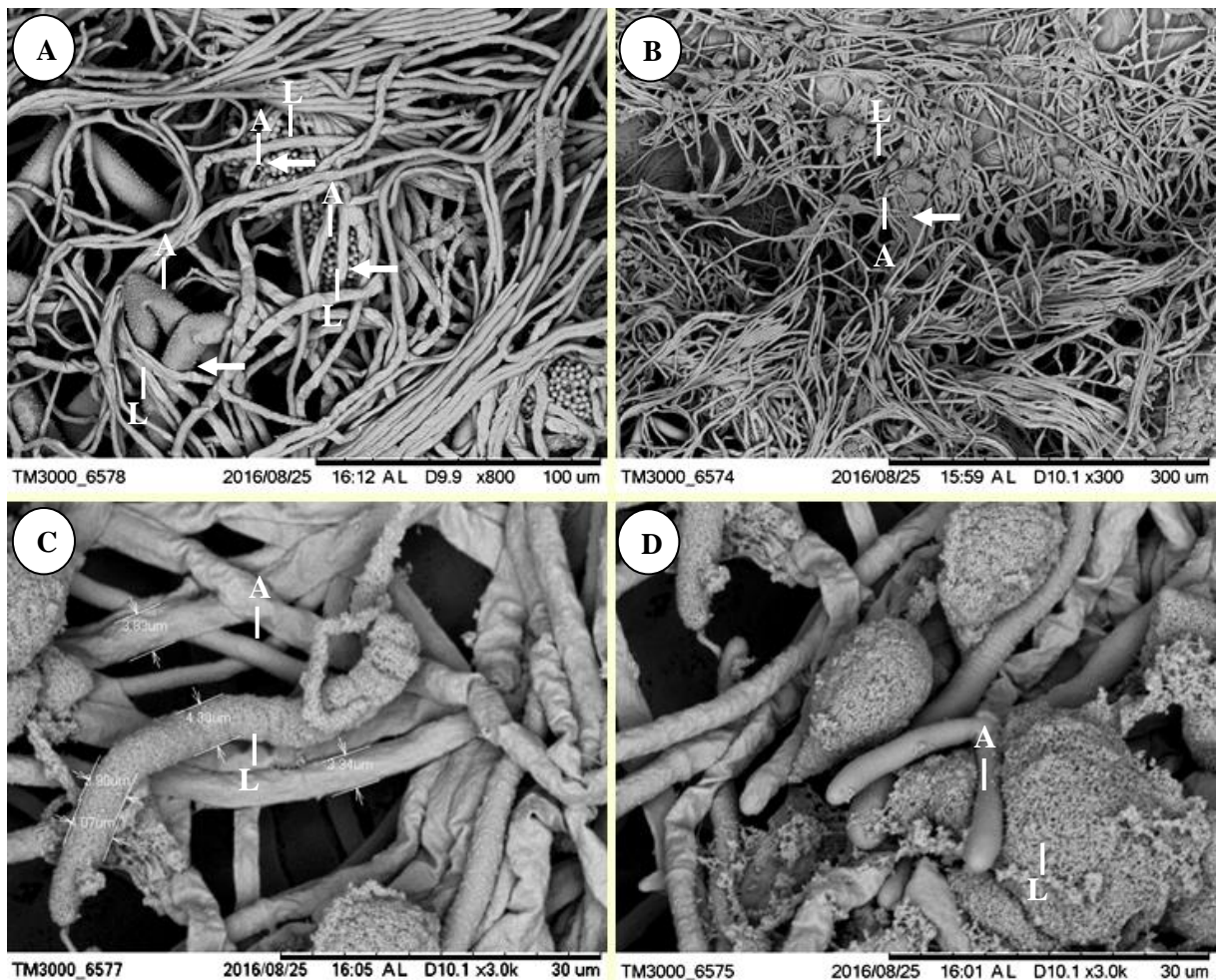


L: *L. gongylophorus* (FF2006); P: *P. lilacinum* (ENT19); G: gongilídeo

Fonte: Dados da pesquisa

Nas micrografias eletrônicas de varredura referentes à interação do fungo *A. nomius* (ENT22) com o mutualista *L. gongylophorus* (FF2006), também não foram observadas estruturas especializadas. Contudo, em todos os ensaios, foi observado o crescimento micelial do *A. nomius* (ENT22) sobre o fungo mutualista (Figura 23A-B). Ainda, as hifas e os gongilídeos do *L. gongylophorus* (FF2006) que estavam em contato físico com o *A. nomius* (ENT22) apresentaram sinais de degradação (Figura 23C-D).

Figura 23 - Micrografias eletrônicas de varredura da interação entre *A. nomius* (ENT22) e *L. gongylophorus* (FF2006). (A) Contato físico das hifas do *A. nomius* (ENT22) com as hifas do *L. gongylophorus* (FF2006) evidenciado pelas setas; (B) Área de encontro entre as linhagens de *A. nomius* (ENT22) e *L. gongylophorus* (FF2006) evidenciado pelas setas; (C) Hifas do *L. gongylophorus* (FF2006) aparentemente degradadas em contato com o fungo *A. nomius* (ENT22); (D) Gongilídeo do *L. gongylophorus* (FF2006) degradado em contato com o *A. nomius* (ENT22)



L: *L. gongylophorus* (FF2006); P: *A.s nomius* (ENT19)

Fonte: Dados da pesquisa

4.4.3 Compostos orgânicos voláteis

O estudo dos compostos orgânicos voláteis (VOC's) produzidos pelas duas linhagens de fungos entomopatogênicos (*B. bassiana* (ENT13) e *I. farinosa* (ENT02)) assim como pela linhagem de *Escovopsis* sp. (ESC2), resultou em um total de 265 compostos. Destes, 154 foram secretados pelas linhagens cultivadas individualmente e 111 secretados durante o co-cultivo. Entre os compostos secretados em ambas as análises, estão principalmente ácidos, alcoóis, cetonas, benzenóides, ésteres e éteres. A seguir serão apresentados os compostos produzidos por cada linhagem individualmente e também em co-cultivo.

4.4.3.1 *Beauveria bassiana* (ENT13)

Após sete dias de crescimento individual da linhagem de *B.bassiana* (ENT13) as análises do GC/MS revelaram a produção de 14 VOC's, os quais estão representados na Tabela 2. Aos 14 dias de crescimento as análises revelaram a secreção de 23 VOC's (Tabela 3), sendo estes completamente distintos aos observados com sete dias. Ou seja, após 14 dias de crescimento, os compostos secretados aos sete dias desapareceram e um perfil completamente distinto de VOC's passou a ser secretado.

Tabela 2 - Análise dos compostos orgânicos voláteis produzidos por *B. bassiana* (ENT13) após sete dias de crescimento a 25°C sobre o meio PDA usando a fibra SPME

Nº	TR (min)	Possível Composto	Peso molecular	Fórmula molecular	Similaridade (%)
01	8.444	Benzoic acid, 2-amino-5-methyl	151	C ₈ H ₉ NO ₂	85
02	11.251	1-Octen-3-ol	128	C ₈ H ₁₆ O	96
03	14.908	2-Octenol	128	C ₈ H ₁₆ O	93
04	18.906	1-(Isopentyloxy)-1-methylsilane	172	C ₉ H ₂₀ OSi	70
05	21.605	Silane, trimethyl(1-methylbutoxy)	160	C ₈ H ₂₀ OSi	80
06	26.551	Silane, dimethyl(3-phenylprop-2-enyloxy)isobutoxy	264	C ₁₅ H ₂₄ O ₂ Si	63
07	26.551	Disiloxane, 1,1,3,3-tetramethyl-1,3-bis[3-oxiranylmethoxy]-propyl)	362	C ₁₆ H ₃₄ O ₅ Si	68
08	27.776	2-Oxiraneethanol, 2-t-butylmethylsilyloxymethyl-acetate	274	C ₁₃ H ₂₆ O ₄ Si	70

TR: Tempo de retenção

Fonte: Elaborado pela autora

Continuação

Nº	TR (min)	Possível Composto	Peso molecular	Fórmula molecular	Similaridade (%)
09	29.107	2-Oxiraneethanol, 2-t-butylmethylsilyloxymethyl-acetate	274	C ₁₃ H ₂₆ O ₄ Si	70
10	33.061	1-Trimethylsilyloxy-2-methyl-4-methoxybutane	190	C ₉ H ₂₂ O ₂ Si	64
11	37.155	Composto desconhecido			
12	37.394	Composto desconhecido			
13	37.762	3-Dioxy-d-manoic lactone	162	C ₆ H ₁₀ O ₅	75
14	33.771	Composto desconhecido			

TR: Tempo de retenção

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 3 - Análise dos compostos orgânicos voláteis produzidos por *B. bassiana* (ENT13) após 14 dias de crescimento a 25°C sobre meio o PDA usando a fibra SPME

Nº	TR (min)	Possível Composto	Peso molecular	Fórmula molecular	Similaridade (%)
01	6.915	Benzene, ethenyl	104	C ₈ H ₈	94
02	27.654	Composto desconhecido			
03	28.674	Composto desconhecido			
04	29.032	3-methyl-2-butanone, 4-t-butyltrimethylsilyloxy	216	C ₁₁ H ₂₄ O ₂ Si	67
05	33.038	Composto desconhecido			
06	33.391	1,3-Bis (trimethylsilyloxy) butane	234	C ₁₀ H ₂₆ O ₂ Si	61
07	33.560	2,5-Dihydroxy-1,4-dioxane, bis(tert-butyltrimethylsilyloxy)ether	348	C ₁₆ H ₃₆ O ₄ Si	70
08	34.216	Silane,[(1,1-dimethyl-2-propenyl)oxy]dimethyl	144	C ₇ H ₁₆ OSi	63
09	34.421	Alpha-D-Galactopyranose, 1,2,3-tris-O-(trimethyl)-,cyclic methylboranate	420	C ₁₆ H ₃₇ BO ₆	63
10	34.486	Isosorbide, bis(tert-butyltrimethylsilyloxy)ether	374	C ₁₈ H ₃₈ O ₄ Si	72
11	34.666	Silane,[(1,1-dimethyl-2-propenyl) oxy] dimethyl	144	C ₇ H ₁₆ OSi	73
12	36.389	Isosorbide, bis(tert-butyltrimethylsilyloxy)ether	374	C ₁₈ H ₃₈ O ₄ Si	72
13	36.597	Composto desconhecido			
14	38.129	Composto desconhecido			

TR: Tempo de retenção

Fonte: Elaborado pela autora

Continuação

Nº	TR (min)	Possível Composto	Peso molecular	Fórmula molecular	Similaridade (%)
15	38.497	Butane, 1,2,3-tris(trimethylsiloxy)	322	C ₁₃ H ₃₄ O ₃ Si	66
16	38.602	Alpha-D-Galactopyranoside, methyl2, 3-bis-O-(trimethylsilyl), cyclic phenyboronate	424	C ₁₉ H ₂₈ BO ₆	61
17	39.293	Composto desconhecido			
18	39.814	Isosorbide, bis(tert- buthyldimethylsilyl)ether	374	C ₁₈ H ₃₈ O ₄ Si	72
19	39.814	Isosorbide, bis(tert- buthyldimethylsilyl)ether	374	C ₁₈ H ₃₈ O ₄ Si	72
20	40.031	2,5-Dihydroxy-1,4-dioxane, bis(tert- buthyldimethylsilyl)ether	348	C ₁₆ H ₃₆ O ₄ Si	70
21	40.556	2,5-Dihydroxy-1,4-dioxane, bis(tert- buthyldimethylsilyl)ether	348	C ₁₆ H ₃₆ O ₄ Si	70
22	40.652	alpha-D-xylofuranose,1,2-O- isopropylidene-S-(t-butyldimethylsilyl)	304	C ₁₄ H ₂₈ O ₅ Si	61
23	41.313	2,5-Dihydroxy-1,4-dioxane, bis(tert- buthyldimethylsilyl)ether	348	C ₁₆ H ₃₆ O ₄ Si	70

TR: Tempo de retenção

Fonte: Elaborado pela autora

4.4.3.2 *Isaria farinosa* (ENT02)

O crescimento individual da linhagem de *I. farinosa* (ENT02) resultou em 15 compostos secretados com sete dias de crescimento (Tabela 4) e 31 compostos com 14 dias (Tabela 5). Entre esses, apenas o composto 2,4-Diamino-S-triazine estava presente em ambas às análises (Destaque nas Tabelas 4 e 5). Ainda, após 14 dias de crescimento, foram secretados vários ácidos graxos tais como o tetradecanoic acid, pentadecanoic acid, oleic acid, heptadecanoic acid e octadecanoic acid.

Tabela 4 - Análise dos compostos orgânicos voláteis produzidos por *I. farinosa* (ENT02) após sete dias de crescimento a 25°C sobre o meio PDA usando a fibra SPME

N°	TR (min)	Possível Composto	Peso molecular	Fórmula molecular	Similaridade (%)
01	10.213	Melamine	126	C ₃ H ₆ N ₆	80
02	10.308	2, 3, 3,4-Tetramethylpentane	128	C ₉ H ₂₀	81
03	18.026	Dioxolane, 2-ethyl-2-isopropyl-4,5-dimethyl	172	C ₁₀ H ₂₀ O ₂ Si	80
04	22.768	2,4-Diamino-S-triazine	111	C ₃ H ₅ N ₅	83
05	28.342	Allyl (2-tetrahydrofurylmethoxy) dimethylsilane	200	C ₁₀ H ₂₀ O ₂ Si	68
06	29.103	Palmitic acid, trimethylsilyl ester	328	C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si	70
07	30.817	Pentadecanoic acid, TMS ester	314	C ₁₈ H ₃₈ O ₂ Si	69
08	32.330	Composto desconhecido			
09	32.455	(4-Methoxy-2-methylbutoxy)	190	C ₉ H ₂₂ O ₂ Si	64
10	32.587	Composto desconhecido			
11	33.330	Composto desconhecido			
12	33.452	3-Dioxy-d-manoic lactone	162	C ₆ H ₁₀ O ₅	75
13	33.771	Composto desconhecido			
14	36.182	2-Butanol 3-(1,3-dimethylbutoxy)	174	C ₁₀ H ₂₂ O ₂	63
15	41.106	Cyclo (leucylpropyl)	210	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O	82

TR: Tempo de retenção

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 5 - Análise dos compostos orgânicos voláteis produzidos por *Isaria farinosa* (ENT02) após 14 dias de crescimento a 25°C sobre o meio PDA usando a fibra SPME

N°	TR (min)	Possível Composto	Peso molecular	Fórmula molecular	Similaridade (%)
01	4.762	Hexamethylcyclotrisiloxane	222	C ₆ H ₁₈ O ₃ Si ₃	75
02	6.848	Phenylethene	104	C ₈ H ₈	98
03	10.273	1,4-Dioxane-2,6-dimethanol	148	C ₆ H ₁₂ O ₄	78
04	19.463	2-Pyrazoline, 1-butyl-5-methyl	140	C ₈ H ₁₆ N ₂	82
05	23.101	2,4-Diamino-s-triazine	111	C ₃ H ₅ N ₂	82
06	25.308	DL-Proline, 5-oxo-, methyl ester	143	C ₆ H ₉ NO ₃	95
07	26.239	Composto desconhecido			
08	28.047	Composto desconhecido			

TR: Tempo de retenção

Fonte: Elaborado pela autora

Continuação

N°	TR (min)	Possível Composto	Peso molecular	Fórmula molecular	Similaridade (%)
09	28.690	delta-Guaiene	204	C ₁₅ H ₂₄	78
10	29.308	Tetradecamethylcycloheptasiloxane	518	C ₁₄ H ₄₂ O ₇ Si	78
11	30.492	Isosorbide, bis(tert-buthyldimethylsilyl)ether	374	C ₁₈ H ₃₈ O ₄ Si	72
12	30.792	Hexanoic acid, pentyl ester	186	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	65
13	32.367	4-Fluorobenzoic acid, 5-pentadecyl-ester	350	C ₂₂ H ₃₆ FO ₂	72
14	32.203	alpha-D-Galactopyranose,6-O-(trimethylsilyl)-cyclic 1,2,3,4-bis(methylboronate)	300	C ₁₁ H ₂₂ B ₂ O	65
15	33.406	Isosorbide, bis(tert-buthyldimethylsilyl)ether	374	C ₁₈ H ₃₈ O ₄ Si	72
16	33.577	Isosorbide, bis(tert-buthyldimethylsilyl)ether	374	C ₁₈ H ₃₈ O ₄ Si	72
17	34.212	2-Methoxy-2,3-dihydro-3-furancarbaldehyde	128	C ₆ H ₈ O ₃	74
18	34.491	alpha-D-Galactopyranose,6-O-(trimethylsilyl)-cyclic 1,2,3,4-bis(methylboronate)	300	C ₁₁ H ₂₂ B ₂ O	65
19	34.844	Composto desconhecido			
20	35.209	Composto desconhecido			
21	37.005	Composto desconhecido			
22	37.280	Tetradecanoic acid	228	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	95
23	37.752	Composto desconhecido			
24	38.317	Silane, dimethyl(3-phenylprop-2-enyloxy)isobutoxy	264	C ₁₅ H ₂₄ O ₂ Si	61
25	38.509	alpha-D-Galactopyranoside,methyl2,3-bis-O-(trimethylsilyl),cyclic methylboronate	424	C ₁₉ H ₃₃ BO ₆	63
26	39.813	Pentadecanoic acid	242	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	94
27	41.070	Trimethylsilyl-di(trimethylsiloxy)-silane	280	C ₉ H ₂₉ OSi ₄	61
28	41.747	Oleic acid	282	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	85
29	44.782	Heptadecanoic acid	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	89
30	46.781	Oleic acid	282	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	94
31	47.580	Octadecanoic acid	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	93

TR: Tempo de retenção

Fonte: Elaborado pela autora

4.4.3.3 *Escovopsis* sp. (ESC2)

O cultivo de *Escovopsis* sp. (ESC2) também apresentou uma grande secreção de ácidos graxos. Em ambos os cultivos, sete e 14 dias, ocorreu produção de pentadecanoic acid, tetradecanoic acid, hexadecanoic acid e octadecanoic acid. Ainda, no tempo de retenção de aproximadamente 39.300 minutos, ambos os cromatogramas GC/MS apresentaram o ácido graxo 1-Undecanol. No total, foram secretados 37 VOC's pela cultura com sete dias de crescimento (Tabela 6) e outros 34 pela cultura com 14 dias (Tabela 7). Os compostos em destaque representam aqueles secretados em ambos os períodos de cultivo.

Tabela 6 - Análise dos compostos orgânicos voláteis produzidos por *Escovopsis* sp. (ESC2) após sete dias de crescimento a 25°C sobre o meio PDA usando a fibra SPME

Nº	TR (min)	Possível Composto	Peso molecular	Fórmula molecular	Similaridade (%)
01	8.637	Oxime-, methoxy-phenyl	151	C ₈ H ₉ NO ₂	85
02	21.586	3-Methyl-2-butanone, 4-t-butyl dimethylsilyloxy	216	C ₁₁ H ₂₄ O ₂ Si	69
03	26.615	Dimethyl [bis (1-methylpropoxy)] silane	204	C ₁₀ H ₂₄ O ₂ Si	61
04	27.358	Trimethylsilyloxy-2-methyl-4-methoxybutane	180	C ₉ H ₂₂ O ₂ Si	60
05	27.530	alpha-D-Galactopyranoside, methyl2, 3-bis-O-(trimethylsilyl), cyclic phenylboronate	424	C ₁₉ H ₂₈ BO ₆	63
06	27.692	2,5-Dihydroxy-1,4-dioxane,bis(tert-butyl dimethylsilyl)ether	348	C ₁₆ H ₃₆ O ₄ Si	66
07	28.219	tert-Butyl dimethylsilyl 2-acetoxy acetate	232	C ₁₀ H ₂₀ O ₄ Si	61
08	28.733	Silane,dimethyl(2-methyl pen-3-yloxy)propoxy	218	C ₁₁ H ₂₆ O ₂ Si	67
09	29.098	2-Oxiraniethanol, 2t-butyl dimethyl oxymethyl	182	C ₆ H ₁₄ O ₆	75
10	30.824	1-Isobutoxy-1, 1, 2, 2,2-pentamethyl disilane	272	C ₉ H ₂₄ OSi ₂	60
11	31.652	Composto desconhecido			
12	32.461	1,2-Bis (trimethylsilyl) benzene	222	C ₁₂ H ₂₂ Si ₂	60
13	32.635	Composto desconhecido			
14	32.977	L-Arabinol	152	C ₅ H ₂₂ O ₅	63
15	35.677	Sorbitol	182	C ₆ H ₁₄ O ₆	75
16	36.083	Composto desconhecido			

TR: Tempo de retenção

Fonte: Elaborado pela autora

Continuação

N°	TR (min)	Possível Composto	Peso molecular	Fórmula molecular	Similaridade (%)
17	36.274	2-Methyl-1-pentamethyldisilyoxy propane	204	C ₉ H ₂₄ OSi	63
18	36.767	Composto desconhecido			
19	37.315	Tetradecanoic acid	228	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	95
20	38.339	Composto desconhecido			
21	38.535	Composto desconhecido			
22	38.653	2,2,4,4-Tetramethyl-6-oxacyclo (3.1.0) hexan-3-one	154	C ₉ H ₁₄ O ₂	73
23	38.874	Pentadecanoic acid	242	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	83
24	39.082	Composto desconhecido			
25	39.301	1-Undecanol	172	C ₁₁ H ₂₄ O	83
26	39.575	Octadecanoic acid	372	C ₂₂ H ₄₄ O ₄	67
27	39.834	Pentanoic acid	242	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	96
28	41.098	D-Ribose, 2-dioxy	134	C ₅ H ₁₀ O ₄	73
29	41.390	Sorbitol	182	C ₆ H ₁₄ O ₆	84
30	41.390	Sorbitol	182	C ₆ H ₁₄ O ₆	84
31	42.372	Hexadecanoic acid	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	94
32	43.736	Methyl 3,6-anhydrohexopyranoside	176	C ₇ H ₁₂ O ₅	81
33	44.110	Eicosanoic acid	312	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	81

TR: Tempo de retenção

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 7 - Análise dos compostos orgânicos voláteis produzidos por *Escovopsis* sp. (ESC2) após 14 dias de crescimento a 25°C sobre o meio PDA usando a fibra SPME

N°	TR (min)	Possível Composto	Peso molecular	Fórmula molecular	Similaridade (%)
01	4.726	1,3-Octadiene	110	C ₈ H ₁₄	73
02	16.596	Butyramide	87	C ₄ H ₉ NO	71
03	21.378	Acetic acid 7-benzyloxy-2,4-dimethyl-2,3-dihydro-1,9-dioxacyclopenta[b]naphthalen-9a-yl-ester	366	C ₂₂ H ₂₂ O ₅	76
04	26.592	1-Trimethylsilyloxy-2-methyl-4-methoxybutane	190	C ₉ H ₂₂ O ₂ Si	61
05	27.337	1-Trimethylsilyloxy-2-methyl-4-methoxybutane	190	C ₉ H ₂₂ O ₂ Si	61
06	27.505	1,4-Dioxane-2,5-bis[(trimethylsilyl)oxy]	264	C ₁₀ H ₂₄ O ₄ Si	63

TR: Tempo de retenção

Fonte: Elaborado pela autora

Continuação

N ^o	TR (min)	Possível Composto	Peso molecular	Fórmula molecular	Similaridade (%)
07	27.676	2,5-Dihydroxy-1,4-dioxane, bis (tert-buthyldimethylsilyl)ether	348	C ₁₆ H ₃₆ O ₄ Si	66
08	28.711	Silane, dimethyl(2-methylpent-3-yloxy)propoxy	218	C ₁₁ H ₂₆ O ₂ Si	67
09	31.638	L-Arabinitol	152	C ₅ H ₁₂ O ₅	63
10	31.771	Undecanoic acid	186	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	82
11	32.443	Composto desconhecido			
12	32.618	Composto desconhecido			
13	33.048	Composto desconhecido			
14	33.405	alpha-D-Galactopyranoside, methyl2, 3-bis-O-(trimethylsilyl), cyclic methylboronate	424	C ₁₉ H ₃₃ BO ₆	64
15	33.571	Isosorbide,bis(tert-buthyldimethylsilyl)ether	374	C ₁₈ H ₃₈ O ₄ Si	68
16	36.759	1-Undecanol	172	C ₁₁ H ₂₄ O	75
17	37.318	Tetradecanoic acid	228	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	96
18	38.343	6-Methyl-1-heptanol	130	C ₈ H ₁₈ O	70
19	38.643	Cyclo (leucycloprolyl)	210	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O	79
20	38.871	Pentadecanoic acid	242	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	88
21	39.069	Lauroyl peroxide	398	C ₂₄ H ₄₆ O ₄	79
22	39.295	1-Undecanol	172	C ₁₁ H ₂₄ O	79
23	39.846	Pentadecanoic acid	242	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	83
24	41.422	Cyclo (leucycloprolyl)	210	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O	84
25	41.501	Cyclo (leucycloprolyl)	210	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O	84
26	41.780	Petroselinic acid	282	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	90
27	42.381	n-Hexadecanoic acid	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	79
28	43.730	Nonadecanoic acid	298	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	80
29	44.100	Heptadecyl heptadecanoate	508	C ₃₄ H ₆₈ O ₂	85
30	44.631	Heptadecanoic acid	270	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	90
31	45.176	8-Methyl-1-decene	154	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	94
32	46.814	Oleic acid	282	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	95
33	47.618	Octadecanoic acid	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	93
34	48.201	Butanamide	87	C ₄ H ₉ NO	85

TR: Tempo de retenção

Fonte: Elaborado pela autora

4.4.3.4 Co-cultivo de *Beauveria bassiana* (ENT13) com *Escovopsis* sp. (ESC2)

Durante o co-cultivo das linhagens de *Beauveria bassiana* (ENT13) e *Escovopsis* sp. (ESC2) foram secretados 33 e 27 compostos, respectivamente com sete (Tabela 8) e 14 dias (Tabela 9). Entre estes, 18 VOC's (Tabela 7: n° 01, 02, 04, 05, 06, 13, 16, 17, 19 e 31; Tabela 8: n° 03, 08, 10, 11, 13, 18,19, 27 e 28) foram secretados apenas durante a interação. Além disso, assim como no item 4.4.1 (Figura 20), observou-se o rápido crescimento da colônia de *Beauveria bassiana* (ENT13) em comparação com os respectivos controles. Não foram observadas alterações morfológicas nas colônias.

Tabela 8 - Análise dos compostos orgânicos voláteis produzidos pelo co-cultivo de *Beuaveria bassiana* (ENT13) com *Escovopsis* sp. (ESC2) após sete dias de crescimento a 25°C sobre o meio PDA usando a fibra SPME

N°	TR (min)	Possível composto	Peso molecular	Fórmula molecular	Similaridade (%)
01	7.050	Styrene	104	C ₈ H ₈	87
02	23.125	2,4-Diamino-1, 3,5-triazine	111	C ₃ H ₅ N ₅	88
03	26.588	Composto desconhecido			
04	27.350	Heptadecanoic acid, 6-oxo, trimethylsilyl ester	216	C ₁₀ H ₂₀ O ₃ Si	61
05	27.502	4-Butylbenzotrile	159	C ₁₁ H ₁₃ N	62
06	27.671	beta-Alanine trimethylsilyl ester	161	C ₆ H ₁₅ NO ₂ Si	61
07	27.764	2-Oxiraneethanol, 2-t	274	C ₁₃ H ₂₆ O ₄ Si	70
08	28.524	tert-Butyldimethylsilyl acetate	174	C ₈ H ₁₈ O ₂ Si	70
09	34.686	alpha-D-Xylofuranose,1,2-o- isopropylidene-S	304	C ₁₄ H ₂₈ O ₅ Si	71
10	34.954	Isosorbide, bis(tert- butyldimethylsilyl)ether	374	C ₁₈ H ₃₈ O ₄ Si	70
11	35.218	2,5-Dihydroxy-1,4-dioxane, bis(tert- butyldimethylsilyl)ether	348	C ₁₆ H ₃₆ O ₄ Si	70
12	35.860	Composto desconhecido			
13	36.092	l-(+)-Lactic acid, tert-butyldimethylsilyl ester	204	C ₉ H ₂₀ O ₃ Si	71
14	36.400	Composto desconhecido			
15	36.613	Isosorbide, bis(tert- buthyldimethylsilyl)ether	374	C ₁₈ H ₃₈ O ₄ Si	64
16	36.741	2-Butanone 4-hydroxy-3- (hydroxymethyl)-3-methyl	132	C ₆ H ₁₂ O ₃	72
17	37.591	beta-Alanine trimethylsilyl ester	161	C ₆ H ₁₅ NO ₂ Si	61

TR: Tempo de retenção

Fonte: Elaborado pela autora

Continuação

Nº	TR (min)	Possível composto	Peso molecular	Fórmula molecular	Similaridade (%)
18	38.138	Composto desconhecido			
19	38.504	2,5-Dihydroxy-1,4-dioxane,bis(tert-butyl dimethylsilyl)ether	348	C ₁₆ H ₃₆ O ₄ S	67
20	38.612	Composto desconhecido			
21	39.298	Alpha-D-xylofuranose,1,2-O-isopropylidene-S-(t-butyl dimethylsilyl)	304	C ₁₄ H ₂₈ O ₅ S	63
22	39.689	,5-Dihydroxy-1,4-dioxane,bis(tert-butyl dimethylsilyl)ether	348	C ₁₆ H ₃₆ O ₄ S	64
23	39.824	,5-Dihydroxy-1,4-dioxane,bis(tert-butyl dimethylsilyl)ether	348	C ₁₆ H ₃₆ O ₄ S	68
24	40.157	Silane, trimethyl (1-methyldodecyloxy)	272	C ₁₆ H ₃₆ OSi	70
25	40.444	2,5-Dihydroxy-1,4-dioxane, bis(tert-butyl dimethylsilyl)ether	348	C ₁₆ H ₃₆ O ₄ Si	67
26	40.444	Composto desconhecido			
27	41.126	Composto desconhecido			
28	41.741	Oleic acid	282	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	90
29	42.280	n-Hexadecanoic	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	94
30	44.612	n-Decanoic acid	172	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	78
31	45.503	Acetamide, 2-cyano	84	C ₃ H ₄ N ₂ O	73
32	46.777	1-Hexadecanol	242	C ₁₆ H ₃₄ O	87
33	47.577	Octadecanoic acid	284	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	87

TR: Tempo de retenção

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 9 - Análise dos compostos orgânicos voláteis produzidos pelo co-cultivo de *Beauveria bassiana* (ENT13) com *Escovopsis* sp. (ESC2) após 14 dias de crescimento a 25°C sobre o meio PDA usando a fibra SPME

Nº	TR (min)	Possível Composto	Peso molecular	Fórmula molecular	Similaridade (%)
01	4.808	Styrene	104	C ₈ H ₈	95
02	18.898	Composto desconhecido			
03	21.403	tert-Butyl dimethylsilyl acetate	174	C ₈ H ₁₈ O ₂ Si	77
04	21.556	Composto desconhecido			
05	27.678	2,5-Dihydroxy-1,4-dioxane, bis(tert-butyl dimethylsilyl)ether	348	C ₁₆ H ₃₆ O ₄ Si	64
06	27.760	Oxiraneethanol, 2-t-butyl dimethylsilyloxymethy	274	C ₁₃ H ₂₆ O ₄ Si	75

TR: Tempo de retenção

Fonte: Elaborado pela autora

Continuação

Nº	TR (min)	Possível Composto	Peso molecular	Fórmula molecular	Similaridade (%)
07	28.652	Oxiraneethanol, 2-t-butyltrimethylsilyloxy	274	C ₁₃ H ₂₆ O ₄ Si	75
08	29.705	4-Phenylbutan-2-ol, trimethylsilyl ether	222	C ₁₈ H ₂₂ OSi	72
09	30.489	Isosorbide, bis(tert-butyltrimethylsilyl)ether	374	C ₁₈ H ₃₈ O ₄ Si	72
10	30.792	Diethyl 2,2-[ethane-1,2-diylbis(oxy)]diacetate	234	C ₁₀ H ₁₈ O ₆	69
11	31.054	2-Butanol, trimethylsilyl ether	146	C ₇ H ₁₈ OSi	70
12	31.251	n-Pentadecanoic acid, trimethylsilyl ester	314	C ₁₈ H ₃₈ O ₂ Si	70
13	33.385	Composto desconhecido			
14	33.551	Composto desconhecido			
15	34.209	2,5-Dihydroxy-1,4-dioxane, bis(tert-butyltrimethylsilyl)ether	348	C ₁₆ H ₃₆ O ₄ Si	65
16	34.414	2,5-Dihydroxy-1,4-dioxane, bis(tert-butyltrimethylsilyl)ether	348	C ₁₆ H ₃₆ O ₄ Si	63
17	34.678	3-Buten-2-ol, tert-butyltrimethylsilyl ether	186	C ₁₀ H ₂₂ OSi	71
18	34.978	1-Alamine ethylamide	116	C ₅ H ₁₂ N ₂ O	87
19	35.238	Composto desconhecido			
20	35.644	Composto desconhecido			
21	35.849	Composto desconhecido			
22	37.587	Isosorbide, bis(tert-butyltrimethylsilyl)ether	374	C ₁₈ H ₃₈ O ₄ Si	68
23	37.759	Composto desconhecido			
24	38.478	Butane, 1,2,3-tris(trimethylsiloxy)	322	C ₁₃ H ₃₄ O ₃ Si	
25	39.284	Composto desconhecido			
26	46.760	1-Dodecanol	186	C ₁₂ H ₂₆ O	77
27	47.554	n-Decanoic acid	172	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	78

TR: Tempo de retenção

Fonte: Elaborado pela autora

4.4.3.5 Co-cultivo de *Isaria farinosa* (ENT02) e *Escovopsis* sp. (ESC2)

A interação entre a linhagem de *I. farinosa* (ENT02) e *Escovopsis* sp. (ESC2) resultou na produção de 32 compostos após sete dias de co-cultivo (Tabela 10). Entre estes compostos, apenas dois, o Sorbitol e o L-Arabitól, já haviam sido secretados durante o cultivo individual da linhagem de *Escovopsis* sp. (ESC2). Os demais compostos foram secretados apenas

durante a interação. Mais uma vez foi observado o rápido crescimento da colônia de *I. farinosa* (ENT02) em comparação com os respectivos controles.

Após 14 dias de co-cultivo foram detectados 19 compostos (Tabela 11), sendo que 15 destes foram secretados apenas durante a interação. Os outros quatro compostos (n° 2, 6,7 e 13) já haviam sido secretados pelas linhagens em cultivo individual. Ainda, durante a interação, foi inibida a produção de compostos como o tetradecanoic acid, pentadecanoic acid, heptadecanoic acid, oleic acid e octadecanoic acid, os quais haviam sido secretados pelas linhagens durante 14 dias de crescimento individual.

Tabela 10 - Análise dos compostos orgânicos voláteis produzidos pelo co-cultivo de *I. farinosa* (ENT02) com *Escovopsis* sp. (ESC2) após sete dias de crescimento.

N°	TR (min)	Possível Composto	Peso molecular	Fórmula molecular	Similaridade (%)
01	6.795	Styrene	104	C ₈ H ₈	98
02	11.325	1-Octen-3-ol	128	C ₈ H ₁₆ O	90
03	15.534	Composto desconhecido			
04	20.744	Pyrazoline, 1-butyl-5-methyl	140	C ₈ H ₁₆ N ₂	76
05	21.605	1-Butyl (dimethyl) silyloxypropane	174	C ₉ H ₂₂ OSi	70
06	26.612	Composto desconhecido			
07	27.359	Composto desconhecido			
08	27.542	Composto desconhecido			
09	27.708	Cisisorbide,bis(ter-butyl dimethylsilyl) ether	374	C ₁₈ H ₃₈ O ₄ Si	70
10	29.712	Composto desconhecido			
11	30.158	Silane, trimethyl (1-methyldodecyloxy)	272	C ₁₆ H ₃₆ OSi	71
12	30.500	Composto desconhecido			
13	31.262	2-Oxovalenic acid,tertbutyldimethylsilylester	230	C ₁₁ H ₂₂ O ₃ Si	70
14	31.644	Galactitol	182	C ₆ H ₁₄ O ₆	76
15	32.042	Sorbitol	182	C ₆ H ₁₄ O ₆	81
16	32.462	l-Arabitol	152	C ₅ H ₁₂ O ₅	75
17	33.402	Composto desconhecido			
18	34.219	Composto desconhecido			
19	36.742	Butanoic acid	132	C ₆ H ₁₂ O ₃	71
20	36.814	Tetrahydro-3,4-furandiol	104	C ₄ H ₈ O ₃	72
21	36.999	Barsamide 115	103	C ₄ H ₁₃ N ₃	70

TR: Tempo de retenção

Fonte: Elaborado pela autora

Continuação

N°	TR (min)	Possível Composto	Peso molecular	Fórmula molecular	Similaridade (%)
22	37.102	Pentanoic acid	216	C ₁₁ H ₂₄ O ₂ Si	70
23	37.400	Silane, trimethyl (1-methyldodecyloxy)	272	C ₁₆ H ₃₆ OSi	73
24	37.764	Composto desconhecido			
25	37.886	Formic acid, ethenyl ester	72	C ₃ H ₄ O ₂	70
26	38.328	Composto desconhecido			
27	39.095	Composto desconhecido			
28	39.793	n-Decanoic acid	172	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	78
29	40.298	5-Isopropyl-2,4-imidazolidinedione	142	C ₆ H ₁₀ N ₂ O ₂	86
30	40.843	Betaine	117	C ₅ H ₁₁ NO ₂	77
31	44.252	Oxalic acid	188	C ₉ H ₁₆ O ₄	80
32	46.793	1-Hexadecanol	242	C ₁₆ H ₃₄ O	87

TR: Tempo de retenção

Fonte: Elaborado pela autora

Tabela 11 - Análise dos compostos orgânicos voláteis produzidos pelo co-cultivo de *Isaria farinosa* (ENT02) com *Escovopsis* sp. (ESC2) após 14 dias de crescimento a 25°C sobre o meio PDA usando a fibra SPME

N°	TR (min)	Possível Composto	Peso molecular	Fórmula molecular	Similaridade (%)
01	11.235	1-Octen-3-ol	128	C ₈ H ₁₆ O	90
02	12.922	Acetic acid, tert-butyl ester	116	C ₆ H ₁₂ O ₂	71
03	15.398	2-Propanoic acid, 2-methyl-,3-butyl ester	140	C ₈ H ₁₂ O ₂	80
04	15.701	Cyclotrisiloxane, hexamethyl	222	C ₆ H ₁₈ O ₃ Si ₃	89
05	19.140	4-(1,2-Dimethyl-2-cyclopenten-1-yl)-2-butanone	166	C ₁₁ H ₁₈ O	77
06	20.734	2-Pyrazoline, 1-isobutyl-3-methyl	140	C ₈ H ₁₆ N ₂	83
07	23.138	2,4-Diamino-1, 3,5-triazine	111	C ₃ H ₅ N ₅	87
08	26.576	Composto desconhecido			
09	28.842	2-Hexanol, tert-butyldimethylsilyl ether	216	C ₁₂ H ₂₈ OSi	70
10	29.026	3-Methyl-2-butanone, 4-t-butyldimethylsilyloxy	216	C ₁₁ H ₂₄ O ₂ Si	65
11	29.475	Composto desconhecido			
12	30.484	Composto desconhecido			
13	32.324	4-Fluorbenzoic acid oct-3-en-2yl ester	250	C ₁₅ H ₁₉ FO ₂	70

TR: Tempo de retenção

Fonte: Elaborado pela autora

Continuação

N°	TR (min)	Possível Composto	Peso molecular	Fórmula molecular	Similaridade (%)
14	33.395	beta-Alanine, trimethylsilyl ester	161	C ₆ H ₁₅ NO ₂ Si	61
15	33.555	Composto desconhecido			
16	33.974	2-Propanone, 1-cyclohexyl	140	C ₉ H ₁₆ O	72
17	34.217	1-Alanine, N-allyloxycarbonyl, isobutyl ester	229	C ₁₁ H ₁₉ NO ₄	73
18	34.407	2-Deoxy-D-ribose, tris (trimethylsilyl) ether	360	C ₁₄ H ₃₄ O ₄ Si	60
19	34.476	Composto desconhecido			

TR: Tempo de retenção

Fonte: Elaborado pela autora

4.5 Discussão

Os estudos realizados por Samson et al. (1988), Jaccoud et al. (1999) e Diehl-Fleig et al. (1991), assim como os resultados apresentados no Capítulo 1, demonstraram o potencial dos fungos entomopatogênicos no controle biológico de insetos, especialmente formigas cortadeiras. No entanto, não há estudos sobre a interação dos fungos entomopatogênicos com o fungo mutualista das formigas ou com o micoparasita especializado do gênero *Escovopsis*. Nos ensaios descritos no Capítulo 1, os fungos entomopatogênicos demonstraram um possível sinergismo com o micoparasita, uma vez que as subcolônias infectadas com os entomopatógenos e com a presença do *Escovopsis* entram em colapso em apenas seis dias experimentais. Além disso, as linhagens de *P. lilacinum* (ENT19) e *A. nomius* (ENT22) pareceram interferir negativamente na saúde do fungo mutualista, tanto em subcolônias como em colônias completas de *Atta sexdens rubropilosa*. Estes resultados impulsionaram o desenvolvimento dos ensaios presentes neste Capítulo.

Os resultados obtidos nos ensaios de co-cultivo demonstraram que tanto a linhagem de *P. lilacinum* (ENT19), quanto a de *A. nomius* (ENT22) inibiram o crescimento micelial do fungo mutualista. Além disso, foram observadas diferenças morfológicas pronunciadas durante o co-cultivo, tais como a degeneração no micélio do *L. gongylophorus* e alterações na coloração do meio de cultivo. Assim como observado para outros micoparasitas, tais como *Trichoderma* sp. e *Gliocladium* sp. (ORTIZ; ORDUZ, 2000) o contato entre os fungos pode estimular a secreção de metabólitos secundários, sendo estes os prováveis responsáveis pelo escurecimento do meio de cultivo. De acordo com o estudo de Score et al. (1997) e Peiris et al. (2008), o escurecimento do meio de cultivo e da cultura do *L. gongylophorus* (FF2006), observado na Figura 18, pode estar relacionado aos mecanismos de defesa do mesmo. Esses mecanismos envolvem a produção extracelular da enzima lacase (SCORE et al., 1997). Segundo White (1992) as lacases podem atuar na oxidação enzimática de substratos fenólicos e convertê-los em radicais livres, como as quinonas. As quinonas são instáveis e sofrem polimerização dando origem ao composto melanina ou outros compostos semelhantes. A melanina e seus derivados alteram a hidrofobicidade da parede celular fúngica. Esta alteração de hidrofobicidade atua como uma barreira de proteção que impede o contato com enzimas de degradação da parede celular produzidas pelo outro micro-organismo, no caso os fungos entomopatogênicos.

Especificamente em relação ao *A. nomius* (ENT22) este cresceu totalmente sobre a cultura do mutualista (Figura 18). Resultados similares foram obtidos nos estudos de Silva et

al. (2006) e Varanda-Haifig et al. (2016) utilizando linhagens de *Escovopsis* sp. e *Escovopsioides* sp., respectivamente. As micrografias eletrônicas de varredura demonstraram que o *A. nomius* (ENT22) causou uma aparente degradação da parede celular do fungo mutualista, a qual apresentou aspecto bastante poroso nas zonas de contato entre as linhagens (Figura 23C-D). Também no co-cultivo com a linhagem de *P. lilacinum* (ENT19), a parede celular dos gongilídeos apresentou aspecto rugoso e deteriorado (Figura 22C-D).

No entanto, nas micrografias eletrônicas de varredura não foram observadas estruturas especializadas de infecção (apressório e haustório). Estas são estruturas particularmente comuns em infecções por micoparasitas biotróficos (JEFFRIES, 1995). Desta maneira, o presente estudo sugere que os fungos *P. lilacinum* (ENT19) e *A. nomius* (ENT22) podem atuar como micoparasitas necrotróficos de contato. De acordo com Barnett (1964) e Goh e Vujanovic (2010) os fungos micoparasitas são caracterizados pela sua capacidade de utilizar outro fungo como fonte de nutrientes. No caso da linhagem de *A. nomius* (ENT22) é especialmente provável que este seja capaz de obter nutrientes a partir do fungo mutualista, uma vez que a Figura 12 (Capítulo 1) demonstra a capacidade deste fungo em crescer utilizando fragmentos do jardim de fungos como substrato.

Além disso, segundo Barnett (1964) e Jeffries e Young (1994) o micoparasitismo necrotrófico de contato se caracteriza pelo crescimento das hifas do parasita em associação com as do hospedeiro, sem haver penetração; a morte deste é causada pela produção de enzimas líticas que degradam a parede celular. Provavelmente foi o que ocorreu no presente estudo, pois em ambos os co-cultivos observou-se a deterioração de estruturas do hospedeiro.

Com relação aos ensaios envolvendo o *Escovopsis*, as quatro linhagens de fungos entomopatogênicos interferiram negativamente no crescimento do micoparasita. Tal resultado pode indicar que a presença de fungos entomopatogênicos no saueiro propicia o crescimento do micoparasita de forma indireta por causar a morte de operárias e, assim, reduzir os mecanismos de defesa do saueiro e não por outros mecanismos de interação entre os fungos. No entanto, é importante ressaltar que as linhagens de *B. bassiana* (ENT13) e *I. farinosa* (ENT02) apresentaram maior crescimento quando co-cultivadas com *Escovopsis*. O estímulo observado, provavelmente, está relacionado com a produção de compostos orgânicos voláteis (VOC's). Isto porque, o mesmo estímulo foi observado durante os ensaios em que a faixa central do meio de cultivo foi retirada, o que impede a difusão de compostos não voláteis através do meio.

Com relação aos VOC's secretados apenas durante o co-cultivo das linhagens, estudos anteriores (BRIARD et al., 2016) já demonstraram que a produção de VOC's por um micro-

organismo pode estimular o crescimento de outro micro-organismo co-cultivado. Briard et al. (2016) relataram que uma concentração de 1,0 ppm do composto dimethyl sulfide secretado pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* é capaz de estimular o crescimento do fungo *Aspergillus fumigatus*. Os autores sugerem que o estímulo deve-se ao fato do dimethyl sulfide servir como fonte de nutrientes e captação de enxofre. Contudo, no presente estudo, foram secretados apenas compostos ricos em nitrogênio, não sendo detectado nenhum composto contendo enxofre.

Além da interação entre micro-organismos, Lin et al. (2016) utilizou o perfil de VOC's secretado por *Arabidopsis thaliana* após a predação por pulgões, para verificar se os VOC's induzem o crescimento do fungo entomopatogênico *Lecanicillium lecanii*. O trabalho demonstrou que os VOC's secretados promovem um aumento significativo da germinação conidial e formação do tubo germinativo. Outros trabalhos também descrevem VOC's promovendo o crescimento de plantas, como *Arabidopsis thaliana* e *Lactuca sativa* (MINERDI et al., 2011; ANGEL CONTRERAS-CORNEJO et al., 2014).

Adicionalmente, o composto 1-Octen-3-ol, secretado durante o cultivo individual da linhagem de *B. bassiana* e durante o co-cultivo de *I. farinosa* (ENT02) e *Escopsis* sp. (ESC2) é descrito por Chitarra et al. (2005) como inibidor do desenvolvimento conidial da espécie *Penicillium paneum*. A alta concentração de conídios (concentrações superiores a 10^9 conídios/mL) parece desencadear a produção do 1-Octen-3-ol por *Penicillium paneum*. De acordo com Chirrata et al. (2004), o 1-Octen-3-ol inibe a formação do tubo germinativo.

O 1-Octen-3-ol também foi secretado pelas linhagens de fungos filamentosos mais virulentos à *Drosophila* no estudo realizado por Zhao et al. (2016), sendo eles as espécies *Aspergillus niger* e *Penicillium glabrum*. Além disso, Inamdar et al. (2010) também utilizando *Drosophila*, descreveram a morte de 100% das moscas após setes dias da exposição a este composto. Após 24 horas de exposição a baixas concentrações do 1-Octen-3-ol, as moscas apresentaram distúrbios de locomoção, diminuição do número de neurônios dopaminérgicos e inibição da metamorfose larval (INAMDAR et al., 2010). A alta toxicidade apresentada pelo 1-Octen-3-ol reforça o potencial patogênico da linhagem de *B. bassiana* (ENT13), bem como da combinação entre *I. farinosa* (ENT02) e *Escopsis* sp. (ESC02).

No entanto, o estudo dos VOC's ainda precisa avançar para que possamos conhecer sua estrutura química, e outras propriedades biológicas importantes, como a toxicidade ao ambiente. Além disso, vários desses compostos são detectados pelos equipamentos e ainda permanecem desconhecidos. Sendo assim, não é possível dizer qual ou quais compostos específicos são capazes de estimular o crescimento de micro-organismos. Ainda, o estímulo

observado pode ser devido ao conjunto de compostos produzidos, e não apenas a um composto particular.

Adicionalmente foram estudadas culturas individuais de *B. bassiana* (ENT13), *I. farinosa* (ENT02) e *Escovopsis* sp. (ESC2). Assim como observado no presente estudo, Piechulla et al. (2014) relataram que os principais compostos voláteis produzidos pelos fungos incluem alcoóis, benzenóides, aldeídos, alcenos, ácidos orgânicos, ésteres e cetonas.

Ácidos, alcoóis e também alguns compostos com função éter foram secretados pela linhagem de *Beauveria bassiana* (ENT13). O perfil de VOC's secretados também inclui os compostos de oito carbonos 1-Octen-3-ol e 2-Octenol, sendo estes característicos dos fungos filamentosos (CHEN et al., 1984; CHO et al., 2008). Já as linhagens de *I. farinosa* (ENT02) e *Escovopsis* sp. (ESC2), exibiram um perfil de VOC's predominantemente composto por ácidos graxos. O potencial bioinseticida de alguns ácidos graxos é reconhecido há décadas (QURAIISHI et al., 1965; DOM PEDRO, 1990). Com relação às formigas cortadeiras, os ácidos graxos já foram detectados na composição de extratos vegetais tóxicos às operárias de *Atta sexdens rubropilosa* (TAKAHASHI-DEL-BIANCO, 2002; BIGI et al., 2004). Além disso, o trabalho de Pagnocca et al. (1990) demonstrou que os ácidos graxos extraídos de *Sesamum indicum* (gergelim) inibem o fungo *L. gongylophorus*, mutualista das formigas Attini derivadas.

Entre os ácidos graxos secretados durante o período de crescimento individual das linhagens de *Isaria farinosa* (ENT02) e *Escovopsis* sp. (ESC2) e também durante o co-cultivo de *B. bassiana* (ENT13) e *Escovopsis* sp. (ESC2), os ácidos palmítico (Hexadecanoic acid), esteárico (Octadecanoic acid), oleico e nonadecanóico foram descritos como sendo tóxicos às formigas cortadeiras no estudo de Morini et al. (1999). No entanto, entre esses ácidos, apenas o nonadecanóico apresentou toxicidade na concentração de 30 mg. ml⁻¹, os demais ácidos necessitaram de uma concentrações acima de 100 mg.ml⁻¹ para serem tóxicos (MORINI et al., 1999). Estas evidências intensificam a potencialidade desses fungos no controle biológico das formigas cortadeiras e reforçam os resultados descritos no Capítulo 1, os quais demonstram que a linhagem de *Isaria farinosa* (ENT02), bem como a combinação *B. bassiana* (ENT13) e *Escovopsis* sp. (ESC2), são capazes de causar pronunciada mortalidade entre as operárias bem como o colapso do saueiro.

Além da compreensão das interações ecológicas entre os micro-organismos, o estudo dos compostos orgânicos voláteis pode proporcionar conhecimento sobre fontes naturais de compostos utilizados industrialmente. Por exemplo, o composto 3-Deoxy-d-mannonic lactone, secretado durante o crescimento individual da linhagem de *Isaria farinosa* (ENT02), possui

atividade antibacteriana, segundo Shobana et al. (2009). Além disso, o 3-Deoxy-d-mannoic lactone já foi descrito como sendo um dos principais compostos secretados pela planta *Clerodendrum viscosum*, utilizada pela medicina tradicional indiana no tratamento de diversas doenças, tais como doenças respiratórias e inflamações cutâneas (PANDA et al., 2015). Ainda, o composto styrene, produzido durante o co-cultivo de *Beauveria bassiana* (ENT13) e *Escovopsis* sp. (ESC2) é amplamente utilizado na produção de plásticos e resinas (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2010). O trabalho de Beck et al. (2008) relata a produção de styrene por uma linhagem de *Fusarium oxysporum* e reafirma a necessidade de buscar fontes renováveis deste monômero.

4.6 Conclusão

Os fungos entomopatogênicos *P. lilacinum* (ENT19) e *A. nomius* (ENT22), selecionados no Capítulo 1 como patógenos potenciais às formigas cortadeiras, possuem também natureza antagonista frente ao fungo mutualista *L. gongylophorus* causando a degradação de estruturas fúngicas como gongilídeos e hifas do mutualista. Desta maneira, interferem diretamente em ambos os organismos da relação simbiótica e representam patógenos potenciais ao desenvolvimento de bioinseticidas. Esses resultados são inéditos, uma vez que não há estudos utilizando fungos entomopatogênicos contra o fungo mutualista, e até o momento, estes eram analisados apenas quanto a mortalidade de operárias.

Ainda sobre o pioneirismo do presente estudo, este aborda pela primeira vez o perfil de compostos orgânicos voláteis secretados pelo fungo entomopatogênico *I. farinosa* e demonstra que este secreta ácidos graxos já descritos como tóxicos à formigas cortadeiras. Além disso, a pesquisa mostrou que os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* (ENT13) e *I. farinosa* (ENT02) comunicam-se com o micoparasita especializado do jardim de fungos através da secreção de compostos orgânicos voláteis, sendo que estes estimulam o crescimento dos fungos entomopatogênicos.

A partir destes resultados o presente trabalho sugere que os fungos *B. bassiana* (ENT13), *I. farinosa* (ENT02), *P. lilacinum* (ENT19) e *A. nomius* (ENT22) são efetivamente promissores no controle biológico das formigas cortadeiras e os estudos devem avançar no sentido de promover a utilização destes em escala de campo.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A prospecção de agentes para o biocontrole das formigas cortadeiras é uma linha de pesquisa importante dentro do contexto econômico, uma vez que as formigas causam perdas significativas na agricultura. Além disso, a busca por métodos que viabilizem o controle biológico é importante ao meio ambiente, já que os produtos químicos, atualmente utilizados, acumulam-se na natureza e não são biodegradados sob as condições ambientais. No presente trabalho exploramos os fungos entomopatogênicos, importantes patógenos a diversos insetos. Uma vez que a relação simbiótica estabelecida entre formigas e alguns fungos mutualistas não permite a sobrevivência dos mesmos separadamente, consideramos pertinente investigar se os fungos selecionados como potenciais patógenos às formigas causam danos adicionais ao fungo mutualista.

Nosso estudo permite concluir que as linhagens de *B. bassiana* (ENT13), *I. farinosa* (ENT02), *A. nomius* (ENT22) e *P. lilacinum* (ENT19) são particularmente promissoras ao desenvolvimento de bioinseticidas. Adicionalmente, a associação entre *B. bassiana* (ENT13) e *A. nomius* (ENT22) é especialmente patogênica ao saúveiro atuando contra formigas e fungo mutualista. Já a associação entre *B. bassiana* (ENT13) e *I. farinosa* (ENT02), apesar de não ter apresentado relação antagonista frente ao mutualista, causa acentuada mortalidade entre as formigas e assim, o jardim de fungos também acaba entrando em colapso. A linhagem de *P. lilacinum* (ENT19), demonstrou patogenicidade às formigas e também ao fungo mutualista; contudo, em associação com outros fungos entomopatogênicos não apresentou resultados expressivos e por isso, o seu método de utilização deve ser melhor estudado.

Vários compostos orgânicos voláteis também foram detectados durante os cultivos de *B. bassiana* (ENT13), *I. farinosa* (ENT02) e *Escovopsis* sp. (ESC2) e dos co-cultivos utilizando esses fungos. O estudo desses compostos revelou a presença de compostos inibidores e estimuladores de crescimento, toxinas (algumas descritas como prejudiciais às formigas cortadeiras e a outros insetos), além de compostos com aplicações industriais. Isto reforça o potencial patogênico dessas linhagens e aponta os fungos como fonte abundante de compostos de interesse industrial.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, J.; ZHANG, A.; ANGELI, S.; ABUBEKER, S.; MICHEL, C.; FENG, Y.; RODRIGUEZ-SAONA, C. Behavioral and antennal responses of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) to volatiles from fruit extracts. **Environmental Entomology**, v. 44, n. 2, p. 356-367, 2015.
- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In (Ed.) ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. São Paulo, 1998, 1163 p.
- AUGUSTIN, J. O.; DIEHL, E.; SAMUELS, R. I.; ELLIOT, L. Fungos parasitas de formigas-cortadeiras e de seu fungo mutualístico. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.) **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Ed. UFV, 2011, p. 284-310.
- AUGUSTIN, J. O., GROENEWALD, J. Z., NASCIMENTO, R. J., MIZUBUTI, E. S., BARRETO, R. W., ELLIOT, S. L.; EVANS, H. C. Yet more “weeds” in the garden: fungal novelties from nests of leaf-cutting ants. **PloS One**, v. 8, n. 12, p. e82265, 2013.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.3389-3402, 1997.
- BACCI JR., M.; RIBEIRO, S. B.; CASAROTTO, M. E. F.; PAGNOCCA, F. C. Biopolymer degrading bacteria from nest of leaf-cutting ant *Atta sexdens rufopilosus*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 28, n. 1, p. 79-82, 1995.
- BARCOTO, M. O.; PEDROSA, F.; BUENO, O. C.; RODRIGUES, A. Pathogenic nature of *Syncephalastrum* in *Atta sexdens rufopilosus* fungus gardens. **Pest Management Science**, 2016.
- BARNETT, H. L. Mycoparasitism. **Mycologia**, Lawrence, v. 56, p. 1-19, 1964.

- BARRETO, C. C.; STAATS, C. C.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Distribution of chitinases in the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and effect of N-acetylglucosamine in protein secretion. **Current Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 102-107, 2004.
- BEATTIE, A.J.; HUGHES, L. Ant-plant interactions. In: HERRERA, C.M.; PELLMYR, O. (Ed). **Plant-animal interactions: an evolutionary approach**. 2nd ed. Oxford: Blackwell Science, 2003. p. 211-235.
- BECK, J. J.; VANNETTE, R. L. Harnessing Insect-Microbe Chemical Communications to Control Insect Pests of Agricultural Systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2016.
- BECK, J.J.; MERRILL, G.B.; PALUMBO, J.D.; O'KEEFFE, T.L. Strain of *Fusarium oxysporum* Isolated from Almond Hulls Produces Styrene and 7-Methyl-1,3,5-cyclooctatriene as the Principal Volatile Components. **J Agric Food Chem**. doi: 10.1021/jf802570w, 2008.
- BIGI, M. F.; TORKOMIAN, V. L.; DE GROOTE, S. T.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P. C.; DA SILVA, M. F. G. Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) and ricinine against the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. **Pest Management Science**, v. 60, n. 9, p. 933-938, 2004.
- BRANDÃO, C.R.F.; MAYHÉ-NUNES, A.J.; SANHUDO, C.E.D. Taxonomia e filogenia das formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.) **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Ed. UFV, 2011, p. 27-48.
- BRIARD, B.; HEDDERGOTT, C.; LATGÉ, J.P. Volatile Compounds Emitted by *Pseudomonas aeruginosa* Stimulate Growth of the Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus*. **mBio**, v. 7, n. 2, p. e00219-16, 2016.
- BOARETTO, M. A. C.; FORTI, L. C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. **Série técnica IPEF**, v. 11, n. 30, p. 31-46, 1997.

BOLDO, J. T.; JUNGES, A.; DO AMARAL, K. B.; STAATS, C. C.; VAINSTEIN, M. H.; SCHRANK, A. Endochitinase CHI2 of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. **Current Genetics**, v. 55, n. 5, p. 551-560, 2009.

BOT, A. N. M.; REHNER, S. A.; BOOMSMA, J. J. Partial incompatibility between ants and symbiotic fungi in two sympatric species of *Acromyrmex* leaf-cutting ants. **Evolution**, v. 55, n. 10, p. 1980-1991, 2001.

BUENO, O. C.; MORINI, M. S. C.; PAGNOCCA, F. C. P.; HEBLING, J. A.; SILVA, O. A. Sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) isoladas do formigueiro e alimentadas com dietas artificiais. **An. Soc. Entomol. Brasil**, v. 26, n. 1, p. 107-113, 1997.

BUENO, O. C.; BUENO, F. C. Plantas inseticidas: perspectivas de uso no controle de formigas-cortadeiras In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.) **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Ed. UFV, 2011, p. 359-372.

BUTT, T. M.; COATES, C. J.; DUBOVSKIY, I. M.; RATCLIFFE, N. A. Chapter Nine- Entomopathogenic Fungi: New Insights into Host-Pathogen Interactions. **Advances in Genetics**, v. 94, p. 307-364, 2016.

CAFARO, S. C.; CURRIE, C. R. Phylogenetic analysis of mutualistic filamentous bacteria associated with fungus-growing ants. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, n.6, p. 441-446, 2005.

CAFARO, M. J., POULSEN, M., LITTLE, A. E., PRICE, S. L., GERARDO, N. M., WONG, B., ... & CURRIE, C. R. Specificity in the symbiotic association between fungus-growing ants and protective *Pseudonocardia* bacteria. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 278, n. 1713, p. 1814-1822, 2010.

CARDOSO, S. R.S. Morfogênese de ninhos iniciais de *Atta* spp. (Hymenoptera: formicidae), mortalidade em condições naturais e avaliação da ação de fungos entomopatogênicos. 2010.

CARRIÓN, G.; QUIROZ, L.; VALENZUELA, J. Hongos entomopatogenos de las hormigas arrieras *Atta mexicana* en México. **Rev. Mex. Micol**, v. 12, p. 41-48, 1996.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L-A. Host-Pathogen Interactions: Basic Concepts of Microbial Commensalism, Colonization, Infection, and Disease. **Infection and Immunity**. Washington, v.68., n. 12, p. 6511–6518, 2000.

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. 1691-1694, 1994.

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

CHEN, C.; MU, W.; ZHAO, Y.; LI, H.; ZHANG, P.; WANG, Q.; LIU, F. Biological activity of trans-2-hexenal against *Bradysia odoriphaga* (Diptera: Sciaridae) at different developmental stages. **Journal of Insect Science**, v. 15, n. 1, p. iev075, 2015.

CHEN, C. C.; WU, C. M. . Volatile components of mushroom (*Agaricus subrufecens*). **Journal of Food Science**, v. 49, n. 4, p. 1208-1209, 1984.

CHERRETT, J. M. The foraging behaviour of *Atta cephalotes* L. (Hymenoptera: Formidae). L. Foraging patterns and plant species attacked in tropical rain forest. **Journal of Animal Ecology**, v. 37, p. 387- 403, 1968.

CHITARRA, G.S.; ABEE, T.; ROMBOUTS, F.M.; POSTHUMUS, M.A.; DIJKSTERHUIS, J. Germination of *Penicillium paneum* conidia is regulated by 1-octen-3-ol, a volatile self-inhibitor. **Appl. Environ. Microbiol.** 70, 2823–2829, 2004.

CHITARRA, G. S.; ABEE, T.; ROMBOUTS, F. M.; DIJKSTERHUIS, J.L. 1-Octen-3-ol inhibits conidia germination of *Penicillium paneum* despite of mild effects on membrane permeability, respiration, intracellular pH, and changes the protein composition. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 54, n. 1, p. 67-75, 2005.

CHO, I. H.; NAMGUNG, H. J.; CHOI, H. K.; KIM, Y. S. Volatiles and key odorants in the pileus and stipe of pine-mushroom (*Tricholoma matsutake* Sing.). **Food Chemistry**, v. 106, n. 1, p. 71-76, 2008.

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

CRESPO, R.; PEDRINI, N.; JUAREZ, M. P.; DAL BELLO, G. M. Volatile organic compounds released by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Microbiological Research**, v. 163, n. 2, p. 148-151, 2008.

CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, n. 7, p. 7998-8002, 1999a.

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

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

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

CURRIE, C. R.; WONG, B.; STUART, A.E; SCHUTZ, T. R.; REHNER, S. A.; MUELLER, U. G.; SUNG, G.H.; SPATAFORA, J. W.; STRAUS, N.A. Ancient tripartite coevolution in the attine ant-microbe symbiosis. **Science**, v. 299, n. 5605, p. 386-388, 2003.

DE FARIA, M. R.; WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, v. 43, n. 3, p. 237-256, 2007.

DELABIE, J. H.C. Novas opções para controle das formigas cortadeiras *Acromyrmex subterraneus brunneus* e *Atta sexdens sexdens* (Hymenoptera: Formicidae: Attini), na região cacauzeira da Bahia, Brasil. **Revista Agrotrópica**, v. 1, p. 173-180, 1989.

DELLA LUCIA T.M.C.; VILELA, E.F. Métodos atuais de controle e perspectivas. In: Della Lucia TMC (ed) **As formigas cortadeiras**. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil, pp 163–190, 1993.

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

DELLA LUCIA, T. M. C.; SOUZA, D. J. Importância e história de vida das formigas cortadeiras In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.) **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Ed. UFV, 2011,13-26.

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

DE SOUZA LOUREIRO, E.; MONTEIRO, A. C.. Patogenicidade de isolados de três fungos entomopatogênicos a soldados de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Árvore**, v. 29, n. 4, p. 553-561, 2005.

DIEHL-FLEIG, E.; LUCHESE, M. E. P. Reações comportamentais de operárias de *Acromyrmex striatus* (Hymenoptera: Formicidae) na presença de fungos entomopatogênicos. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 35, n. 1, p. 101-107, 1991.

DOMSCH KH, GAMS W, ANDERSON T-H. Compendium of soil fungi. v. 1. **Academic Press**, London, 1980.

DON PEDRO, K.N. Insecticidal activity of fatty acid constituents of fixed vegetable oils against *Callosobruchus maculatus* (F.) on cowpea. **Pesticide Science** 30: 295-302,1990.

EFFMERT, U.; KALDERÁS, J.; WARNKE, R.; PIECHULLA, B. Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. **Journal of chemical ecology**, v. 38, n. 6, p. 665-703, 2012.

ERTHAL Jr, M.; SILVA, C. P.; COOPER, R. M.; SAMUELS, R.I. Hydrolytic enzymes of leaf-cutting ant fungi. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 152, n. 1, p. 54-59, 2009.

ELANDT-JOHNSON, R., JOHNSON, N.L., 1980. **Survival models and data analysis**. John Wiley and Sons, New York.

ELLIS, M. B. **Dematiaceous Hyphomycetes**. Kew: Commonwealth Micological Institute, 1971. 608p.

FARAG, M. A.; ZHANG, H.; RYU, C.M. Dynamic chemical communication between plants and bacteria through airborne signals: induced resistance by bacterial volatiles. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, n. 7, p. 1007-1018, 2013.

FARJI-BRENER, A. G.; MEDINA, C. A. The Importance of Where to Dump the Refuse: Seed Banks and Fine Roots in Nests of the Leaf-Cutting Ants *Atta cephalotes* and *A. colombica*. **Biotropica**, v. 32, n. 1, p. 120-126, 2000.

FISHER, P. J.; STRADLING, D. J.; PEGLER, D. N. Leaf cutting ants, their fungus gardens and the formation of basidiomata of *Leucoagaricus gongylophorus*. **Mycologist**, v.8, n.3, p. 128-131, 1994.

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. 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.

FOWLER, H. G.; BERNARDI, J. V. E.; DELABIE, J. C.; FORTI, L. C.; PEREIRA-DA-SILVA, V. Major ant problems of South America. **Applied Myrmecology: A world perspective.**(Vander Meer, RK, Jaffe K. & Cedeño, A., eds.). Westview Press, Inc. Boulder, p. 3-14, 1990.

FOWLER, H. G. Patterns of colonization and incipient nest survival in *Acromyrmex niger* and *Acromyrmex balzani* (Hymenoptera: Formicidae). **Insectes Sociaux**, v. 39, n. 3, p. 347-350, 1992.

FRAZZON, A. P. G.; JUNIOR, I. D. S. V.; MASUDA, A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 94, n. 1, p. 117-125, 2000.

GENTHNER, F. J.; CRIPE, G. M.; CROSBY, D. J. Effect of *Beauveria bassiana* and its toxins on *Mysidopsis bahia* (Mysidacea). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 26, n. 1, p. 90-94, 1994.

GEORGE, J.; ROBBINS, P. S.; ALESSANDRO, R. T.; STELINSKI, L. L.; LAPOINTE, S. L. Formic and Acetic Acids in Degradation Products of Plant Volatiles Elicit Olfactory and Behavioral Responses from an Insect Vector. **Chemical Senses**, p. bjw005, 2016.

GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G.; de HOOG, G.S. Variability and molecular diagnostics of the neurotropic species *Cladophialophora bantiana*. **Studies in Mycology**, v.43, p.151-162, 1999.

GOFFRÉ, D.; FOLGARAIT, P. J. *Purpureocillium lilacinum*, potential agent for biological control of the leaf-cutting ant *Acromyrmex lundii*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 130, p. 107-115, 2015.

GOH, Y. K.; VUJANOVIC, V. *Sphaerodes quadrangularis* biotrophic mycoparasitism on *Fusarium avenaceum*. **Mycologia**, v. 102, n. 4, p. 757-762, 2010.

GOOSEY, E. R. **Towards understanding the fate of perfluoroalkyl compounds (PFCs) within urban environments: implications for human exposure.** 2010. Tese de Doutorado. University of Birmingham.

HALL, TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, pp.95-98, 1999.

HEIL, M. Indirect defence via tritrophic interactions. **New Phytologist**, v. 178, n. 1, p. 41-61, 2008.

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

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

HOOG, G.S.; QUEIROZ-TELLES, F.; HAASE, G.; FERNANDEZ-ZEPPEFELDT, G.; ANGELIS, D.A.; VAN DEN ENDE, A.; MATOS, T.; PELTROCHE-LLACSAHUANGA, H.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; RAINER, J.; RICHARD-YEGRES, N.; VICENTE, V.; YEGRES, F. Black fungi: clinical and pathogenic approaches. **Medical Mycology**, v.38, p.243-250, 2000.

HUGHES, W. O. H.; EILENBERG, J.; BOOMSMA, J. J. Trade-offs in group living: transmission and disease resistance in leaf-cutting ants. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 269, n. 1502, p. 1811-1819, 2002.

HUGHES, W. O. H.; BOOMSMA, J. J. Let your enemy do the work: within-host interactions between two fungal parasites of leaf-cutting ants. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 271, n. Suppl 3, p. S104-S106, 2004.

HUSSAIN, A.; TIAN, M. Y.; HE, Y. R.; LEI, Y. Y. Differential fluctuation in virulence and VOC profiles among different cultures of entomopathogenic fungi. **Journal of invertebrate pathology**, v. 104, n. 3, p. 166-171, 2010.

INAMDAR, A. A.; MASUREKAR, P.; BENNETT, J. W. Neurotoxicity of fungal volatile organic compounds in *Drosophila melanogaster*. **Toxicological Sciences**, p. kfq222, 2010.

INGLIS, P. W.; TIGANO, M. S. Identification and taxonomy of some entomopathogenic *Paecilomyces* spp.(Ascomycota) isolates using rDNA-ITS sequences. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 1, p. 132-136, 2006.

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

JEFFRIES, P. Biology and ecology of mycoparasitism. **Can. J. Bot.**, v. 73, n.1, p.S1284-s1290, 1995.

JEŠOVNIK, A.; GONZÁLEZ, V. L.; SCHULTZ, T. R. Phylogenomics and Divergence Dating of Fungus-Farming Ants (Hymenoptera: Formicidae) of the Genera *Sericomyrmex* and *Apterostigma*. **PloS One**, v. 11, n. 7, p. e 0151059, 2016.

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.

KNAPP, J. J.; JACKSON, C. W.; HOWSE, P. E.; VILELA, E. F. Mandibular gland secretions of leaf-cutting ants: role in defense against alien fungi. In: **CONGRESS OF THE INTERNATIONAL UNION FOR THE STUDY OF SOCIAL INSECTS**, n. 12, 1994. Paris. Proceedings...Paris: Univ. Paris, 1994, p. 109.

KUSNEZOV, N. Zoogeografía de las hormigas de Sudamérica. **Acta Zoologica Lilloana**, v. 21, p. 123-251, 1964.

LACERDA, F. G.; DELLA LUCIA, T. M. C.; SOUZA, D. J. Biologia comportamental das operárias do lixo das colônias de formigas-cortadeiras In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.) **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Ed. UFV, 2011, p. 226-235.

LEMFACK, M. C.; NICKEL, J.; DUNKEL, M.; PREISSNER, R.; PIECHULLA, B. mVOC: a database of microbial volatiles. **Nucleic acids research**, v. 42, n. D1, p. D744-D748, 2014.

LIU, B.; TZENG, Y.. Development and applications of destruxins: A review. **Biotechnology Advances**, N° 30, pp. 1242–1254, 2012.

LIU, H.; XIE, L.; WANG, J.; GUO, Q.; YANG, S.; LIANG, P.; ... ZHANG, L. The Stress-responsive and host-oriented role of nonribosomal peptide synthetases in an entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. **Journal of microbiology and biotechnology**, 2016.

LITTLE, A. E. F.; MURAKAMI, T.; MUELLER, U. G.; CURRIE, C. R. Defending against parasites: fungus-growing ants combine specialized behaviours and microbial symbionts to protect their fungus gardens, **Biol. Lett.**, v. 2, n.5, p. 12–16, 2006.

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.

MACHADO, V.; DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M. D.; LUCCHESI, M. D. P. Reações observadas em colônias de algumas espécies de *Acromyrmex* (Hymenoptera-Formicidae) quando inoculadas com fungos entomopatogênicos. **Ciência e Cultura**, v. 40, n. 11, p. 1106-1108, 1988.

MASIULIONIS, V. E.; CABELLO, M. N.; SEIFERT, K. A.; RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F. C. *Escovopsis trichodermoides* sp. nov., isolated from a nest of the lower attine ant *Mycocepurus goeldii*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 107, n. 3, p. 731-740, 2015.

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

MEIRELLES, L. A., MONTOYA, Q. V., SOLOMON, S. E., & RODRIGUES, A. New Light on the Systematics of Fungi Associated with Attine Ant Gardens and the Description of *Escovopsis kreiselii* sp. nov. **PLoS One**, v. 10, n. 1, p. e0112067, 2015a.

MEIRELLES, L. A.; SOLOMON, S. E.; BACCI, M.; WRIGHT, A. M.; MUELLER, U. G.; RODRIGUES, A. Shared *Escovopsis* parasites between leaf-cutting and non-leaf-cutting ants in the higher Attine fungus-growing ant symbiosis. **Open Science**, v. 2, n. 9, p. 150257, 2015b.

MITHÖFER, A.; MAFFEI, M. E. General Mechanisms of Plant Defense and Plant Toxins. In: **Plant Toxins**. Springer, 2016. p. 1-22.

MOHAMMADI, S.; SOLTANI, J.; PIRI, K. Soilborne and invertebrate pathogenic *Paecilomyces* species show activity against pathogenic fungi and bacteria. **Journal of Crop Protection**, v. 5, n. 3, p. 377-387, 2016.

MÖLLER, A. Die Pilzgärten einiger südamerikanischer Ameisen. **Botanische Mitteilungen aus den Tropen**, v.6, p. 1–127, 1893.

MÖLLER, 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**, v. 20, n. 22, p. 6115-6116, 1992.

MOREIRA, D. D.O.; ERTHAL JUNIOR, M.; SAMUELS, R. I. Alimentação e digestão em formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.) **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Ed. UFV, 2011, p. 204-226.

MORINI, M.S.C.; BUENO, O.C.; HEBLING, M.J.A.; PAGNOCCA, F.C.; BACCI JUNIOR, M.; FERNANDES, J.B.; VIEIRA, P.C. Ação tóxica de ácidos graxos misturados a um triglicerídeo, sobre operárias de *Atta sexdens* L. (Hymenoptera, Formicidae). **Naturalia** 24: 327, 1999.

MUCHOVEJ, J. J.; DELLA LUCIA, T. M. *Escovopsis*, a new genus from leaf cutting ant nests to replace *Phialocladus nomem invalidum*. **Mycotaxon**, 1990.

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

MUELLER, U. G.; SCHULTZ, T. R.; CURRIE, C. R.; ADAMS, R. M.; MALLOCH, D. The origin of the attine ant-fungus mutualism. **Quarterly Review of Biology**, p. 169-197, 2001.

MUELLER, U. G.; SCOTT, J. J.; ISHAK, H. D.; COOPER, M.; RODRIGUES, A. Monoculture of leafcutter ant gardens. **PLoS One**, v. 5, n. 9, p. e12668, 2010.

PADULLA, L. F. L. **Estudo de fungos entomopatogênicos para o controle de ninfas do psilídeo *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae)**. 2007. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz.

PAGNOCCA, F. C.; DA SILVA, O. A.; HEBLING-BERALDO, M. J.; BUENO, O. C.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. Toxicity of sesame extracts to the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. **Bulletin of Entomological Research**, v. 80, n. 03, p. 349-352, 1990.

PAGNOCCA, F. C.; CARREIRO, S. C.; BUENO, O. C.; SANTANA, A.; CAPELARI, M. RAPD analysis of the sexual state and sterile mycelium of the fungus cultivated by the leaf-cutting and *Acromyrmex hispidus fallax*. **Mycological Research**, v. 105, n. 2, p. 173-176, 2001.

PAGNOCCA, F. C.; RODRIGUES, A.; NAGAMOTO, N. S.; BACCI JR, M. Yeasts and filamentous fungi carried by the gynes of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 94, n. 4, p. 517-526, 2008.

PAGNOCCA, F. C.; RODRIGUES, A.; BACCI JUNIOR, M. Micro-organismos associados às formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.) **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Ed. UFV, 2011, p. 262-283.

PAGNOCCA, F. C.; MASIULIONIS, V. E.; RODRIGUES, A. Specialized fungal parasites and opportunistic fungi in gardens of attine ants. **Psyche**, v. 12, p. 1-9, 2012.

PANDA, P.; RATH, M.; PAL, A.; SHARMA, T.; DAS, D. GC-MS analysis of bioactive compounds in the methanol extract of *Clerodendrum viscosum* leaves. **Pharmacognosy research**, v. 7, n. 1, p. 110, 2015.

- PEÑUELAS, J.; ASENSIO, D.; THOLL, D.; WENKE, K.; ROSENKRANZ, M.; PIECHULLA, B.; SCHNITZLER, J. P. Biogenic volatile emissions from the soil. **Plant, Cell & Environment**, v. 37, n. 8, p. 1866-1891, 2014.
- PEDRAS, M.S.; ZAHARIA, L.I.; WARD, D.E. The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. **Phytochemistry**, N° 59 , pp.579–596, 2002.
- PIECHULLA, B.; DEGENHARDT, J. The emerging importance of microbial volatile organic compounds. **Plant, Cell & Environment**, v. 37, n. 4, p. 811-812, 2014.
- PINTO, A. P. F.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; WENZEL, I. M. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* ao psilídeo *Diaphorina citri* e compatibilidade do fungo com produtos fitossanitários. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 47, n. 12, p. 1673-1680, 2012.
- QUILAN, R. J.; CHERRETT, J. M. The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.). **Ecol. Entomol.**, v. 4, n.2, p. 151-160, 1979.
- QURAIISHI, M. S.; THORSTEINSON, A. J. Toxicity of some straight chain saturated fatty acids to house fly larvae. **Journal of Economic Entomology**, v. 58, n. 3, p. 400-402, 1965.
- 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**, v. 96, n. 5, p. 955–959, 2004.
- RIBEIRO, M. M.; AMARAL, K. D.; SEIDE, V. E.; SOUZA, B. M.; DELLA LUCIA, T.; KASUYA, M. C. M.; DE SOUZA, D. J. Diversity of fungi associated with *Atta bisphaerica* (Hymenoptera: Formicidae): the activity of *Aspergillus ochraceus* and *Beauveria bassiana*. **Psyche: A Journal of Entomology**, v. 2012, 2012.
- RODRIGUES, A.; SILVA, A.; FORTI, L. C.; PAGNOCCA, F. C. Filamentous fungi found on foundress queens of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 134, n. 4, p. 342-345, 2010.

RODRIGUES, A.; BACCI JR, M.; MUELLER, U. G.; ORTIZ, A.; PAGNOCCA, F. C.

Microfungal “weeds” in the leafcutter ant symbiosis. **Microbial Ecology**, v. 56, n. 4, p. 604-614, 2008.

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.

RUIZ-SANCHEZ, E.; ORCHARD, I.; LANGE, A.B.. Effects of the cyclopeptide mycotoxin destruxin A on the Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus* (Stål). **Toxicon**, N° 55, pp. 1162–1170, 2010.

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.

SAMPAIO, J. P.; GADANHO, M.; SANTOS, S.; DUARTE, F. L.; PAIS, C.; FONSECA, A.; FELL, J. W. Polyphasic taxonomy of basidiomycetous yeasts genus *Rhodosporidium*: *Rhodosporidium kratochvilovae* and related anamorphic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.687-697, 2001.

SAMSON, R. A.; Harry, C. E.; LATGÉ, J. P. **Atlas of entomopathogenic fungi**. Springer-Verlag GmbH & Co. KG, 1988.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C. **Introduction to food-airborne fungi**. 6th ed., Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2004.

SARKAR, N.; KARMAKAR, A.; BARIK, A. Volatiles of *Solena amplexicaulis* (Lam.) Gandhi Leaves Influencing Attraction of Two Generalist Insect Herbivores. **Journal of Chemical Ecology**, v. 42, n. 10, p. 1004-1015, 2016.

SCHMID-HEMPEL, Paul. **Parasites in social insects**. Princeton University Press, 1998.

SCHOCH, C. L.; SEIFERT, K. A.; HUHNDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J. L.; LEVESQUE, C. A.; ...; MILLER, A. N. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 16, p. 6241-6246, 2012.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1267-1274, 2010.

SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 14, p. 5435-5440, 2008.

SEIFERT, K.A.; SAMSON, R.A.; CHAPELA, I.H. *Escovopsis aspergilloides*, a rediscovered hyphomycete from leaf-cutting ant nests. **Mycologia** 87: 407–413, 1995.

SHOBANA, S.; VIDHYA, V. G.; RAMYA, M. Antibacterial activity of garlic varieties (*Ophioscordon* and *Sativum*) on enteric pathogens. **Current Research Journal of Biological Sciences**, v. 1, n. 3, p. 123-126, 2009.

SILVA-PINHATI, A. C. O.; BACCI JUNIOR, M.; HINKLE, G.; SOGIN, M.L.; PAGNOCCA, F. C.; MARTINS, V. G.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. Low variation in ribosomal DNA and internal transcribed spacers of the symbiotic fungi of leaf-cutting ants (Attini: Formicidae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 10, p. 1463-1472, 2004.

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

SIQUEIRA, C. G.; BACCI JUNIOR, M.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. Metabolism of Plant Polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the Symbiotic Fungus of the Leaf-Cutting Ant *Atta sexdens* L. **Applied and environmental microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4820-4822, 1998.

- SOLOMON, S. E.; BACCI JUNIOR, M.; MARTINS JUNIOR, J.; VINHA, G. V.; MUELLER, R. G. Paleodistributions and comparative molecular phylogeography of leafcutter ants (*Atta* spp.) provide new insight into the origins of Amazonian diversity. **PLoS One**, v. 2, n. 3, p. 1-15, 2008.
- STEENBERG, T.; HUMBER, R. A. Entomopathogenic Potential of *Verticillium* and *Acremonium* species (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 73, n. 3, p. 309-314, 1999.
- 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.
- 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.
- SUN, B. D.; YU, H. Y.; CHEN, A. J.; LIU, X. Z. Insect-associated fungi in soils of field crops and orchards. **Crop Protection**, v. 27, n. 11, p. 1421-1426, 2008.
- 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. **Proc. R. Soc. Lond. B.**, v. 274, p. 1971-1978, 2007.
- TAKAHASHI-DEL BIANCO, M. **Toxicidade de extratos orgânicos foliares de *Canavalia ensiformis* L. E de alguns princípios ativos de inseticidas comerciais para operárias de *Atta sexdens* L.**, 1758 (Hymenoptera: Formicidae), isoladas do formigueiro. Doctor Thesis. UNESP, Rio Claro, SP, Brazil. Pp. 174. 2002.
- U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. TOXICOLOGICAL PROFILE FOR STYRENE. Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2010, Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp53.pdf>> Acesso em: 05 nov. 2016.

VARANDA-HAIFIG, S. S.; ALBARICI, T. R.; NUNES, P. H.; HAIFIG, I.; VIEIRA, P. C.; RODRIGUES, A. Nature of the interactions between hypocrealean fungi and the mutualistic fungus of leaf-cutter ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, p. 1-13, 2016.

VEGA, F. E. et al. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. **Fungal Ecology**, v. 2, n. 4, p. 149-159, 2009.

VON REUß, S. H.; KAI, M.; PIECHULLA, B.; FRANCKE, W. Octamethylbicyclo [3.2. 1] octadienes from the Rhizobacterium *Serratia odorifera*. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 11, p. 2009-2010, 2010.

XU, Y. et al. Biosynthesis of the cyclooligomer depsipeptide beauvericin, a virulence factor of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Chemistry & Biology**, v. 15, n. 9, p. 898-907, 2008.

ZAMUNÉR, C.F.C. **Biocontrole de formigas-cortadeiras utilizando o fungo *Escovopsis***. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, 2015, 39 f. Trabalho de Conclusão de Curso.

ZHAO, G.; YIN, G.; INAMDAR, A. A.; LUO, J.; ZHANG, N.; BUCKLEY, B.; & BENNETT, J. W. Volatile organic compounds emitted by filamentous fungi isolated from flooded homes after Hurricane Sandy show toxicity in a *Drosophila* bioassay. **Indoor Air**, 2016.

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

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.