UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)

ESCOVOPSIOIDES NIVEA (*ASCOMYCOTA: HYPOCREALES*): ANTAGONISTA DE FUNGOS CULTIVADOS PELAS FORMIGAS ATÍNEAS

TATIANE DE CASTRO PIETROBON

Rio Claro – SP
2022

ESCOVOPSIOIDES NIVEA (*ASCOMYCOTA: HYPOCREALES*): ANTAGONISTA DE FUNGOS CULTIVADOS PELAS FORMIGAS ATÍNEAS

TATIANE DE CASTRO PIETROBON

Tese apresentada ao Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia).

Orientador: Prof. Dr. André Rodrigues

Co-orientador: Dr. Pepijn Wilhelmus Kooij

Rio Claro – SP
2022

P626e

Pietrobon, Tatiane de Castro

Escovopsioides nivea (Ascomycota: Hypocreales): antagonista de fungos cultivados pelas formigas atíneas / Tatiane de Castro Pietrobon. -- Rio Claro, 2022

74 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientador: Andre Rodrigues

Coorientador: Pepijn Wilhelmus Kooij

1. Simbiose. 2. Interação fungo-fungo. 3. Diversidade. 4. Inibição. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ESCOVOPSIOIDES NIVEA (ASCOMYCOTA: HYPOCREALES): ANTAGONISTA DE FUNGOS CULTIVADOS PELAS FORMIGAS ATÍNEAS

AUTORA: TATIANE DE CASTRO PIETROBON
ORIENTADOR: ANDRÉ RODRIGUES
COORIENTADOR: PEPIJN WILHELMUS KOOIJ

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ANDRÉ RODRIGUES (Participaçao Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro

Profa. Dra. JANAINA BRANDÃO SEIBERT (Participaçao Virtual)
Departamento de Química / Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dr. CAIO AMBROSIO LEAL DUTRA (Participaçao Virtual)
Departamento de Biologia – Seção de Ecologia e Evolução / Universidade de Copenhagen

Profa. Dra. DAIANE CRISTINA SASS (Participaçao Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro

Prof. Dr. MAURICIO BACCI JUNIOR (Participaçao Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro

Rio Claro, 01 de abril de 2022

Aos que amo, com todo meu coração,

por todo incentivo e amor;

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, pois ele sempre é minha força e meu refúgio, principalmente em tempos difíceis, que recentemente passamos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Rodrigues, pela oportunidade, por todos os ensinamentos e paciência.

Ao meu co-orientador Dr. Pepijn W. Kooij, pela ajuda indispensável nos artigos e por sempre me apresentar uma perspectiva diferente.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro ao Auxílio Temático (processo nº 2012/25299-6), para desenvolvimento deste estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

À Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Câmpus de Rio Claro, docentes, funcionários e todos do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia).

À Profa. Dra. Simone Possedente Lira (Laboratório de Microbiologia e Química Orgânica de Produtos Naturais) e sua estudante, Naydja Moralles Maimone, pelo auxílio nos experimentos e orientação na elaboração do segundo capítulo da tese.

Aos meus colegas do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF), Maria, Aryel, Amanda, Laura, Enzo, Bianca, Luciana, Mariana, por todo aprendizado trocado e muitas risadas, ao qual tornaram essa jornada mais leve.

Ao meu colega de laboratório, Quimi, por participar e me ajudar no meu primeiro capítulo, e por todo ensinamento.

Também ao meu colega de laboratório, Rodolfo, por toda parceria, por projetos conjuntos paralelos, por toda paciência em me ajudar com a estatística, afinal somos um time.

Aos que já passaram pelo LESF, Lorena, Morgana, Irina, Bia, Mary, Bruna, Karina, Ariane, que nunca me esquecerei pois foram importantes no meu aprendizado, pessoal e profissional.

Ao Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial (LAMAI), laboratório vizinho por muito tempo, pelo aprendizado em uma área diferente, conversas e confraternizações, que fizeram os meus dias mais felizes.

A todos meus amigos da Pós-Graduação, que juntos sobrevivemos a dois Simpósios de Microbiologia Aplicada.

Às minhas parceiras de moradia, Elisa e Camila, por serem minha família em Rio Claro.

A todos amigos que fiz em Rio Claro, que foram importantes para minha saúde mental e, no caso especialmente da Ariane, saúde física também.

À minha família, que é meu aconchego, obrigada pelo apoio, eu amo muito vocês.

Ao meu noivo, Luis Filipe, que esteve ao meu lado me apoiando, animando, dando forças, sempre disposto a conversar, obrigada por todo amor e carinho, eu amo muito você.

E, por último, ao meu filho de quatro patas, Boris, que é minha alegria, pelo companheirismo e amor incondicional.

“Ser resiliente significa ser flexível, mas possuir autoconfiança.
Saber aprender com a atitude dos outros,
sem perder a própria essência!”

Marcello Cotrim

RESUMO

Interações entre organismos são comuns na natureza e responsáveis por manter o equilíbrio dos ecossistemas. O mutualismo entre as formigas atíneas e fungos é um exemplo clássico de simbiose. Esses insetos cultivam o parceiro fúngico como fonte de alimento, e este recebe proteção, além de ser disperso pelas formigas. Ambos os organismos co-evoluíram levando à formação de cinco diferentes tipos de fungiculturas. Um antagonista alvo de estudo desse sistema é o fungo do gênero *Escovopsis*, considerado parasita do fungo cultivado pelas formigas. Estudos revelaram que esse fungo coevoluiu com o sistema e que o parasitismo é mediado por substâncias químicas. Fungos do gênero *Escovopsioides*, filogeneticamente relacionados a *Escovopsis*, também são encontrados nas colônias das formigas atíneas. *Escovopsioides* é um possível antagonista do fungo mutualista das atíneas, entretanto, pouco se conhece sobre a diversidade filogenética e o real papel desse fungo no ambiente das formigas atíneas. Os objetivos do presente estudo foram descrever a diversidade e o papel de *Escovopsioides* na interação das formigas atíneas com o fungo cultivado. Como poucos isolados desse fungo são conhecidos, ampliamos as amostragens desse gênero com coletas de jardins de fungo de formigas atíneas em diferentes localidades do país. Os isolados obtidos foram identificados por sequenciamento genético. Nosso estudo sugere que apenas uma espécie de *Escovopsioides*, *E. nivea*, está associada ao ambiente das formigas atíneas como um simbionte. Em seguida, bioensaios de co-cultivo foram realizados entre *E. nivea* e os fungos mutualistas de quatro, dentre cinco, diferentes tipos de fungiculturas das formigas atíneas. Bioensaios semelhantes foram utilizados para analisar os metabólitos envolvidos nessas interações. Nossos resultados demonstraram que *E. nivea* é um antagonista, pois inibe o crescimento de diversos fungos cultivados pelas atíneas. É possível metabólitos difundidos no meio de cultivo sejam os responsáveis pelo antagonismo observado, entretanto, outros fatores também podem estar envolvidos, como substâncias voláteis e/ou competição por nutrientes.

Palavras-chaves: Simbiose. Interação fungo-fungo. Diversidade. Inibição.

ABSTRACT

Interactions between organisms are common in nature and play an important role in ecosystem maintenance. The mutualism between attine ants and fungi is a textbook example of a mutualistic symbiosis. These insects cultivate their fungal partner for food and in turn they provide the fungus protection, growth substrate, and the means of dispersal. Both organisms coevolved in an association that led to five fungiculture types. A known antagonist of this system is the fungal genus *Escovopsis*, often considered a parasite of the attine fungal cultivars. This fungus co-evolved with the system and this interaction is mediated by metabolites. Fungi in the genus *Escovopsioides* are phylogenetically close-related to *Escovopsis* and are also found in colonies of attine ants. *Escovopsioides* is a possible antagonist of the fungal cultivars, however, little is known about the phylogenetic diversity and its role in the attine ant environment. Here, we describe the diversity and ecological role of *Escovopsioides* within the attine ant-fungal mutualism. We carried out collections of fungus gardens of attine ants to expand the sampling of the genus. These obtained isolates were identified by DNA sequencing. Our study suggests that only one *Escovopsioides* species, *E. nivea*, is associated with the attine ant environment as a symbiont. Then, dual-culture bioassays were performed between *E. nivea* and the mutualistic fungi of four out of five different fungicultural types of the attine ants. Similar bioassays were used to analyze the metabolites involved in these interactions. Our findings showed that *E. nivea* inhibits the growth of several fungi cultivated by attines and can, therefore, be considered an antagonist. Our results also suggest the antagonism may occur by metabolites diffused in the culture medium, but other factors may also be involved, such as volatile compounds and/or competition for nutrients by this fungus.

Keywords: Symbiosis. Fungal-fungal interaction. Diversity. Inhibition.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 11
2 OBJETIVOS 13
2.1 Geral 13
2.2 Específicos 13
3 CONTEXTUALIZAÇÃO DA TESE 14
4 REFERÊNCIAS 15
5 CAPÍTULO I 19
Abstract 20
Introduction 21
Material and methods 23
Fungal cultures 23
Phylogeny of *Escovopsioides* isolates 24
Assessing the specificity of *Escovopsioides nivea* towards fungal cultivars of attines 25
Dual-culture assays 26
Results 26
Escovopsioides nivea presence in fungus gardens of attine ants 26
Lack of preference of *E. nivea* towards fungi cultivated by attine ants 27
Apterostigma cultivars inhibit the growth of *E. nivea* 28
Escovopsioides nivea inhibits the growth of fungal cultivars 28
Discussion 29
Conclusions 31
Acknowledgments 31
Declaration of competing interest 32
References 32
Supplementary material 44
6 CAPÍTULO II 51
RESUMO 52
INTRODUÇÃO 53
MATERIAL E MÉTODOS 54
Microrganismos utilizados 54
Isolamento de *Myrmecopterula nudihortorum* 55
Inibição de *Escovopsioides nivea* por *Myrmecopterula nudihortorum* 56
Bioensaios de co-cultivo para estudo dos metabólitos 57
Extração dos metabólitos 57
Extratos brutos incorporados no meio de cultivo 57
Análise dos extratos por espectrometria de massa 58

SUMÁRIO

Testes de atividade fungicida ou fungistática 59
Análise microscópica da interação 59
RESULTADOS 59
Myrmecopterula nudihortorum RBI03 inibe *E. nivea* 59
Efeito fungistático das interações 60
Fungos mutualistas utilizam metabólitos solúveis para inibir *E. nivea* 60
Estruturas microscópicas de *E. nivea* apresentam alterações na área de inibição 61
Análise metabolômica 61
DISCUSSÃO 61
CONCLUSÕES 64
REFERÊNCIAS 64
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS 74

1 INTRODUÇÃO

Interações entre organismos são comuns na natureza e algumas são consideradas simbioses. Quando a simbiose traz benefícios recíprocos para os organismos envolvidos, denomina-se de mutualismo. Por outro lado, quando a relação é negativa para um dos parceiros, esta é chamada de parasitismo, em alguns casos (DOUGLAS, 2010). Essas interações compreendem mecanismos físicos e químicos, sendo o último envolvendo metabólitos solúveis ou substâncias voláteis (BARKA et al., 2016).

Um exemplo clássico de interação inseto-fungo é o das formigas da subtribo Attina (i.e., as atíneas), insetos conhecidos por praticarem fungicultura. Nesse mutualismo, as formigas fornecem proteção e substrato vegetal para o desenvolvimento de um fungo basidiomiceto (*Basidiomycota*: *Agaricales*), enquanto este é a principal fonte de alimento das larvas e da rainha (WEBER, 1972). Essa interação originou-se há cerca de 65 milhões de anos, o que permitiu a coevolução das atíneas com o fungo, levando a cinco diferentes tipos de fungiculturas (SCHULTZ; BRADY, 2008; BRANSTETTER et al., 2017), saber: (1) fungicultura das atíneas basais, praticada por atíneas que utilizam substrato vegetal seco, carcaças e fezes de insetos (DE FINE LICHT; BOOMSMA, 2010), para o cultivo do fungo do gênero *Leucocoprinus* (MUELLER et al., 1998); (2) fungicultura de fungos corais, praticada pela maioria das formigas do gênero *Apterostigma*, que cultivam fungos da família *Pterulaceae* (DENTINGER et al., 2009) e utilizam substratos vegetais secos para o cultivo do fungo; (3) fungicultura de leveduras, praticada por formigas do grupo *Cyphomyrmex rimosus*, que cultivam fungos da tribo *Leucocoprineae* na forma de levedura (MUELLER et al., 1998; SCHULTZ; BRADY, 2008); (4) fungicultura das atíneas derivadas, praticada pelas formigas dos gêneros *Mycetomoellerius*, *Paratrachymyrmex*, *Sericomyrmex*, *Trachymyrmex* e *Xerolitor*, que utilizam substrato vegetal fresco e/ou seco para o cultivo de *Leucoagaricus* (SOLOMON et al., 2019); (5) fungicultura de formigas cortadeiras, praticada pelos gêneros *Acromyrmex*, *Amoimyrmex* e *Atta* (CRISTIANO et al., 2020), utilizam folhas e flores frescas para cultivar *Leucoagaricus gongylophorus* (SCHULTZ; BRADY, 2008).

O parceiro fúngico das formigas é cultivado em uma estrutura denominada “jardim de fungo”. Este é composto pelo micélio do fungo e o substrato vegetal coletado pelas formigas. O fungo apresenta um arsenal enzimático capaz de hidrolisar os polímeros vegetais presentes no substrato, liberando oligossacarídeos que utiliza como alimento. Portanto, no jardim de fungo há nutrientes disponíveis e que podem ser utilizados por outros microrganismos, tais como fungos filamentosos, leveduras e bactérias (BARCOTO et al., 2020; CURRIE et al., 1999;

CURRIE, 2001; PAGNOCCA et al., 2012). Esses microrganismos podem competir com o fungo mutualista das formigas por recursos, mas também podem protegê-lo contra patógenos ou até mesmo não ocasionarem nenhum impacto no desenvolvimento do jardim (RODRIGUES et al., 2008; CURRIE, 2001; PAGNOCCA; RODRIGUES; BACCI, 2011).

Bactérias parecem desempenhar um papel importante na proteção do jardim. As formigas estabeleceram uma associação com actinobactérias do gênero *Pseudonocardia*, localizadas em diferentes partes da cutícula desses insetos (CURRIE, et al., 1999; CALDERA; CURRIE, 2012; MARSH et al., 2013; LI et al., 2018). É sabido que *Pseudonocardia* secreta substâncias antimicrobianas que atuam na proteção contra fungos antagonistas do jardim (CURRIE, et al., 1999). O gênero *Burkholderia* é outro exemplo de bactéria que atua na defesa. Encontradas no jardim de fungo, esses microrganismos também produzem compostos antimicrobianos que inibem o crescimento de antagonistas (FRANCOEUR et al., 2021).

Fungos do gênero *Escovopsis* (*Ascomycota: Hypocreales*) são exemplos de antagonistas nos jardins de fungo das atíneas. *Escovopsis* provoca um impacto negativo no desenvolvimento do jardim, consequentemente retardando o crescimento das colônias (CURRIE, 2001) e, eventualmente, levando-as à morte. *Escovopsis* também compartilha uma história evolutiva antiga com o ambiente das formigas atíneas, o que sugere que esse fungo coevoluiu com as formigas e o fungo cultivado (CURRIE, 2001; CURRIE et al., 2003). Estudos revelaram que o parasitismo de *Escovopsis* envolve substâncias químicas (shearininas e cicloartropsona), que inibem o crescimento do parceiro fúngico das atíneas (FOLGARAIT; MARFETÁN; CAFARO, 2011; VARANDA-HAIFIG et al., 2017; BOYA et al., 2017; DHODARY et al., 2018).

Além de *Escovopsis*, fungos do gênero *Escovopsioides* também são encontrados nas colônias das formigas atíneas. O próprio nome do fungo já sugere uma semelhança morfológica com *Escovopsis*, pois o sulfixo "*oides*" significa "semelhante a". Ambos, pertencem à ordem *Hypocreales* e são filogeneticamente relacionados. Até então, somente uma espécie foi descrita: *Escovopsioides nivea* (AUGUSTIN, et al., 2013), porém limitado à apenas uma área geográfica (Viçosa-MG). Estudos sugerem que *E. nivea* também é um possível antagonista do fungo mutualista das atíneas, porém com algumas diferenças, quando comparado com *Escovopsis* (VARANDA-HAIFIG et al., 2017; OSTI; RODRIGUES, 2018). Nesses estudos, o gênero *Escovopsioides* apresentou uma baixa infectividade em experimentos *in vitro* e *in vivo* em subcolônias de formigas cortadeiras (atíneas derivadas), quando comparado com *Escovopsis* (OSTI; RODRIGUES, 2018). Embora sugerido como um antagonista, pouco se conhece sobre a diversidade filogenética e o real papel de *Escovopsioides* no ambiente das formigas atíneas.

Tal lacuna no conhecimento sobre a diversidade e a biologia de *Escovopsioides* foi a motivação de realizar o presente estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Descrever a diversidade e o papel do fungo *Escovopsioides* no ambiente das formigas atíneas.

2.2 Específicos

a) Descrever a diversidade e ocorrência de *Escovopsioides* em diferentes formigas atíneas.
b) Detalhar a interação entre *Escovopsioides* e os fungos cultivados pelas formigas atíneas.
c) Descobrir se a interação é mediada por metabólitos solúveis em meio de cultivo.
d) Determinar o perfil de metabólitos secundários de *Escovopsioides* e dos fungos mutualistas, quando em co-cultivo.

3 CONTEXTUALIZAÇÃO DA TESE

O Capítulo I compreende os objetivos específicos a e b. Para alcançar o primeiro objetivo específico, foram realizadas coletas de jardins de fungo de formigas atíneas, o que proporcionou dez isolados adicionais do gênero *Escovopsioides*, dentre aqueles apresentados no trabalho de Osti e Rodrigues (2018); totalizando 30 isolados. Todos os isolados foram sequenciados para os marcadores filogenéticos *rpb*1, *rpb*2 e *tef*1, os quais não haviam sido sequenciados no estudo de Osti e Rodrigues (2018). Para alcançar o segundo objetivo específico, bioensaios de co-cultivo foram realizados entre *E. nivea* e os fungos mutualistas de quatro, dentre cinco, diferentes tipos fungiculturas das formigas atíneas.

Os resultados dos dois primeiros objetivos foram reunidos no artigo: "*Escovopsioides nivea* is a non-specific antagonistic symbiont of ant-fungal crops", publicado na *Fungal Ecology* (https://doi.org/10.1016/j.funeco.2022.101140). Nosso artigo sugere que: (i) *E. nivea* é uma espécie bastante difundida em jardins de formigas atíneas, (ii) está associada ao ambiente desses insetos como um simbionte e (iii) é um possível antagonista do sistema, com baixa preferência aos fungos cultivados (PIETROBON et al., 2022).

O Capítulo II compreende os objetivos específicos c e d. Para alcançarmos esses objetivos, analisamos as interações entre um isolado de *E. nivea* e dois fungos mutualistas, pertencentes à fungiculturas distintas. Com intuito de saber se há metabólitos envolvidos na interação, foram obtidos extratos do meio de cultivo em culturas pareadas entre *E. nivea* e os fungo mutualistas. Tanto *E. nivea*, quanto os fungos mutualistas foram cultivados em meios contendo os extratos. Embora não observamos inibição dos fungos mutualistas na presença dos extratos, o crescimento de *E. nivea* foi inibido, sugerindo que metabólitos difundidos no meio sejam os responsáveis por essa atividade. Entretanto, como discutido no Capítulo II, suspeitamos que essa inibição pode estar relacionada a outros fatores, tais como a presença de substâncias voláteis (não avaliadas no presente estudo), competição por nutrientes, produção de enzima, ou uma combinação desses.

Análises metabolômicas com os extratos de *E. nivea* estão em andamento. Tal fato ocorreu devido às dificuldades de acesso ao laboratório durante a pandemia da COVID-19, juntamente com problema técnico no UPLC-qTOF-MS/MS, equipamento utilizado no projeto. Para essas análises, contamos com a colaboração da Profa. Dra. Simone Possedente de Lira (Laboratório de Microbiologia e Química Orgânica de Produtos Naturais, da ESALQ/USP), juntamente com o Grupo de Química Orgânica de Sistemas Biológicos, do Instituto de Química de São Carlos (IQSC/USP).

4 REFERÊNCIAS

AUGUSTIN, J. O.; GROENWALD, J. Z.; NASCIMENTO, R. J.; MIZBURTI, E. S. G.; BARRETO, R. W.; ELLIOT, S. L.; EVANS, H. C. Yet more "weeds" in the gardens: fungal novelties from nests of leaf-cutting ants. **Plos One**, v. 8, n. 9, p. e82265, 2013.

BARCOTO, M. O.; CARLOS-SHANLEY, C.; FAN, H.; FERRO, M.; NAGAMOTO, N. S.; BACCI, M. JR.; CURRIE, C. R.; RODRIGUES, A. Fungus-growing insects host a distinctive microbiota apparently adapted to the fungiculture environment. **Scientific Reports**, v. 10, n. 12384, 2020.

BARKA, E. A.; VATSA, P.; SANCHEZ, L.; GAVEAU-VAILLANT, N.; JACQUARD, C.; KLENK, H.-P.; CL´EMENT, C.; OUHDOUCH, Y.; VAN WEZEL, G. P. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, p.1–43, 2016.

BOYA, C. A.; FERNÁNDEZ-MARÍN, H.; MEJÍA, L. C.; SPADAFORA, C.; DORRESTEIN, P. C.; GUTIERREZ, M. Imaging mass spectrometry and MS/MS molecular networking reveals chemical interactions among cuticular bacteria and pathogenic fungi associated with fungus-growing ants. **Scientific Reports**, v. 7, n 5604, 2017.

BRANSTETTER, M. G.; JEŠOVNIK, A.; SOSA-CALVO, J.; LLOYD, M. W.; FAIRCLOTH, B. C.; BRADY, S. G.; SCHULTZ, T. R. Dry habitats were crucibles of domestication in the evolution of agriculture in ants. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 284, n. 20170095, 2017.

CALDERA, E. J.; CURRIE, C. R. The population structure of antibiotic-producing bacterial symbionts of *Apterostigma dentigerum* ants: impacts of coevolution and multipartite symbiosis. **The American Naturalist**, v. 180, n. 5, p. 604–607, 2012.

CRISTIANO, P. M.; CARDOSO, D. C.; SANDOVAL-GÓMES, V. E.; SIMÕES-GOMES, F. C. *Amoimyrmex* Cristiano, Cardoso & Sandoval, gen. nov. (Hymenoptera: Formicidae): a new genus of leaf-cutting ants revealed by multilocus molecular phylogenetic and morphological analyses. **Austral Entomology**, v. 59, n. 4, p. 643–676, 2020.

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

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

CURRIE, C. R.; WONG, B.; STUART, A. E.; SCHULTZ, T. R.; REHNER, S. A.; MUELLER, U. G.; SUNG, GI-HO; 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 FINE LICHT, H. H.; BOOMSMA, J. J. Forage collection, substrate preparation, and diet composition in fungus-growing ants. **Ecological Entomology**, v. 35, n. 3, p. 259–269, 2010.

DENTINGER, B. T. M.; LODGE, D. J.; MUNKACSI, A. B.; DESJARDIN, D. E.; MCLAUGHLIN, D. J. Phylogenetic placement of an unusual coral mushroom challenges the classic hypothesis of strict coevolution in the *Apterostigma pilosum* group ant–fungus mutualism. **Evolution**, v. 63, n. 8, p. 2172–2178, 2009.

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

DOUGLAS, A. E. The significance of symbiosis. *In:* **The symbiotic habit**. 1st edn. Princeton University Press, New York, pp. 1–23, 2010.

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

FRANCOEUR, C. B.; MAY, D. S.; THAIRU, M. W.; HOANG, D. Q.; PANTHOFER, O.; BUGNI, T. S.; PUPO, M. T.; CLARDY, J.; PINTO-TOMÁS, A. A.; CURRIE, C. R. *Burkholderia* from fungus gardens of fungus-growing ants produces antifungals that inhibit the specialized parasite *Escovopsis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 87, n. 14, p. e00178-21, 2021.

LI, H.; SOSA-CALVO, J.; HORN, H. A.; PUPO, M. T.; CLARDY, J.; RABELING, C.; SCHULTZ, T. R.; CURRIE, C. R. Convergent evolution of complex structures for ant–bacterial defensive symbiosis in fungus-farming ants. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 115, n. 42, p. 10720–10725

MARSH, S. E.; POULSEN, M.; GOROSITO, N. B.; PINTO-TOMÁS, A. A.; MASIULIONIS, V. E.; CURRIE, C. R. Association between *Pseudonocardia* symbionts and *Atta* leaf-cutting ants suggested by improved isolation methods. **International Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 17–25, 2013.

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

OSTI, J. F.; RODRIGUES, A. *Escovopsioides* as a fungal antagonist of the fungus cultivated by leafcutter ants. **BMC Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 130, 2018.

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

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

PIETROBON, T. C.; KOOIJ, P. W.; MONTOYA, Q. V.; RODRIGUES, A. *Escovopsioides nivea* is a non-specific antagonistic symbiont of ant-fungal crops. **Fungal Ecology**, v. 56, p. 101140, 2022.

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.

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

SOLOMON, S. E.; RABELING, C.; SOSA-CALVO, J.; LOPES, C. T.; RODRIGUES, A.; VASCONCELOS, H. L.; BACCI JR. M.; MUELLER, U. G.; SCHULTZ, T. R. The molecular phylogenetics of *Trachymyrmex* Forel ants and their fungal cultivars provide insights into the origin and coevolutionary history of ‘higher-attine’ ant agriculture. Systematic Entomology, v. 44, n. 4, p. 939–956, 2019.

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**, v. 110, n. 4, p. 593–605, 2017.

WEBER, N. A. The fungus-culturing behavior of ants. **American Zoologist**, v. 12, n. 3, p. 577–587, 1972.

CAPÍTULO I

Escovopsioides nivea is a non-specific antagonistic symbiont of ant-fungal crops

Manuscrito publicado na revista: **Fungal Ecology**, v. 56, n. 4, p. 101140, 2022

DOI: https://doi.org/10.1016/j.funeco.2022.101140

5 CAPÍTULO I

Escovopsioides nivea is a non-specific antagonistic symbiont of ant-fungal crops

Tatiane de Castro Pietrobon[1], Pepijn Wilhelmus Kooij[1], Quimi Vidaurre Montoya[1], Andre Rodrigues[1*] andre.rodrigues@unesp.br

[1]Department of General and Applied Biology, São Paulo State University (UNESP), Rio Claro, Brazil.

Running title: *Escovopsioides nivea* – fungal cultivar interactions

*Corresponding author. São Paulo State University (UNESP), Department of General and Applied Biology, Avenida 24-A, n. 1515, Rio Claro, SP, Zip code: 13.506-900, Brazil.

Abstract

Fungus-growing attine ants maintain a mutualistic relationship with basidiomycete fungi they cultivate for food. In addition to the fungal partner, attine ant colonies harbor a myriad of microorganisms, including the genus *Escovopsis*, fungal parasites of the ant crops. Because *Escovopsioides nivea* is phylogenetically close to *Escovopsis*, previous studies assumed it has a negative interaction in the ant-fungus association. Here, we present an extended phylogeny of *E. nivea* based on new collections from different attine ant genera found in different localities. We also carried out co-culture experiments between *E. nivea* with different fungal cultivars. Our results suggest *E. nivea* is a symbiont of attine ant colonies, which inhibits the growth of fungal crops, supporting the hypothesis it is antagonistic to the system. However, the patterns of interaction between *E. nivea* and fungal crops differ from those shown by *Escovopsis*, suggesting a different evolution from that of the parasite.

Keywords: Antagonism, inhibition, symbiosis, fungus-fungus interaction.

Introduction

When different species interact for a certain time, such associations can be considered symbiotic (Vega and Biedermann, 2020). Regardless the concept adopted for symbiosis, it is widely recognized these relationships stimulated the evolution and diversification of life (Ridley, 2004). Symbiotic associations can be understood as a continuum, where some are beneficial to the interacting organisms (i.e. mutualistic symbiosis) and others are harmful (e.g. parasitism). In this continuum, there is a growing consensus that the results of interactions depend on the complexity of these relationships and the context in which they are inserted (Weeks et al., 2007; Leung and Poulin, 2008; Douglas, 2010; Drew et al., 2021; Jiménez-Gómez et al., 2021). This is the case for many microbial parasites, i.e. parasites of fungi which evolved structural adaptations to that end, demonstrating specialization (Jeffries, 1995; Viterbo and Horwitz, 2010; Kubicek et al., 2011).

The attine ant-fungal association is a textbook example of symbiotic interactions involving many organisms. These insects grow fungi as food source for the colony (Weber, 1972) in a mutualistic relationship with the fungal partner. The ants bring substrate for nourishing the fungus and, in turn, the fungus is the sole source of nutrition, especially for the larvae (Weber, 1972; Schultz and Brady, 2008; Solomon et al., 2008). The ant-fungal interaction evolved appr. 55-65 million years ago and comprises five types of fungicultures. Although differing in many ecological aspects, attine ants cultivate a set of fungal taxa from the order *Agaricales*, characterizing: (1) Lower fungiculture: practiced by lower attines, which use dry plant substrate to cultivate fungi (De Fine Licht and Boomsma, 2010). These ants grow fungi from the tribe *Leucocoprineae*, in particular from the genus *Leucocoprinus* sp. (Mueller et al., 1998); (2) Coral fungiculture of (most) ants in the genus *Apterostigma*, that cultivate fungi from the family *Pterulaceae*, i.e. *Myrmecopterula nudihortorum* and *Myrmecopterula velohortorum* (Dentinger et al., 2009; Leal-Dutra et al., 2020); (3) Yeast fungiculture: ants from the *Cyphomyrmex rimosus* group that cultivate fungi in the tribe *Leucocoprineae* in a yeast form (Mueller et al., 1998; Schultz and Brady, 2008); (4) Higher fungiculture: the higher attine ants (genera *Mycetomoellerius*, *Paratrachymyrmex*, *Sericomyrmex*, *Trachymyrmex* and *Xerolitor*) use fresh and dry plant material for the cultivation of their fungal partner *Leucoagaricus* sp. (Solomon et al., 2019); (5) Fungiculture of leaf-cutting ants (genera *Acromyrmex*, *Amoimyrmex* and *Atta*; Cristiano et al., 2020), which use fresh leaves and flowers to cultivate *Leucoagaricus gongylophorus* (Schultz and Brady, 2008).

The ants cultivate the mutualist in fungus gardens, a structure consisting of plant material and fungal mycelia that is rich in nutrients. This nutritionally-rich environment attracts various microorganisms, mainly contaminants that potentially compete with the fungal crop (Currie et al., 1999; Currie, 2001; Rodrigues et al., 2008; Pagnocca et al., 2012). Among them, fungi in the genus *Escovopsis* are known to be prevalent in this environment and share an evolutionary history with the attines and their crops (Currie et al., 1999; Currie et al., 2003). *Escovopsis* is considered a parasite that attacks the mutualistic fungus (Folgarait et al., 2011; Marfetán et al. 2015), decreasing the biomass of fungus gardens as well as the number of workers and brood in young colonies (Currie et al., 1999; Currie, 2001). However, its effect on fungal crops is also context-dependent, i.e. in a healthy colony, *Escovopsis* may not overcome the defensive barrier and thus not cause infection (Jiménez-Gómez et al., 2021).

Taxonomic and systematic studies showed that *Escovopsis* comprises three phylogenetically related genera (Montoya et al., 2021), each with different patterns of interaction with the ant fungal cultivars (Birnbaum and Gerardo, 2016; Custodio and Rodrigues, 2018; Bizarria et al., 2020). From a host-parasite perspective, *Escovopsis* shows a pattern of host-specificity with the mutualistic fungi of each fungiculture having different *Escovopsis* species (Gerardo et al., 2006a,b; Birnbaum and Gerardo, 2016). However, these studies did not take the three major clades of fungi that were together named *Escovopsis* into consideration separately (Montoya et al., 2021). Therefore, studies on the coevolution between this parasite and the fungal cultivar need a better understanding considering the new taxonomic data. Even though *Escovopsis* has an increased growth in the presence of the native host fungus cultivar, this increase is absent when encountering another fungus cultivar or other species of agaricomycetes (Gerardo et al., 2004, 2006a).

The fungus *Escovopsioides nivea* is another example of a microorganism found in the fungus gardens of attine ants (Augustin et al., 2013; Reis et al., 2015; Osti and Rodrigues, 2018). In 1893, the mycologist Alfred Möller discovered the presence of *Escovopsioides* while studying colonies of attine ants in Santa Catarina, Brazil. At that time, he characterized the fungus as the weak form of fungal cultivar, with white mycelium that never turned brown, but similar to another culture, also white but stronger and turning brown after a while (known as *Escovopsis*, Möller, 1893). Much later, the currently sole species in this genus, *Escovopsioides nivea*, was formerly described by Augustin et al. (2013). This species is phylogenetically closely related and morphologically similar to *Escovopsis*, however, *E. nivea* differs in its terminal vesicles with long phialides (lageniform) and hyphae with aleuroconidia (Augustin et al., 2013).

Escovopsioides nivea presence has been reported for different genera of attine ants in several regions, with a prevalence ranging from 5% to 66% (Rodrigues et al., 2005 a,b; Rodrigues et al., 2008; Augustin et al., 2013; Reis et al., 2015; Pereira et al., 2016; Mendonça et al., 2021). Recent comparisons have revealed some differences between the ecological roles of *E. nivea* and *Escovopsis*. *E. nivea* showed low infectivity in plate assays and *in vivo* using sub-colonies, compared to *Escovopsis*, which showed high infectivity (Currie, 2001; Varanda-Haifig et al., 2017; Osti and Rodrigues, 2018). Therefore, previous studies hypothesized *E. nivea* as an antagonist, but differing from *Escovopsis* in behavior towards the ant fungal cultivars.

Still, we poorly understand the behavior of *Escovopsioides* in the environment of attine ants. In addition, a wider sampling compared to previous studies should be used to determine the diversity of the genus. The aims of the present study are to improve the phylogeny and to assess the occurrence of *Escovopsioides* in attine ants found in different regions of Brazil, by expanding the sampling carried out in the study by Osti and Rodrigues (2018) and by adding additional phylogenetic markers. We carried out co-culture bioassays between *E. nivea* and fungal cultivars representing four of the five independently evolved fungicultures of the attine ants, to further assess whether this fungus shows attraction and specificity towards native fungal cultivars. Our findings suggest that *E. nivea* is an antagonistic symbiont associated with the environment of the attines, with low preference for fungal crops.

Material and methods

Fungal cultures

To describe the occurrence of *E. nivea* in attine colonies, we gathered information on all isolates of this fungus available in literature (Table 1), namely: 30 isolates obtained from the studies by Rodrigues et al. (2005b), Rodrigues et al. (2008), Augustin et al. (2013), Reis et al. (2015), Pereira et al. (2016), Osti and Rodrigues (2018) and Montoya et al. (2021). The isolates are preserved as conidia suspensions in 10% aqueous solution of glycerol at –80 °C and deposited in the collection of the Laboratory of Fungal Ecology and Systematics (LESF). To revive the isolates, conidia were transferred to Petri dishes containing 37 g L^{-1} of Potato Dextrose Agar medium (PDA, NEOGEN® Culture Media) supplemented with 150 µg mL^{-1} of chloramphenicol (Sigma) and were incubated at 25 °C, in the dark, for 7 to 10 d.

For interaction experiments between *E. nivea* and the cultivars of attine ants, five isolates of mutualistic fungi were used, namely: *L. gongylophorus* FF2006 and *Leucoagaricus* sp. IJ2016 (Jiménez-Gómez et al. 2021), isolated from colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* and the higher attine ant *Mycetomoellerius tucumanus*, respectively; the fungus *Leucocoprinus* sp. AR01, obtained from a colony of the lower attine ant *Mycetophylax morschi* (Custodio and Rodrigues, 2018); and the cultivars, *Myrmecopterula nudihortorum* M55 and *Myrmecopterula velohortorum* M46, were obtained from colonies of the lower attine ants *Apterostigma goniodes* and *Apterostigma urichii*, respectively (Leal-Dutra et al. 2020). These fungi are also deposited at LESF and maintained by continuous transfer every 21 d, on PDA.

Phylogeny of Escovopsioides isolates

After gathering all isolates available discerned from the literature, the first step was to confirm that they all belong to the same species. For this, we carried out phylogenetic analyzes using five markers, with a dataset consisting of a total of 39 ITS (609 bp), 37 LSU (580 bp), 32 *rpb*1 (727 bp), 34 *rpb*2 (1023 bp), and 39 *tef*1 (780 bp) sequences. The sequences of *Escovopsioides* strains (n= 30) were obtained from Osti and Rodrigues (2018) and Montoya et al. (2021), and the sequences of the remaining strains were obtained from GenBank (Table S1).

First, the dataset of each molecular marker was aligned separately using MAFFT v.7 (Katoh and Standley, 2013). We eliminated the poorly aligned sites of each alignment using Gblocks v 0.91b in Phylogeny.fr (Dereeper et al., 2008). Then, we selected the nucleotide substitution model by independent runs in jModelTest 2 (Darriba et al., 2012) using the Akaike information criterion with 95% of interval confidence. Next, the five datasets were concatenated using Winclada v.1.00.08 (Nixon, 2002). The final file had a total of 3719 bp of which 3062 bp were informative. We inferred the final tree using Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI) approaches in RAxML v.8 (Stamatakis, 2014) and MrBayes v.3.2.2 (Ronquist et al., 2012). For the ML analysis, we used the GTR + I + G substitution model with 1000 independent trees and 1000 bootstrap replicates. The BI analysis was performed using the GTR substitution model for ITS and LSU and GTR + I + G for *rpb*1, *rpb*2 and *tef*1, independently. We carried out two separate runs, each consisting of three hot chains and one cold chain, and a Markov Chain Monte Carlo (MCMC) sampling for two million generations (standard deviation < 0.01). The first 25 % of the generations of MCMC sampling were discarded as burn-in. *Lecanicillium antillanum* CBS 35085 was used as outgroup. The final phylogenetic tree was

visualised and prepared for publication using FigTree v.1.4 (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/) and Adobe Illustrator CC v.17.1.

In the study by Osti and Rodrigues (2018), isolate LESF 602 was suggested as a putative new species. Nevertheless, we removed it from the phylogeny performed in the present study, because for this isolate only ITS and *tef*1 have been sequenced and it would be necessary to sequence the markers used in this study to propose a new species hypothesis in the genus *Escovopsioides*. As this isolate lost viability, amplification of the additional markers was not possible, so we decided not to include it in the phylogeny.

Assessing the specificity of Escovopsioides nivea towards fungal cultivars of attines

To analyse whether *E. nivea* shows preference for different cultivars, representing four of the five fungicultures practiced by the attines, co-culture bioassays were carried out using the chance-of-choice method, i.e. assays in which the target fungus is presented to different cultivar fungi, similar to those used by Gerardo et al. (2006a,b) and Bizarria et al. (2020). We used Petri dishes (150 mm x 15 mm) containing PDA medium, which was cut with a sterile scalpel, to create six tracks of culture medium. A mycelium fragment of 8 mm in diameter from a culture of *E. nivea* was placed at the center of the plate. At the ends of each track, we inoculated mycelium fragments from the five fungal cultivars and the sixth track received no fungi, control track (Figure 1).

Plates were incubated at 25 °C in the dark and the mycelial growth radius (in cm) of *E. nivea*, from the center to the edge of the plate on each track, was measured on days 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, and 14. The radius was measured from digitized images of plates in Image J v.1.38 (Rasband, 2018). This experiment was carried out with 25 isolates of *E. nivea* (Table 1), each with ten technical replicates. As the phylogenetic analysis showed that all isolates belong to the same species, each isolate was considered a biological replicate (n = 25 replicates). Therefore, for data analyses, we averaged the radius obtained from the ten technical replicates, resulting in one radius value for each of the 25 strains. To assess whether there were differences between the growth radiuses of control and the treatments, we used the Wilcoxon signed rank test as our data did not follow a normal distribution. Because we observed differences among the *E. nivea* isolates in this experiment, we compared these by considering the ten technical replicates of each strain as statistical replicates. For this analysis, only the growth measured on the fifth and the 14th day of the test were chosen, as they were the representative days for the growth of *E. nivea*.

Dual-culture assays

In the previous experiment, there was the possibility of interference by each of the fungi in the challenge, since *E. nivea* was cultivated simultaneously in the presence of five different fungal cultivars. Therefore, to confirm the results observed in these experiments, paired culture assays were performed for 12 out of 25 *E. nivea* strains and the five fungal cultivars. The 12 strains were selected as they showed intraspecific variability in the analysed markers as well as variable interaction patterns in the previous experiment. In Petri dishes (150 mm x 15 mm) containing PDA, a mycelium fragment from the cultivars was deposited 2 cm from the edge of the dish. Plates were incubated for 14 d at 25 °C, in darkness. Next we placed a fragment of *E. nivea* mycelium at the opposite side and 8 cm apart from the growth of the cultivar. The axenic cultures of all fungi used in this bioassay served as a control. The plates were incubated for 14 d at 25 °C and the growth area (in cm^2) of *E. nivea* and the cultivars was digitized and measured with Image J. For each treatment we used ten replicates.

For data analysis, we averaged the growth areas from the ten replicates, obtaining a single value for each of the *E. nivea* strains, and adopted the same method of biological replication as the previous experiment (n = 12 repetitions). To verify differences in the growth of *E. nivea* in the presence and absence of fungal cultivars after 14 d, we performed a Nonparametric Analysis of Longitudinal Data (Noguchi et al., 2012) as it accounts for repeated measures in the growth curves. To analyse the growth of fungal cultivars, in the presence or absence of *E. nivea*, the Wilcoxon signed rank test was used for each day of growth separately. The Kruskal-Wallis test with post hoc Mann-Whitney U analysis was used to analyse the growth of cultivars fungi against each strain of *E. nivea* separately. All statistical analyses were performed in R (The R Core Team, 2017).

Results

Escovopsioides nivea presence in fungus gardens of attine ants

A total of 30 isolates belonging to the genus *Escovopsioides* were reported from fungus gardens of 11 different species and four or five different genera of attine ants in several studies. Due to the recent reclassification of the genus *Trachymyrmex* into *Mycetomoellerius*, *Paratrachymyrmex*, and *Trachymyrmex* (Solomon et al., 2019), and due to the fact that the

Trachymyrmex sp. samples were based on field identification, we are unable to identify the exact genus for these samples, however, we can exclude the genus *Trachymyrmex* since this has its distribution solely in North America (Solomon et al. 2019). Here, we amassed all these isolates in a multilocus phylogeny (Figure 2). The phylogenetic analysis with five markers grouped the isolates in the same clade, together with the type species of the genus, *Escovopsioides nivea* CBS 135749 (ex-type culture), showing that all isolates belong to the same species (Figure 2). Low intraspecific genetic variability was also observed for each of the five markers, in relation to the type species: 99-100%, 100%, 99-100%, 99-100% and 99-100% for ITS, LSU, *tef*1, *rpb*1 and *rpb*2, respectively.

Escovopsioides nivea was found in attine fungus gardens distributed in six different habitats, from eight locations in Brazil (Table 1). This species occurs both in different genera of higher attines, the leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex* and non-leaf-cutting ants *Trachymyrmex* and *Mycetomoellerius*, as well as in the lower attine genus *Apterostigma*. This indicates that *E. nivea* is a recurrent taxon in attine ant gardens, distributed in different regions, and most likely is a symbiont.

Lack of preference of E. nivea towards fungi cultivated by attine ants

For the chance-of-choice experiment, the growth after 7 d of *E. nivea* on each track containing a fungal cultivar of attine ants was significantly lower, when compared to the control track (Wilcoxon signed rank test, $P< 0.05$, Table 2). Such inhibition was particularly apparent in relation to the fungi cultivated by lower attines (*Apterostigma urichii, Apterostigma goniodes,* and *Mycetophylax morschi*): *M. velohortorum* M46 inhibited the growth of *E. nivea* after 1 d, *M. nudihortorum* M55 and *Leucocoprinus* sp. AR01 inhibited *E. nivea* after 3 d (Wilcoxon signed rank test, $P< 0.05$, Table 2).

No significant difference was observed after 5 d of growth of *E. nivea* towards *L. gongylophorus* FF2006 in comparison to the control track (Wilcoxon signed rank test, $P> 0.05$, Table 2). The isolate *E. nivea* LESF 151 was the only one that showed increased growth towards this cultivar, when compared to the control after 5 d (Wilcoxon signed rank test, $P< 0.05$, Table S2). In contrast, *E. nivea* LESF 596 was not inhibited after 5 d by any cultivar (Wilcoxon signed rank test, $P> 0.05$, Table S2) and, similarly, isolate *E. nivea* LESF 587 showed no inhibition after 14 d when compared to the control ($P> 0.05$, Table S3).

Apterostigma cultivars inhibit the growth of E. nivea

In the dual-culture experiments, the mycelial growth of *E. nivea* was only significantly inhibited in the presence of the *Pterulaceae* fungi grown by *Apterostigma* (Nonparametric Analysis of Longitudinal Data, $P< 0.05$, Figure 3a). Such pattern of inhibition was visually evident after 14 d (Figure 3b). This result differs from the previous experiment (chance-of-choice), in which *E. nivea* was inhibited by all cultivars after 7 d (Table 2). On the other hand, we observed a significant stimulus in the growth of *E. nivea* after 9 d in the presence of *L. gongylophorus* FF2006 when compared to the control (Nonparametric Analysis of Longitudinal Data, $P< 0.05$, Figure 3a, b).

Also, when analysed separately, the growth of the 12 isolates of *E. nivea* was inhibited towards the two *Pterulaceae* cultivars of *Apterostigma* (Nonparametric Analysis of Longitudinal Data, $P< 0.05$, Figure S1). Regarding the other fungal cultivars, in 31 out of 36 combinations (86%) we did not observe increased growth of *E. nivea*. However, we observed some exceptions: isolates LESF 159 and LESF 321 showed a greater mycelial growth in the presence of *L. gongylophorus* FF2006 in comparison to the control (Nonparametric Analysis of Longitudinal Data, $P< 0.05$, Figure S1). Isolate LESF 1041 showed increased growth in confrontations with the ant cultivars of higher attines as well as *Leucocoprinus* sp. AR01, when compared to the control (Nonparametric Analysis of Longitudinal Data, $P< 0.05$, Figure S1).

Escovopsioides nivea inhibits the growth of fungal cultivars

Overall, *E. nivea* inhibited the growth of the five fungal cultivars towards the end of the dual-culture experiments (Wilcoxon signed rank test, $P< 0.05$, Figure 3c, d). The growth of *M. velohortorum* M46 was significantly inhibited by all strains of *E. nivea*, except for LESF 1041 (Kruskal-Wallis, Post Hoc Analysis Mann-Whitney U, $P< 0.05$, Table S4). A similar result was also observed for *Leucocoprinus* sp. AR01 paired with the isolate LESF 596 (Kruskal-Wallis, Post Hoc Analysis Mann-Whitney U, $P< 0.05$, Table S4). The fungi *L. gongylophorus* FF2006 and *Leucoagaricus* sp. IJ2016 were not significantly inhibited by four and two *E. nivea* strains, respectively (Kruskal Wallis, $P> 0.05$, Table S4), out of 12 in total, showing that there is variation between *E. nivea* isolates in inhibition of the fungal cultivars.

Discussion

Escovopsioides nivea was formally described from fungus gardens of *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Augustin et al., 2013), but many aspects of its biology, distribution and phylogenetic relationship with other fungi found in attine ant colonies have been poorly studied (Varanda-Haifig et al., 2017; Osti and Rodrigues, 2018; Medonça et al., 2021). Our results, together with data from previous studies, suggest that *E. nivea* is a symbiont in colonies of attine ants, as it has been found repeatedly in this environment, both in different genera and species of these insects, as well as in different geographic regions. To our knowledge, *E. nivea* has, so far, only been found in the gardens of higher attine ants and in a single genus of lower attine ant (*Apterostigma*). However, studies investigating soil nearby ant colonies should reveal whether this symbiosis is obligate (*E nivea* grows exclusively in ant fungus gardens) or facultative (*E. nivea* also has an ecological mode outside ant gardens). Our data supports the antagonism of *E. nivea* since it inhibits the growth of ant cultivars, as suggested in previous studies (Varanda-Haifig et al., 2017; Osti and Rodrigues, 2018). Because *E. nivea* was found in association with fungus gardens of the attines and due to its phylogenetic relatedness to *Escovopsis*, it was expected that the behavior of *E. nivea* would be similar, i.e. showing preference and specialization towards fungal cultivars (Currie, 2001; Birnbaum and Gerardo, 2016). However, here we show that *E. nivea* did not have a growth preference to any of the five cultivars evaluated, suggesting a different evolution than *Escovopsis* in the attine ant–fungus association.

It has previously been suggested that additional sampling, especially considering the lower attines, would lead to the discovery of new *Escovopsioides* species (Osti and Rodrigues 2018). According to the phylogeny presented here (Figure 2), the clade *Escovopsioides* is genetically homogeneous, and the strains have little intraspecific variability in the five markers evaluated. For the present study, we obtained ten additional isolates from different habitats as well as from lower attine ants. Even so, these isolates grouped in the same phylogenetic species, *E. nivea*. Considering the samplings carried out so far, at least one *Escovopsioides* species is widespread in different attine ants, especially the higher attines. However, additional sampling may reveal whether this species is really widespread in colonies of other lower attine ants in addition to *Apterostigma*.

Osti and Rodrigues (2018) reported an isolate of *Escovopsioides* sp. LESF 602, which could be considered a new species. This particular isolate was not recovered from the LESF collection, as it lost viability and could not be further examined. As the previous authors did

not describe the macroscopic and microscopic morphological characteristics of this isolate, it is possible that this fungus is a new species or even a new genus. To confirm the new taxon hypothesis, it would be necessary to perform new isolations in the same area of occurrence of the associated ant species, *Apterostigma megacephala*, in Parauapebas, Brazil (Osti and Rodrigues, 2018). Only with new samples will it be possible to examine the morphological characteristics and sequence the additional molecular markers used in the present study (*rpb*1 and *rpb*2).

E. nivea has been reported as a fungus of variable prevalence in gardens of leaf-cutting ants. Augustin et al. (2013) reported *E. nivea* from 14 out of 25 (56%) colonies collected from three *Acromyrmex* species, in three locations in Viçosa, Brazil (see Table S2 in the supplementary material of Augustin et al., 2013). Considering the same ant genus, Rodrigues et al. (2008) and Mendonça et al. (2021) reported a lower prevalence, 8% and 5%, respectively (reported by Rodrigues et al. (2008) as "*Moniliella*-like fungus"). *E. nivea* has also been reported in colonies of the genus *Atta* (Reis et al. 2015; Pereira et al. 2016) with prevalence of 66% and 12%, respectively. In 2005, two other studies by Rodrigues et al. (2005a,b) also sampled *Atta* colonies, in the first the occurrence of *E. nivea* was 50% and in the other 8% (in both studies *E. nivea* was identified as *Moniliella suaveolens*). It is possible that the variable prevalence is due to the fact that isolating fungi in the genus *Escovopsioides* is not a trivial task, as it has slow growth and hyaline mycelium (Augustin et al., 2013), which makes it difficult to recognize and distinguish from other contaminating fungi during isolation in pure culture. In addition, the techniques used to perform the isolations were different between studies, which can also increase the instability in the prevalence of this fungus in the colonies of attine ants. Furthermore, few studies systematically investigated this fungus, since most focused on the *Escovopsis* coevolutionary history and parasitism. Therefore, we argue that *E. nivea* is a symbiont in the colonies of these insects, however, its prevalence in this system requires more systematic studies.

Due to the phylogenetic relatedness of *Escovopsioides* and *Escovopsis*, the former was considered a parasite of the fungi cultivated by attines (Varanda-Haifig et al., 2017; Osti and Rodrigues, 2018). In fact, *E. nivea* inhibited all cultivars in the experiments, suggesting antagonism, either by competition for resources or space (Wicklow, 1992). However, the interaction of *E. nivea* with fungal cultivars differs from that observed for *Escovopsis*. Growth of *E. nivea* was not stimulated in the presence of the ant fungal cultivars. Such growth stimulus is generally observed in *Escovopsis* species (Gerardo et al., 2004, 2006a; Folgarait et al., 2011; Birnbaum and Gerardo, 2016; Varanda-Haifig et al., 2017) and *Sympodiorosea kreiselii* (=

Escovopsis kreiselii, Custodio and Rodrigues, 2018). On the other hand, the pattern of interaction of *E. nivea* with the cultivated fungi is similar to that observed for *Luteomyces trichodermoides* (= *Escovopsis trichodermoides*, Bizarria et al., 2020). Thus, it is evident that *E. nivea* responds differently than *Escovopsis* to fungi cultivated by ants, suggesting a distinct evolutionary history in the ant-fungal association.

E. nivea was inhibited by fungal cultivars, but only by fungi in the genus *Myrmecopterula*, cultivated by the lower attine ant *Apterostigma*. These cultivars are from a different family than the higher attine ant cultivars, so it is plausible they have a differentiated defense system. Because higher attines show many hygienic behaviors and chemical defenses to defend fungus gardens against invading microbes (Goes et al., 2020) compared to lower attine ants, fungi cultivated by lower ants would have to defend themselves by producing antifungal substances. Some studies suggest that fungal cultivars indeed produce different antifungal substances (Wang et al., 1998; Silva et al., 2005; Sousa et al., 2020). Also, volatile compounds could be involved in the interactions between *E. nivea* and fungal cultivars, as suggested for *Escovopsis* – fungal cultivar interactions (Masiulionis and Pagnocca, 2020). This subject should be explored in future studies.

Conclusions

Our study suggests that *E. nivea* is associated with the environment of the attine ants and is a possible antagonist of this system. These results add a fourth genus to a group of filamentous fungi that each have different patterns of interaction with fungi cultivated by attine ants (*Escovopsis* species: Gerardo et al., 2004, 2006a; Folgarait et al., 2011; Birnbaum and Gerardo, 2016; Varanda-Haifig et al., 2017; *S. kreiselii*: Custodio and Rodrigues, 2018; *L. trichodermoides*: Bizarria et al., 2020 and *E. nivea*: this study). Therefore, these associated microorganisms demonstrate the complexity of the multipartite relationships existing in the colonies of the attine ants and how many ecological fungal lifestyles evolved in this environment.

Acknowledgments

The authors would like to thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support (grants #2019/03-746-0). AR thanks Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for a research fellowship (grant

#305269/2018-6). The contribution to this paper by PK was possible thanks to the scholarship granted from the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES), in the scope of the Program CAPES-PrInt, process number 88887.310463/2018-00, Mobility numbers #88887.468939/2019-00 and #88887.571230/2020-00. We also thank CAPES (Finance Code - 001) for a scholarship to TCP). We would like to thank Caio Ambrósio Leal-Dutra for providing cultures of *Myrmecopterula velohortorum* M46 and *Myrmecopterula nudihortorum* M55. We also thank Simon Luke Elliot for providing the ex-type culture of *Escovopsioides nivea*. We thank the two anonymous reviewers for providing constructive comments on our manuscript.

Declaration of competing interest

The authors have declared no conflict of interests.

Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.funeco.2022.101140.

References

Augustin, J.O., Groenewald, J.Z., Nascimento, R.J., Mizubuti, E.S.G., Barreto, R.W., Elliot, S.L., Evans, H.C., 2013. Yet more ‘‘weeds’’ in the garden: fungal novelties from nests of leaf-cutting ants. PLoS One 8, e82265.

Birnbaum, S.S.L., Gerardo, N.M., 2016. Patterns of specificity of the pathogen *Escovopsis* across the fungus-growing ant symbiosis. Am. Nat. 188, 52–65.

Bizarria, R.Jr., Nagamoto, N.S., Rodrigues, A., 2020. Lack of fungal cultivar fidelity and low virulence of *Escovopsis trichodermoides*. Fungal Ecol. 45, 100944.

Cristiano, P.M., Cardoso, D.C., Sandoval-Gómes, V.E., Simões-Gomes, F.C., 2020. *Amoimyrmex* Cristiano, Cardoso & Sandoval, gen. nov. (Hymenoptera: Formicidae): a new

genus of leaf-cutting ants revealed by multilocus molecular phylogenetic and morphological analyses. Austral Entomol. 59, 643-676.

Currie, C.R., 2001. Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. Oecologia 128, 99–106.

Currie, C.R., Mueller, U.G., Malloch, D., 1999. The agricultural pathology of ant fungus gardens. Proc. Natl. Acad. Sci. 96, 7998–8002.

Currie, C.R., Wong, B., Stuart, A.E., Schultz T.R., Rehner, S.A., Mueller, U.G., Sung, Gi-Ho, Spatafora, J.W., Straus, N.A., 2003. Ancient tripartite coevolution in the attine ant-microbe symbiosis. Science 299, 386–388.

Custodio, B.C., Rodrigues, A., 2018. *Escovopsis kreiselii* specialization to its native hosts in the fungiculture of the lower attine ant *Mycetophylax morschi*. Antonie van Leeuwenhoek 112, 305–317.

Darriba, D., Taboada, G.L, Doallo, R., Posada, D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nat. Methods 9, 772.

De Fine Licht, H.H., Boomsma, J. J., 2010. Forage collection, substrate preparation, and diet composition in fungus-growing ants. Ecol. Entomol. 35, 259-269.

Dentinger, B.T.M., Lodge, D. J., Munkacsi, A.B., Desjardin, D.E., McLaughlin, D.J., 2009. Phylogenetic placement of an unusual coral mushroom challenges the classic hypothesis of strict coevolution in the *Apterostigma pilosum* group ant–fungus mutualism. Evolution 63, 2172–2178.

Dereeper, A., Guignon, V., Blanc G., Audic, S., Buffet S., Chevenet, F., Dufayard, J.F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.M., Gascuel, O., 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. Nucleic Acids Res. 36, 465–469.

Douglas, A.E., 2010. The significance of symbiosis. In: The symbiotic habit 1st ed. Princeton University Press, New York, pp. 1–23.

Drew, G.C., Stevens, E.J. & King, K.C., 2021. Microbial evolution and transitions along the parasite–mutualist continuum. Nat Rev Microbiol 19, 623–638.

Folgarait, P.J., Marfetán, J.A., Cafaro, M.J., 2011. Growth and conidiation response of *Escovopsis weberi* (Ascomycota: Hypocreales) against the fungal cultivar of *Acromyrmex lundii* (Hymenoptera: Formicidae). Environ. Entomol. 40, 342-349.

Gerardo, N.M., Jacobs, S.R., Currie, C.R., Mueller U.G., 2006a. Ancient host–pathogen associations maintained by specificity of chemotaxis and antibiosis. PLoS Biol. 4, 1358–1363.

Gerardo, N.M., Mueller, U.G., Currie, C.R., 2006b. Complex host-pathogen coevolution in the *Apterostigma* fungus-growing ant-microbe symbiosis. BMC Evol. Biol. 6, 88–96.

Gerardo, N.M., Mueller, U.G., Price, S.L., Currie, C.R., 2004. Exploiting a mutualism: parasite specialization on cultivars within the fungus-growing ant symbiosis. P. Roy. Soc. B-Biol. Sci. 271, 1791–1798.

Goes, A.C., Barcoto, M.O., Kooij P.W., Bueno, O.C., Rodrigues, A., 2020. How do leaf-cutting ants recognize antagonistic microbes in their fungal crops? Front. Ecol. Evol. 8, 95.

Jeffries, P., 1995. Biology and ecology of mycoparasitism. Can. J. Botany 73 (S1), S1284-S1290.

Jiménez-Gómez, I., Barcoto, M.O., Montoya, Q.V., Goes, A.C., Monteiro, L.S.V.E., Bueno, O.C., Rodrigues, A., 2021. Host susceptibility modulates *Escovopsis* pathogenic potential in the fungiculture of higher attine ants. Front. Microbiol. 12, 673444.

Katoh, K., Standley, D.M., 2013. MAFFT Multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Mol. Biol. Evol. 30, 772–780.

Kubicek, C.P., Herrera-Estrella, A., Grigoriev, I. V., 2011. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. Genome Biol. 12, R40.

Leal-Dutra, C.A., Griffith, G.W., Neves, M.A., McLaughlin, D.J., McLaughlin, E.G., Clasen, L.A., Dentinger, B.T. M., 2020. Reclassification of Pterulaceae Corner (Basidiomycota: Agaricales) introducing the ant-associated genus *Myrmecopterula* gen. nov., *Phaeopterula* Henn. and the corticioid *Radulomycetaceae* fam. nov. IMA Fungus 11, 2.

Leung, T.L.F., Poulin, R., 2008. Parasitism, commensalism, and mutualism: exploring the many shades of symbioses. Vie Milieu. 58, 107–115.

Marfetán, J.A., Romero A.I., Folgarait, P.J., 2015. Pathogenic interaction between *Escovopsis weberi* and *Leucoagaricus* sp.: mechanisms involved and virulence levels. Fungal Ecol. 17, 52–61.

Masiulionis, V.E., Pagnocca, F.C., 2020. In vitro study of volatile organic compounds produced by the mutualistic fungus of leaf-cutter ants and the antagonist *Escovopsis*. Fungal Ecol. 48, 1009862.

Mendonça, D.M.F., Caixeta, M.C.S., Martins, G.L., Moreira, C.C., Kloss, T.G., Elliot, S.L., 2021. Low virulence of the fungi *Escovopsis* and *Escovopsioides* to a leaf-cutting ant-fungus symbiosis. Front Microbiol. 12, 673445.

Möller, A., 1893. Entwicklung des in den Gärten gezüchteten Pilzes nach Entfernung der Ameisen; die Conidien, „Perlenfäden" und „Stranganschwellungen". Ergebnisse der künstlichen Kultur des Pilzes. In: Schimper, A.F.W. (Ed.), Die Pilzgärten einiger südamerikanischer Ameisen, 1st ed. Jena, Verlag von Gustav Fischer, Germany, 6, pp. 42–65.

Montoya, Q.V., Martiarena, M.J.S., Bizarria Jr, R., Gerardo, N.M., Rodrigues, A., 2021. Fungi inhabitants of attine ant colonies: reassessment of the genus *Escovopsis* and description of *Sympodiorosea* and *Luteomyces* gen. nov. IMA Fungus 12, 23.

Mueller, U.G., Rehner, S.A., Schultz, T.R., 1998. The evolution of agriculture in ants. Science. 281, 2034-2038

Nixon, K.C., 2002. WinClada. Ver. 1.00,08. Published by the autor. Ithaca, New York. http://www.diversityoflife.org/ last accessed: June 18, 2021.

Noguchi, K., Gel, Y.R., Brunner, E., Konietschke, F., 2012. NparLD: A R software package for the nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments. J. Stat. Software 50, 1e23.

Osti, J.F., Rodrigues, A., 2018. *Escovopsioides* as a fungal antagonist of the fungus cultivated by leafcutter ants. BMC Microbiol. 18, 130.

Pagnocca, F.C., Masiulioni, V.E., Rodrigues, A., 2012. Specialized fungal parasites and opportunistic fungi in gardens of attine ants. Psyche 2012, 905109.

Pereira, J.S., Costa, R.R., Nagamoto, N.S., Forti, L.C., Pagnocca, F.C., Rodrigues A., 2016. Comparative analysis of fungal communities in colonies of two leaf-cutting ant species with different substratum preferences. Fungal Ecol. 21, 68–75.

Rasband, W.S., 2018. ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, https://imagej.nih.gov/ij/ last accessed: June 18, 2021.

Reis, B.M.S., Silva, A., Alvarez, M.R., Oliveira, T.B., Rodrigues, A., 2015. Fungal communities in gardens of the leafcutter ant *Atta cephalotes* in forest and cabruca agrosystems of southern Bahia State (Brazil). Fungal Biol. 119, 1170–1178.

Ridley, M., 2004. Coevolution. In: Evolution 3ª Edition. Blackwell Science, Oxford, UK, pp. 613–642.

Rodrigues, A., Pagnocca, F.C., Bacci, M. Jr., Hebling, M.J.A., Bueno, O.C., Pfenning, L.H., 2005a. Variability of non-mutualistic filamentous fungi associated with *Atta sexdens rubropilosa* nests. Folia Microbiol. 50, 421–425.

Rodrigues, A., Pagnocca, F.C., Bueno, O.C., Pfenning, L.H., Bacci Jr., M., 2005b. Assessment of microfungi in fungus gardens free of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). Sociobiology 46, 329–334.

Rodrigues, A., Bacci Jr., M., Mueller, U.G., Ortiz A., Pagnocca, F.C., 2008. Microfungal "weeds" in the leafcutter ant symbiosis. Microb. Ecol. 56, 604–614.

Ronquist, F., Teslenko, M., Van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. MrBayes 3.2: efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Syst. Biol. 6, 539–542.

Schultz, T.R., Brady, S.G., 2008. Major evolutionary transitions in ant agriculture. P. Natl. Acad. Sci. USA. 105, 5435–5440.

Silva, A., Bacci Jr., M., Pagnocca, F.C., Bueno, O.C., Hebling, M.J.A., 2005. Starch metabolism in *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. Microbiol. Res. 161, 299–303.

Solomon, S.E., Bacci Jr., M., Martins Jr., J., Vinha, G.G., Mueller, U.G., 2008. Paleodistributions and comparative molecular phylogeography of leaf-cutter ants (*Atta* sp.) provide new insight into the origins of Amazonian diversity. PLoS One 3, e2738.

Solomon, S.E., Rabeling, C., Sosa-Calvo, J., Lopes, C.T., Rodrigues, A., Vasconcelos, H.L., Bacci Jr., M.., Mueller, U.G., Schultz, T.R., 2019. The molecular phylogenetics of *Trachymyrmex* Forel ants and their fungal cultivars provide insights into the origin and coevolutionary history of 'higher-attine' ant agriculture. Syst. Entomol. 44, 939–956.

Sousa, K.K.A., Catalani, G.C., Gianeti, T.M.R., Camargo, R.S., Caldato, N., 2020. A volatile semiochemical released by the fungus garden of leaf-cutting ants. Florid. Entomol. 103, 1.

Stamatakis, A., 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics. 30, 1312–1313.

The R Core Team, 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. http://www.R-project.org/. Last accessed: June 18, 2021.

Varanda-Haifig, S.S., Albarici, T.R., Nunes, P.H., Haifig, I., Vieira, P.C., Rodrigues, A., 2017. Nature of the interactions between hypocrealean fungi and the mutualistic fungus of leaf-cutter ants. Antonie van Leeuwenhoek. 110, 593–605.

Vega, F.E., Biedermann, P.H.W., 2020. On interactions, associations, mycetangia, mutualists and symbiotes in insect-fungus symbioses. Fungal Ecol. 44, 100909.

Viterbo, A., Horwitz, B.A., 2010. Mycoparasitism. In: Borkovich, K.A., Ebbole, D.J. (Eds.), cellular and molecular biology of filamentous fungi, 1st ed. Wiley Online Library, pp. 676–693.

Wang, Y., Mueller, U.G., Clardy, J., 1998. Antifungal diketopiperazines from symbiotic fungus of fungus-growing ants *Cyphomyrmex minutus*. J. Chem. Ecol. 25, 935–941.

Weber, N.A., 1972. The fungus-culturing behavior of ants. Am. Zool. 12, 577–587.

Weeks, A.R., Turelli, M., Harcombe, W.R., Reynolds, K.T., Hoffmann, A.A., 2007. From parasite to mutualist: rapid evolution of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila*. Plos Biol. 5, 997–1005.

Wicklow, D.T., 1992. The coprophilous fungal community: A mycological system for examining ecological ideas. In: Wicklow, D.T., Car- roll, G.C., Dekker, M. (Eds.), The fungal community, 2nd ed. Inc., New York, pp. 715–728.

Table 1. *Escovopsioides nivea* isolates from fungus gardens of attine ants found in Brazil.

Isolate ID	Ant species	Ant colony ID	Habitat	Locality (City/State)	Coordinates	References[4]
LESF 057[1]	*Atta sexdens rubropilosa*	Ninho 4	Citrus crop	Corumbataí/SP	22°17'22.0"S 47°39'23.0"W	Rodrigues et al. (2005a)
LESF 151	*Atta sexdens rubropilosa*	Ninho 9	Citrus crop	Corumbataí/SP	22°17'21.73"S 47°39'22.89"W	Rodrigues et al. (2005a)
LESF 159[5]	*Atta sexdens rubropilosa*	Ninho 7	Citrus crop	Corumbataí/SP	22°17'21.73"S 47°39'22.89"W	Rodrigues et al. (2005a)
LESF 510	*Atta sexdens rubropilosa*	JSP130130-04	Eucalyptus plantation	Botucatu/SP	22°54'28.4"S 48°18'55.7"W	Pereira et al. (2016)
LESF 587	*Atta cephalotes*	BMSR120704-01(FO3)	Atlantic Rain Forest	Camacan/BA	15°23'18.2"S 39°33'30.5"W	Reis et al. (2015)
LESF 588	*Atta cephalotes*	BMSR120804-01(CA8)	Atlantic Rain Forest	Camacan/BA	15°25'32.3"S 39°32'48.1"W	Reis et al. (2015)
LESF 589	*Atta cephalotes*	BMSR120702-01(FO4)	Atlantic Rain Forest	Camacan/BA	15°23'14.8"S 39°33'28.4"W	Reis et al. (2015)
LESF 590	*Atta cephalotes*	BMSR130220-01(FO6)	Atlantic Rain Forest	Camacan/BA	15°23'15.2"S 39°33'28.0"W	Reis et al. (2015)
LESF 591	*Atta capiguara*	JSP130307-03	Pasture	Botucatu/SP	22°54'26.6"S 48°18'29.2"W	Pereira et al. (2016)
LESF 592[5]	*Acromyrmex balzani*	ARFVG110517-01	Atlantic Rain Forest	Camacan/BA	15°22'50.3"S 39°34'03.5"W	
LESF 593[1]	*Atta cephalotes*	BMSR120703-01(FO5)	Atlantic Rain Forest	Camacan/BA	15°23'17.8"S 39°33'22.3"W	Reis et al. (2015)
LESF 594[1]	*Atta cephalotes*	BMSR120804-01(CA8)	Atlantic Rain Forest	Camacan/BA	15°25'32.3"S 39°32'48.1"W	Reis et al. (2015)
LESF 595[1]	*Atta cephalotes*	BMSR120702-01(FO1)	Atlantic Rain Forest	Camacan/BA	15°23'14.8"S 39°33'28.4"W	Reis et al. (2015)
LESF 596[5]	*Acromyrmex lundi*	AOMB110904-02	Prairie	Chuvisca/RS	30°50'10.2"S 51°55'10.4"W	Rodrigues et al. (2008)
LESF 597	*Atta cephalotes*	BMSR120703-02(FO2)	Atlantic Rain Forest	Camacan/BA	15°23'29.7"S 39°33'31.3"W	Reis et al. (2015)
LESF 598[5]	*Atta cephalotes*	BMSR120703-01(FO5)	Atlantic Rain Forest	Camacan/BA	15°23'17.8"S 39°33'22.3"W	Reis et al. (2015)
LESF 599	*Acromyrmex heyeri*	AOMB100904-03	Prairie	Sentinela do Sul/RS	30°37'09.0"S 51°33' 18.2"W	Rodrigues et al. (2008)
CBS 135749[2,5]	*Acromyrmex subterraneus subterraneus*	JQ855713	Atlantic Rain Forest	Viçosa/MG	20°44'31.71"S 42°52'43.83"W	Augustin et al. (2013)
LESF 601[5]	*Mycetomoellerius tucumanus*	SES080402-04	Savanna	Rio Claro/SP	22°23'45.84"S 47°32'41.58"W	
LESF 603[1]	*Atta sexdens rubropilosa*	Ninho 12	Citrus crop	Corumbataí/SP	22°17'22.0"S 47°39'23.0"W	Rodrigues et al. (2005a)
LESF 1023[5]	*Trachymyrmex* sp. *sensu lato*	QVM170309-02	Amazon Forest	Manaus/AM	2°26'52.6"S 59°45'53.4"W	Montoya et al. (2021)
LESF 1025[5]	*Trachymyrmex* sp. *sensu lato*	QVM170309-03	Amazon Forest	Manaus/AM	2°26'52.6"S 59°45'53.4"W	Montoya et al. (2021)
LESF 1028	*Trachymyrmex* sp. *sensu lato*	QVM170309-15	Amazon Forest	Manaus/AM	2°26'52.7"S 59°45'52.4"W	Montoya et al. (2021)
LESF 1031[5]	*Trachymyrmex* sp. *sensu lato*	QVM170309-18	Amazon Forest	Manaus/AM	2°26'55.5"S 59°45'54.2"W	Montoya et al. (2021)
LESF 1009	*Apterostigma* sp.[3]	CALD170307-04	Amazon Forest	Manaus/AM	2°26'55.4"S 59°46'10.9"W	Montoya et al. (2021)
LESF 1039	Non-identified attine	QVM170309-04	Amazon Forest	Manaus/AM	2°26'52.4"S 59°45'53.2"W	Montoya et al. (2021)
LESF 1040[5]	*Apterostigma urichii*[3]	QVM170309-12	Amazon Forest	Manaus/AM	2°26'52.7"S 59°45'52.4"W	Montoya et al. (2021)
LESF 1041[5]	*Apterostigma* sp. [3]	QVM170309-17	Amazon Forest	Manaus/AM	2°26'55.5"S 59°45'54.2"W	Montoya et al. (2021)
LESF 1111[5]	*Mycetomoellerius tucumanus*	BLS170617-01	Savanna	Rio Claro/SP	22°23'46.6"S 47°32'46.1"W	Montoya et al. (2021)
LESF 1112	*Mycetomoellerius tucumanus*	BLS170617-04	Savanna	Rio Claro/SP	22°23'47.7"S 47°32'45.2"W	Montoya et al. (2021)

[1] Isolates that lost viability in the LESF collection.
[2] Ex-type culture.
[3] Lower attine genera, all other genera are higher attines.
[4] References report the isolation source of *Escovopsioides nivea* isolates.
[5] Isolates selected for dual-culture assays.

Table 2. Growth of *Escovopsioides nivea* (in cm) towards five attine ant fungal cultivars after 14 d of interaction. Control: culture medium track without any fungal cultivar. Different letters in the same line mean significant differences (Wilcoxon signed rank test, $P < 0.05$).

Day	Control	FF2006	IJ2016	AR01	M46	M55
1	1.38 ± 1.00a	1.43 ± 1.04a	1.36 ± 0.95a	1.42 ± 1.15a	1.29 ± 0.88b	1.34 ± 0.84a
3	3.19 ± 1.50a	3.24 ± 1.54a	2.91 ± 1.55a	2.81 ± 1.52b	2.08 ± 0.89b	2.74 ± 0.99b
5	4.64 ± 1.62a	4.52 ± 1.62a	4.08 ± 1.50b	3.56 ± 1.38b	2.50 ± 0.84b	3.62 ± 1.02b
7	5.68 ± 1.36a	5.48 ± 1.44b	5.22 ± 1.40b	4.26 ± 1.25b	2.94 ± 0.96b	4.30 ± 1.00b
9	6.26 ± 1.01a	5.90 ± 1.35b	5.79 ± 1.23b	4.71 ± 1.28b	3.22 ± 1.02b	4.70 ± 1.03b
11	6.67 ± 0.85a	6.21 ± 1.21b	6.26 ± 0.95b	5.04 ± 1.22b	3.35 ± 1.02b	4.90 ± 0.96b
14	6.77 ± 0.70a	6.26 ± 1.13b	6.32 ± 0.92b	5.13 ± 1.24b	3.39 ± 1.00b	4.98 ± 0.92b

FF2006: *Leucoagaricus gongylophorus*; IJ2016: *Leucoagaricus* sp.; AR01: *Leucocoprinus* sp.; M46: *Myrmecopterula velohortorum* and M55: *Myrmecopterula nudihortorum*.

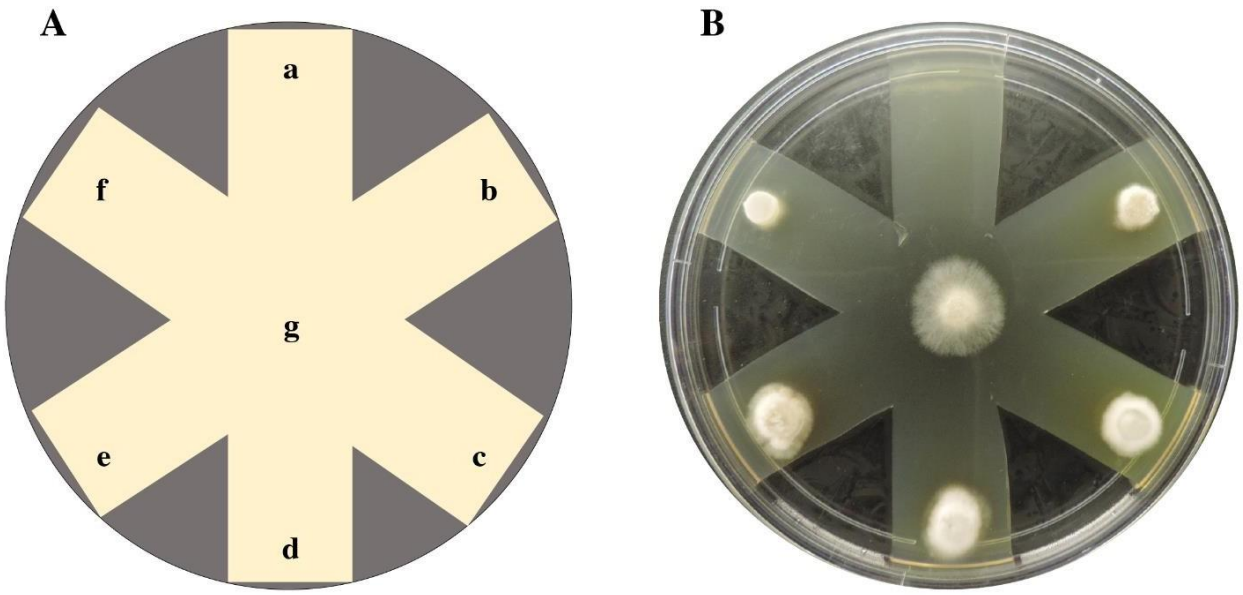


Figure 1. General view of the co-culture bioassay for assessing *Escovopsioides nivea* specificity towards ant cultivars. (**A**) Co-culture bioassay design using the chance-of-choice method. (a) Control, no fungus; (b) IJ2016: *Leucoagaricus* sp.; (c) M46: *Myrmecopterula velohortorum*; (d) AR01: *Leucocoprinus* sp.; (e) FF2006: *Leucoagaricus gongylophorus*; (f) M55: *Myrmecopterula nudihortorum*; (g) *E. nivea*. (**B**) The actual co-culture bioassay on a Potato Dextrose Agar plate.

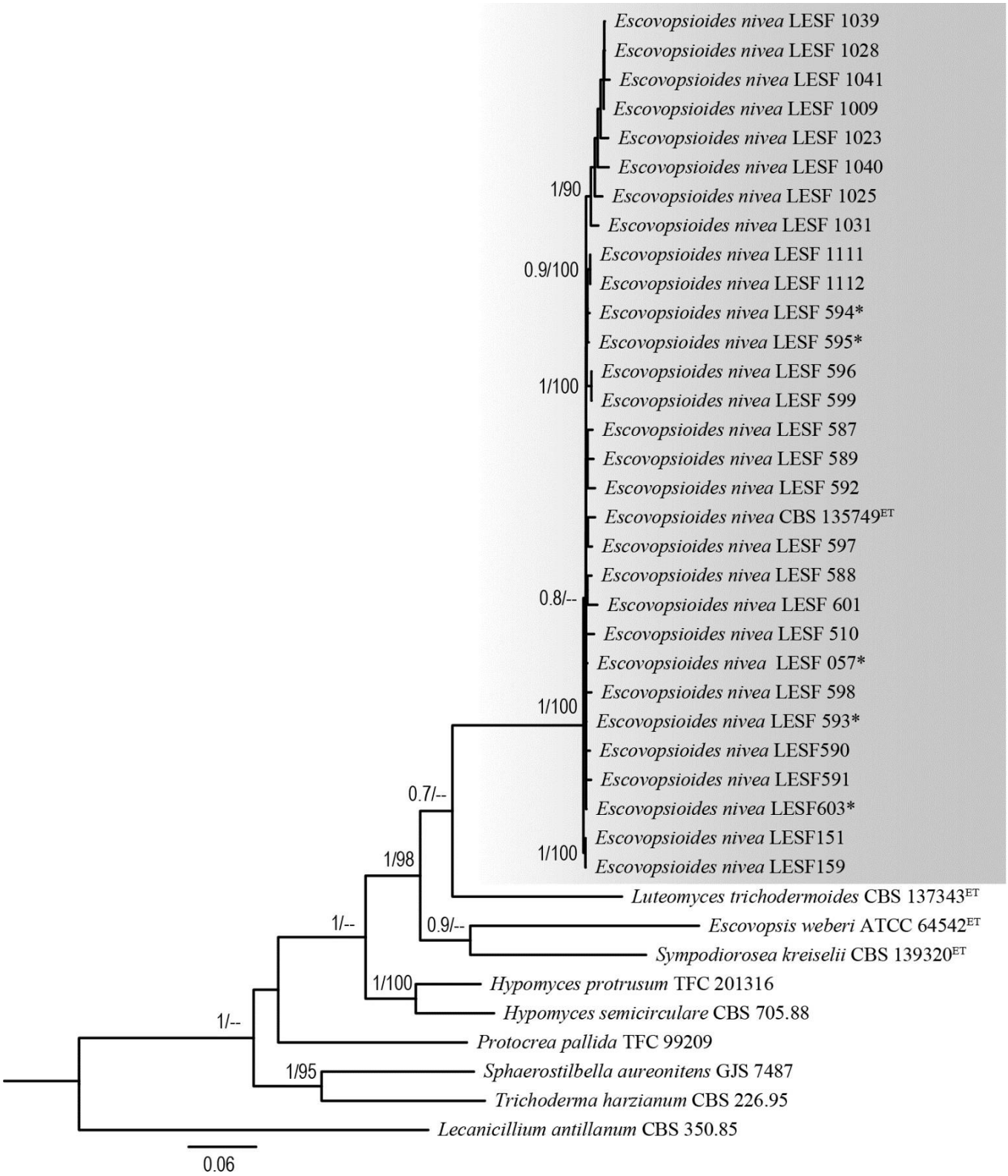


Figure 2. Phylogeny of *Escovopsioides nivea* isolates found in fungus gardens of attine ants. The analysis is based on five markers: ITS, LSU, *tef*1, *rpb*1 and *rpb*2. The tree was reconstructed using Bayesian Inference and Maximum Likelihood. Numbers on branches indicate the BI posterior probabilities and ML bootstrap support. LESF: isolates from the collection of the Laboratory of Fungal Ecology and Systematics (LESF), used in the study by Osti and Rodrigues (2018), in addition to others obtained in the present study (see Table 1). Isolates selected for dual-culture assays are labeled with ^{DC}. Isolates that have lost viability are labeled with *. The ex-type species is labeled by ^{ET}. The species *Lecanicillium antillanum* CBS 350.85 was used as an outgroup.

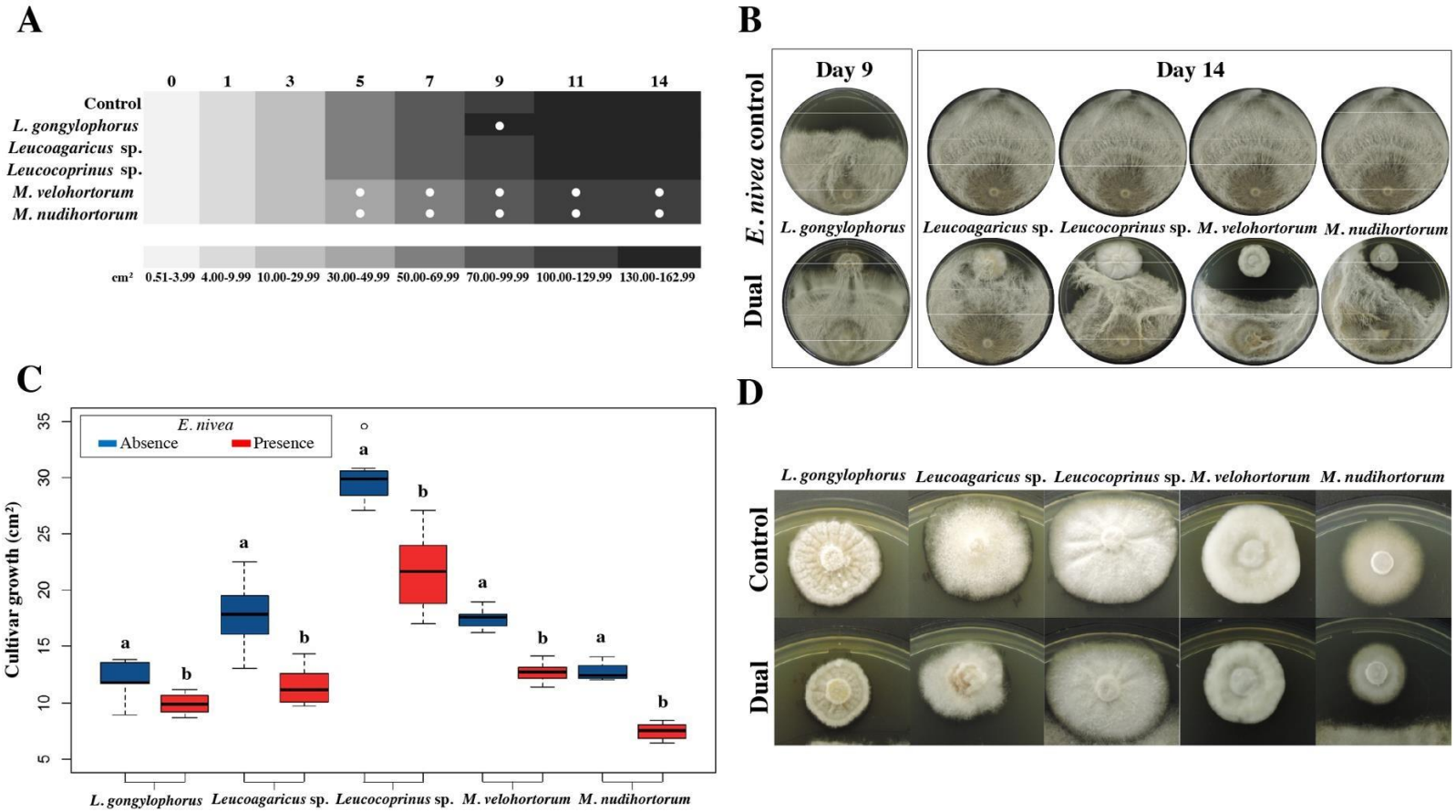


Figure 3. Interaction between *Escovopsioides nivea* and the fungal cultivars of attine ants. (**A**) Mycelial growth (in cm²) of *E. nivea*, after 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, and 14 d of experiment in the presence and absence (control) of fungi cultivated by attine ants. Significant difference according to the nparLD test in relation to the control is represented by the "white circles" ($P < 0.05$). This indicates that there was no increase in growth compared to mutualistic fungi. However, *E. nivea* was inhibited by fungal cultivars of *Apterostigma* ants (*Myrmecopterula velohortorum* and *M. nudihortorum*). (**B**) Patterns of *E. nivea* growth after 14 d in dual-culture and 9 d in dual-culture with *Leucoagaricus gongylophorus* (**C**) Mycelial growth of mutualistic fungi (in cm²) after 14 d of incubation in dual-culture in the presence of *E. nivea* (red) or in its absence (blue). Different letters on the boxplots represent significant differences between control and treatment (Wilcoxon signed rank test, $P < 0.05$), indicating growth inhibition of the fungal cultivars. (**D**) Fungal cultivar inhibition.

Supplementary material

Escovopsioides nivea is a non-specific antagonistic symbiont of ant-fungal crops

Tatiane de Castro Pietrobon, Pepijn Wilhelmus Kooij, Quimi Vidaurre Montoya, Andre Rodrigues

Table S1. Strains used in the phylogenetic analyses and their associated metadata.

Fungal species name	Strain ID	GenBank accessions				
		ITS	LSU	*tef*1	*rpb*1	*rpb*2
Escovopsioides nivea	CBS 135749[ET]	JQ815078	JQ855716	JQ855713	MT305414	MT305539
Escovopsioides nivea	LESF 159	MF116014	MF116034	MF140949	MT305444	MT305569
Escovopsioides nivea	LESF 601	MF116029	MF116049	MF140964	MT305487	MT305612
Escovopsioides nivea	LESF 151	MF116013	MF116033	MF140948	MT305442	MT305567
Escovopsioides nivea	LESF 510	MF116015	MF116035	MF140950	MT305474	MT305599
Escovopsioides nivea	LESF 587	MF116016	MF116036	MF140951	MT305477	MT305602
Escovopsioides nivea	LESF 588	MF116017	MF116037	MF140952	MT305478	MT305603
Escovopsioides nivea	LESF 589	MF116018	MF116038	MF140953	MT305479	MT305604
Escovopsioides nivea	LESF 590	MF116019	MF116039	MF140954	MT305480	MT305605
Escovopsioides nivea	LESF 591	MF116020	MF116040	MF140955	MT305481	MT305606
Escovopsioides nivea	LESF 592	MF116021	MF116041	MF140956	MT305482	MT305607
Escovopsioides nivea	LESF 596	MF116025	MF116045	MF140960	MT305483	MT305608
Escovopsioides nivea	LESF 597	MF116026	MF116046	MF140961	MT305484	MT305609
Escovopsioides nivea	LESF 598	MF116027	MF116047	MF140962	MT305485	MT305610
Escovopsioides nivea	LESF 599	MF116028	MF116048	MF140963	MT305486	MT305611
Escovopsioides nivea	LESF 1009	MT273483	MT273572	MT305392	MT305516	MT305641
Escovopsioides nivea	LESF 1023	MT273485	MT273574	MT305394	MT305518	MT305643
Escovopsioides nivea	LESF 1025	MT273486	MT273575	MT305395	MT305519	MT305644
Escovopsioides nivea	LESF 1028	MT273487	MT273576	MT305396	MT305520	MT305645
Escovopsioides nivea	LESF 1031	MT273488	MT273577	MT305397	MT305521	MT305646
Escovopsioides nivea	LESF 1039	MT273489	MT273578	MT305398	MT305522	MT305647
Escovopsioides nivea	LESF 1040	MT273490	MT273579	MT305399	MT305523	MT305648
Escovopsioides nivea	LESF 1041	MT273491	MT273580	MT305400	MT305524	MT305649
Luteomyces trichodermoides	CBS 137343 [ET]	KJ485699	MF116052	KF033128	MT305417	MT305542
Escovopsis weberi	ATCC 64542 [ET]	KF293285	KF293281	AY172623	MT305412	MT305537
Sympodiorosea kreiselii	CBS 139320 [ET]	KJ808767	HJ808765	KJ 808766	MT305418	MT305543

[ET] Ex-type culture; LESF: strains from the Laboratory of Fungal Ecology and Systematics.

Table S2. Growth of *Escovopsioides nivea* (in cm) towards five attine ant fungal cultivars after 5 d of interaction. Control: culture medium track without any fungal cultivar. Different letters mean significant differences (Wilcoxon signed rank test, $P < 0.05$).

E. nivea	**Control**	**FF2006**	**IJ2016**	**AR01**	**M46**	**M55**
LESF151	3.01 ± 0.75a	3.61 ± 0.75b	3.25 ± 0.75a	3.06 ± 0.56a	2.33 ± 0.23b	3.12 ± 0.69b
LESF 159	3.25 ± 0.77a	2.93 ± 0.42a	2.74 ± 0.62b	2.34 ± 0.42b	1.82 ± 0.22b	3.19 ± 0.73a
LESF 321	2.55 ± 0.42a	2.72 ± 0.34a	2.62 ± 0.30a	2.34 ± 0.21a	1.96 ± 0.32b	2.98 ± 0.88a
LESF 510	4.18 ± 1.46a	4.27 ± 1.62a	3.77 ± 1.08b	3.29 ± 0.69b	2.07 ± 0.55b	3.53 ± 0.94a
LESF 587	5.38 ± 1.49a	5.34 ± 1.32a	5.56 ± 1.56a	5.01 ± 1.15a	3.30 ± 0.46b	4.48 ± 1.04a
LESF 588	7.25 ± 0.00a	7.25 ± 0.00a	7.25 ± 0.00a	7.25 ± 0.00a	3.61 ± 0.40b	6.04 ± 1.21a
LESF 589	1.93 ± 0.67a	2.18 ± 0.69a	1.62 ± 0.57b	1.83 ± 0.43a	1.60 ± 0.35b	2.10 ± 0.65a
LESF 590	4.65 ± 1.92a	4.51 ± 1.59a	2.50 ± 0.76b	2.66 ± 1.33a	1.57 ± 0.23b	3.34 ± 1.00a
LESF 591	2.79 ± 0.55a	2.71 ± 0.43a	2.71 ± 0.51a	2.56 ± 0.25a	1.94 ± 0.28b	2.75 ± 0.57a
LESF 592	3.94 ± 0.92a	2.80 ± 0.36b	3.02 ± 0.41b	2.53 ± 0.33b	2.65 ± 0.35b	2.78 ± 0.29b
LESF 596	1.78 ± 0.24a	1.82 ± 0.17a	1.97 ± 0.13a	1.90 ± 0.23a	1.98 ± 0.18a	1.75 ± 0.16a
LESF 597	4.72 ± 1.47a	4.18 ± 1.68a	4.20 ± 1.06a	3.10 ± 1.08b	2.45 ± 0.59b	3.80 ± 0.60a
LESF 598	5.06 ± 1.10a	4.81 ± 1.78a	4.93 ± 1.59a	4.02 ± 1.60b	2.99 ± 0.59b	4.19 ± 0.94a
LESF 599	5.63 ± 1.66a	5.89 ± 1.62a	3.66 ± 1.38b	3.33 ± 0.34b	1.97 ± 0.38b	4.22 ± 0.88a
LESF 601	4.85 ± 1.39a	4.07 ± 1.37a	4.85 ± 1.86a	3.83 ± 1.38b	3.21 ± 0.79b	3.68 ± 0.90b
LESF 1009	5.58 ± 1.04a	5.92 ± 0.91a	3.80 ± 0.63b	3.91 ± 0.69b	1.96 ± 0.13b	3.72 ± 0.50b
LESF 1023	3.13 ± 0.77a	3.10 ± 1.72a	2.79 ± 0.45a	2.84 ± 1.69a	2.11 ± 0.34b	2.17 ± 0.45b
LESF 1025	7.10 ± 0.42a	7.25 ± 0.00a	7.25 ± 0.00a	7.13 ± 0.33a	5.42 ± 0.50b	5.14 ± 0.55b
LESF 1028	5.68 ± 1.07a	5.04 ± 0.98a	5.49 ± 0.86a	4.64 ± 0.66b	3.05 ± 0.35b	4.63 ± 0.58b
LESF 1031	7.03 ± 0.47a	6.57 ± 1.11a	4.31 ± 1.83b	2.73 ± 0.43b	1.79 ± 0.36b	3.82 ± 0.56b
LESF 1039	4.89 ± 1.29a	5.27 ± 1.34a	5.03 ± 1.56a	4.79 ± 1.29a	2.61 ± 0.28b	4.34 ± 0.93b
LESF 1040	7.25 ± 0.00a	7.16 ± 0.23a	4.85 ± 1.07b	3.73 ± 1.58b	1.60 ± 0.28b	5.25 ± 1.32b
LESF 1041	3.50 ± 0.43a	2.92 ± 0.28b	3.18 ± 0.35a	2.75 ± 0.38b	2.97 ± 0.38b	2.77 ± 0.21b
LESF 1111	5.14 ± 0.50a	5.15 ± 0.88a	4.87 ± 0.50a	3.82 ± 0.59b	2.75 ± 0.31b	3.51 ± 0.27b
LESF 1112	5.82 ± 0.93a	5.45 ± 0.93a	5.73 ± 0.97a	3.71 ± 0.42b	2.76 ± 0.31b	3.07 ± 0.20b

LESF: strains from the Laboratory of Fungal Ecology and Systematics. FF2006: *Leucoagaricus gongylophorus*; IJ2016: *Leucoagaricus* sp.; AR01: *Leucocoprinus* sp.; M46: *Myrmecopterula velohortorum* and M55: *Myrmecopterula nudihortorum*.

Table S3. Growth of *Escovopsioides nivea* (in cm) towards five attine ant fungal cultivars after 14 d of interaction. Control: culture medium track without any fungal cultivar. Different letters mean significant differences (Wilcoxon signed rank test, $P < 0.05$).

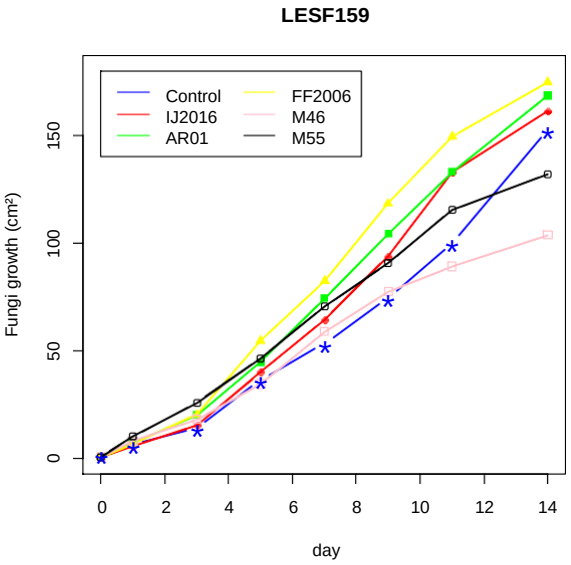
E. nivea	**Control**	**FF2006**	**IJ2016**	**AR01**	**M46**	**M55**
LESF 151	7.08 ± 0.50a	6.94 ± 0.92a	7.09 ± 0.46a	4.61 ± 0.42b	3.62 ± 0.32b	4.92 ± 0.56b
LESF 159	7.25 ± 0.00a	5.92 ± 1.58a	5.76 ± 1.47a	4.05 ± 1.25b	3.07 ± 0.50b	4.97 ± 0.97b
LESF 321	6.70 ± 0.82a	6.55 ± 1.38a	7.25 ± 0.00a	5.81 ± 1.74a	2.94 ± 0.62b	4.84 ± 0.47b
LESF 510	6.24 ± 1.24a	5.77 ± 1.43a	5.60 ± 1.62a	3.95 ± 0.66b	2.46 ± 0.62b	4.87 ± 1.18b
LESF 587	6.61 ± 1.49a	6.82 ± 1.27a	6.62 ± 1.53a	6.52 ± 1.45a	6.05 ± 1.83a	6.59 ± 1.41a
LESF 588	7.25 ± 0.00a	7.25 ± 0.00a	7.25 ± 0.00a	7.25 ± 0.00a	5.14 ± 1.69b	6.43 ± 1.24a
LESF 589	5.65 ± 1.99a	4.85 ± 1.56a	5.38 ± 1.71a	4.84 ± 1.58a	2.74 ± 0.56b	3.89 ± 1.54b
LESF 590	7.06 ± 0.56a	6.72 ± 1.57a	6.27 ± 1.62a	4.32 ± 1.90b	2.23 ± 0.51b	5.02 ± 1.29b
LESF 591	6.13 ± 0.96a	6.71 ± 1.12a	6.14 ± 1.13a	4.11 ± 0.56b	3.06 ± 0.42b	4.15 ± 0.50b
LESF 592	6.45 ± 0.95a	3.67 ± 0.55b	4.19 ± 1.20b	3.22 ± 0.78b	3.29 ± 0.41b	3.47 ± 0.52b
LESF 596	4.31 ± 1.08a	3.80 ± 1.01a	4.06 ± 1.02a	3.20 ± 0.41b	2.95 ± 0.58b	3.83 ± 0.91a
LESF 597	7.09 ± 0.45a	6.98 ± 0.79a	7.25 ± 0.00a	5.81 ± 1.40a	3.36 ± 0.67b	5.59 ± 1.10b
LESF 598	7.25 ± 0.00a	5.72 ± 1.45a	6.36 ± 1.17a	4.81 ± 1.91b	3.49 ± 0.53b	5.19 ± 1.76b
LESF 599	7.25 ± 0.00a	7.01 ± 0.69a	6.21 ± 1.60a	6.30 ± 1.42a	2.93 ± 0.51b	5.76 ± 1.24b
LESF 601	6.11 ± 0.92a	5.12 ± 1.32a	5.78 ± 1.21a	4.29 ± 1.31a	3.63 ± 0.85b	4.09 ± 0.86b
LESF 1009	7.25 ± 0.00a	6.88 ± 0.72a	6.37 ± 1.38a	6.26 ± 1.58a	2.87 ± 0.88b	5.52 ± 1.12b
LESF 1023	7.25 ± 0.00a	5.54 ± 1.62a	6.07 ± 1.40a	3.81 ± 1.65b	2.70 ± 0.74b	3.41 ± 0.88b
LESF 1025	7.25 ± 0.00a	7.25 ± 0.00a	7.25 ± 0.00a	7.13 ± 0.33a	6.04 ± 1.04b	6.71 ± 0.85a
LESF 1028	7.25 ± 0.00a	7.25 ± 0.00a	7.25 ± 0.00a	7.07 ± 0.52a	3.83 ± 0.58b	5.40 ± 0.28b
LESF 1031	7.25 ± 0.00a	7.25 ± 0.00a	6.30 ± 1.45a	4.27 ± 1.75b	2.43 ± 0.42b	5.18 ± 0.45b
LESF 1039	6.24 ± 1.50a	6.42 ± 1.54a	6.45 ± 1.55a	6.33 ± 1.71a	3.66 ± 0.96b	5.25 ± 1.26b
LESF 1040	7.25 ± 0.00a	7.25 ± 0.00a	7.11 ± 0.38b	4.74 ± 1.58b	2.32 ± 0.53a	6.08 ± 1.28a
LESF 1041	6.60 ± 0.69a	4.34 ± 0.62b	5.28 ± 1.39b	4.10 ± 0.58b	3.65 ± 0.41b	4.53 ± 0.64b
LESF 1111	7.25 ± 0.00a	7.25 ± 0.00a	7.25 ± 0.00b	6.17 ± 1.48a	3.20 ± 0.41a	4.30 ± 0.37b
LESF 1112	7.25 ± 0.00a	7.25 ± 0.00a	7.25 ± 0.00b	5.04 ± 1.38b	2.98 ± 0.27a	4.31 ± 0.56b

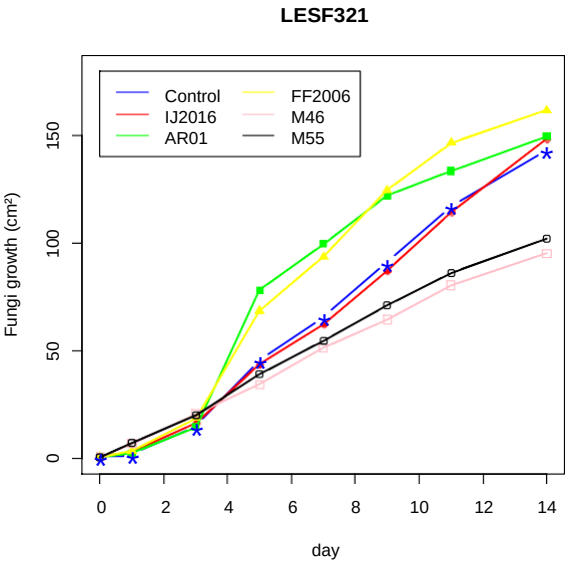
LESF: strains from the Laboratory of Fungal Ecology and Systematics. FF2006: *Leucoagaricus gongylophorus*; IJ2016: *Leucoagaricus* sp.; AR01: *Leucocoprinus* sp.; M46: *Myrmecopterula velohortorum* and M55: *Myrmecopterula nudihortorum*.

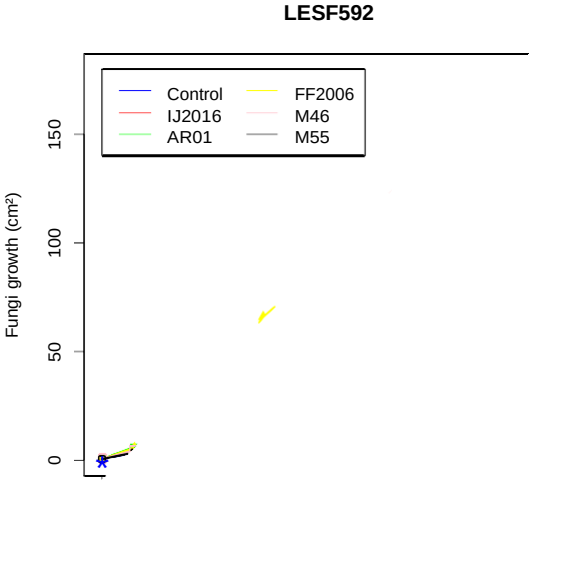
Table S4. Mycelial growth of mutualistic fungi (in cm²) after 14 d of incubation in dual-culture in the presence of *Escovopsioides nivea* isolates or in its absence (control). Different letters on the columns represent significant differences between control and treatment (Kruskal Wallis test, $P < 0.05$), indicating growth inhibition of the fungal cultivars.

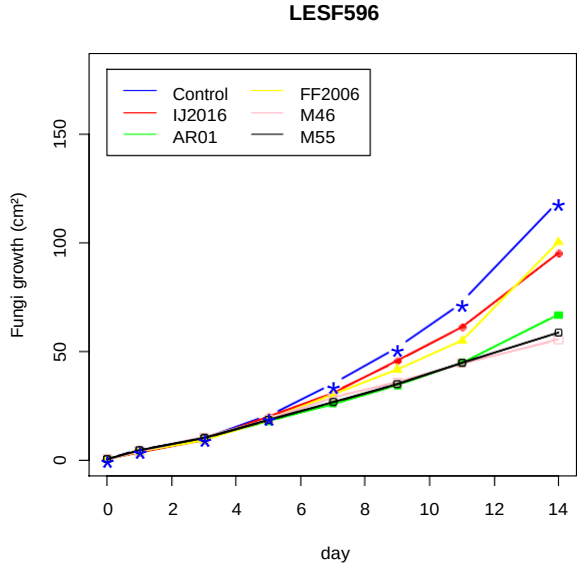
E. nivea	**FF2006**	**IJ2016**	**AR01**	**M46**	**M55**
Control	11.69 ± 1.75a	17.88 ± 2.64a	29.82 ± 2.08a	17.47 ± 0.83a	12.68 ± 0.68a
LESF 159	11.60 ± 0.82a	12.62 ± 2.01b	24.44 ± 1.43b	12.21 ± 2.07b	7.99 ± 1.13b
LESF 321	9.83 ± 1.07b	15.11 ± 3.01ab	22.19 ± 5.08b	13.30 ± 0.85b	7.78 ± 1.80b
LESF 592	10.13 ± 0.96b	10.83 ± 2.14b	22.18 ± 2.38b	12.73 ± 0.69b	6.33 ± 1.06b
LESF 596	10.73 ± 1.09ab	13.16 ± 1.77b	31.43 ± 2.26a	11.89 ± 1.52b	8.62 ± 0.83b
LESF 598	9.97 ± 1.63b	11.01 ± 3.30b	27.10 ± 1.87b	11.38 ± 1.24b	7.64 ± 0.66b
LESF 601	10.69 ± 0.80ab	10.04 ± 1.26b	20.00 ± 1.83b	12.44 ± 2.71b	7.00 ± 0.31b
LESF 1023	9.21 ± 0.91b	11.89 ± 1.35b	23.96 ± 3.77b	12.85 ± 1.49b	8.43 ± 077b
LESF 1025	8.90 ± 0.46b	11.29 ± 1.18b	18.87 ± 4.08b	8.13± 0.93b	4.31 ± 0.49b
LESF 1031	9.24 ± 0.38b	9.66 ± 1.94b	17.27 ± 1.51b	13,14 ± 1.22b	6.77 ± 0.55b
LESF 1040	8.03 ± 0.43b	10.07 ± 1.28b	17.03 ± 2.09b	12,74 ± 0.91b	7.20 ± 0.74b
LESF 1041	11.18 ± 0.89a	14.32 ± 1.01ab	21.07 ± 2.38b	15.29 ± 1.92ab	8.14 ± 1.84b
LESF 1111	8.70 ± 0.51b	8.22 ± 1.22b	15.84 ± 1.16b	14.20 ± 1.73b	6.76 ± 0.47b

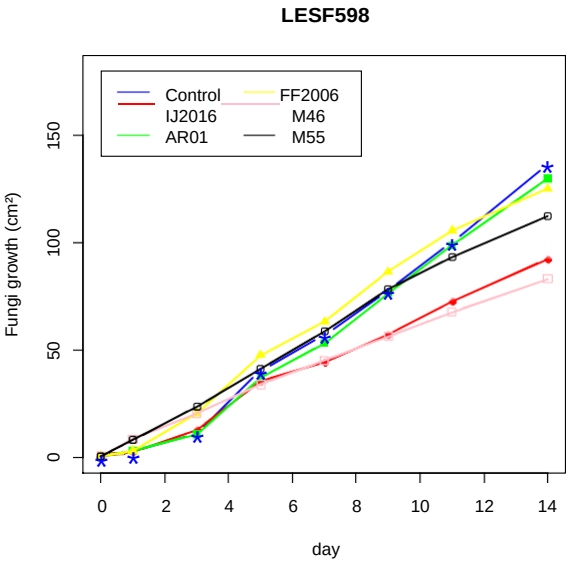
LESF: strains from the Laboratory of Fungal Ecology and Systematics. FF2006: *Leucoagaricus gongylophorus*; IJ2016: *Leucoagaricus* sp.; AR01: *Leucocoprinus* sp.; M46: *Myrmecopterula velohortorum* e M55: *Myrmecopterula nudihortorum*.

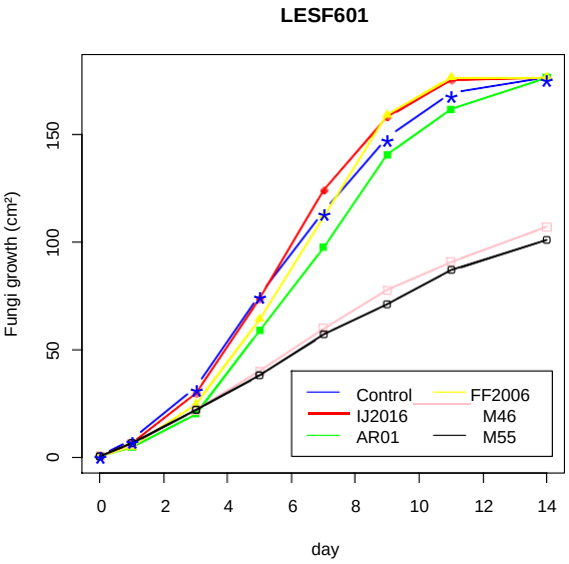

LESF159
Control
IJ2016
AR01
FF2006
M46
M55
Fungi growth (cm²)
day


LESF321
Control
IJ2016
AR01
FF2006
M46
M55
Fungi growth (cm²)
day


LESF592
Control
IJ2016
AR01
FF2006
M46
M55
Fungi growth (cm²)


LESF596
Control
IJ2016
AR01
FF2006
M46
M55
Fungi growth (cm²)
day


LESF598
Control
IJ2016
AR01
FF2006
M46
M55
Fungi growth (cm²)
day


LESF601
Control
IJ2016
AR01
FF2006
M46
M55
Fungi growth (cm²)
day

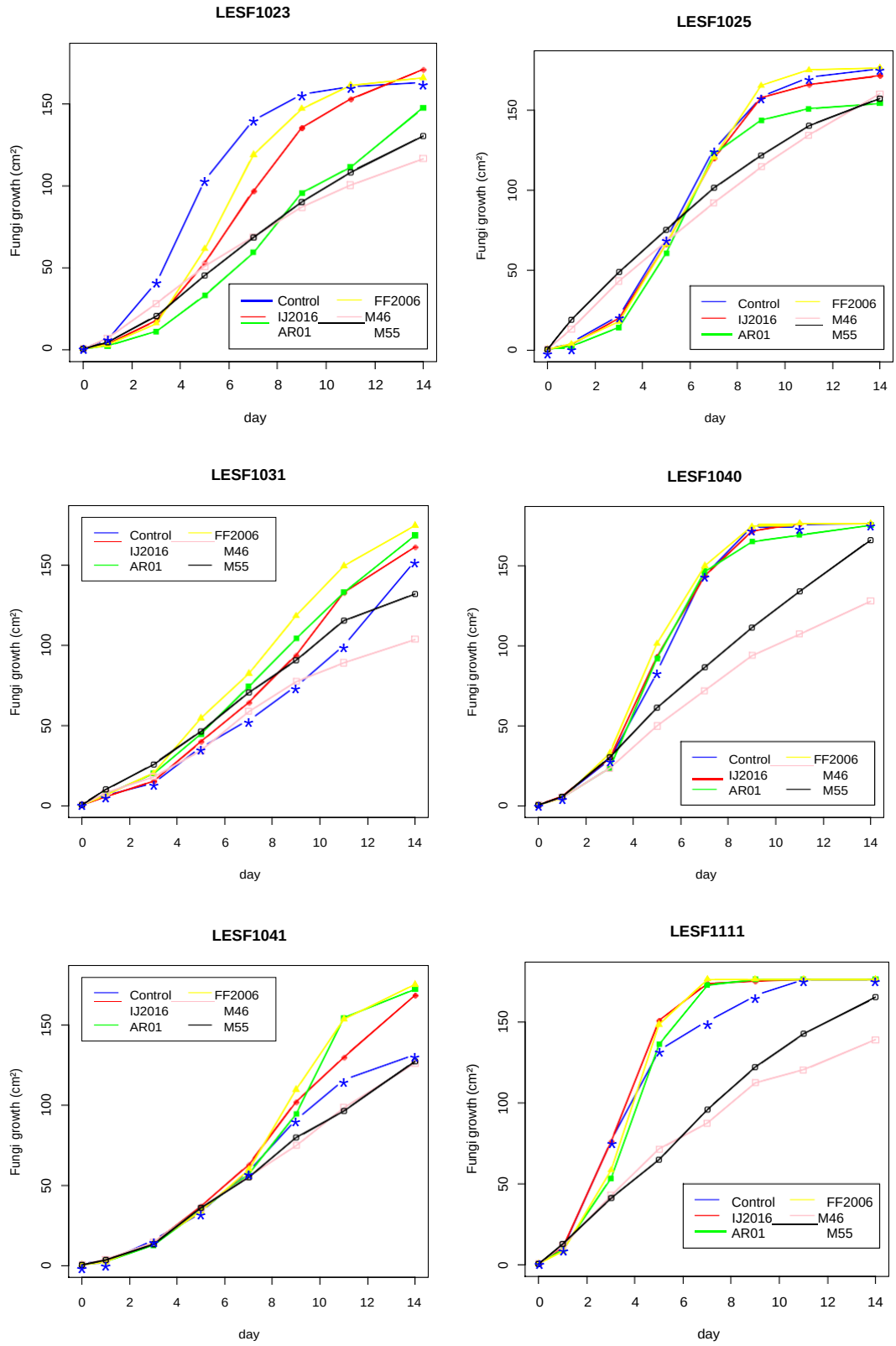


Figure S1. Mycelial growth (in cm²) of *Escovopsioides nivea*, on days 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, and 14 in the presence and absence (control) of fungi cultivated by attine ants. LESF: strains from the Laboratory of Fungal Ecology and Systematics. FF2006: *Leucoagaricus gongylophorus*; IJ2016: *Leucoagaricus* sp.; AR01: *Leucocoprinus* sp.; M46: *Myrmecopterula velohortorum* e M55: *Myrmecopterula nudihortorum*.

CAPÍTULO II

Mecanismo da interação entre *Escovopsioides nivea* e fungos cultivados pelas formigas atíneas

Manuscrito em preparação

6 CAPÍTULO II

Mecanismos da interação entre *Escovopsioides nivea* e fungos cultivados pelas formigas atíneas

Tatiane de Castro Pietrobon[1], Naydja Moralles Maimone[2], Simone Possedente de Lira[2], André Rodrigues[1*] andre.rodrigues@unesp.br

[1]Departamento de Biologia Geral e Aplicada, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, Brasil.

[2]Universidade de São Paulo, 'Luiz de Queiroz' Colégio Superior de Agricultura (ESALQ), Departamento de Matemática, Química e Estatística, Piracicaba, São Paulo, Brasil.

[*]Autor correspondente

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Departamento de Biologia Geral e Aplicada. Avenida 24-A, n. 1515, Rio Claro – SP, Brasil, CEP: 13.506-900

RESUMO

Microrganismos que vivem em simbiose interagem via compostos químicos, sejam eles voláteis ou solúveis. As formigas atíneas mantêm uma relação de mutualismo com fungos, na qual esses insetos fornecem substrato vegetal para o desenvolvimento do fungo, enquanto este é a principal fonte de alimento para a colônia. O equilíbrio desse mutualismo é mantido por metabólitos com ação antimicrobiana, produzidos pelo fungo, pela formiga e por vários microrganismos auxiliadores, que atuam na proteção da colônia contra possíveis antagonistas. *Escovopsioides nivea* é um antagonista que inibe o crescimento do fungo cultivado pelas formigas, mas também pode ser inibido por esse. Até o momento, não há estudos sobre os mecanismos dessa interação. O presente trabalho investigou se metabólitos solúveis estão envolvidos na interação entre esses fungos. Para tanto, realizamos experimentos de co-cultivo entre um isolado de *E. nivea* frente a dois fungos mutualistas cultivados pelas atíneas: *Leucoagaricus gongylophorus* e *Myrmecopterula nudihortorum*. Os co-cultivos foram interrompidos no 14º dia e o meio de cultivo foi removido das placas para extração dos metabólitos. Os extratos brutos foram analisados por espectrometria de massa e incorporados em meio de cultivo para ensaios de crescimento. *L. gongylophorus*, *M. nudihortorum* e *E. nivea* foram cultivados em meios contendo os extratos incorporados e o crescimento monitorado diariamente. Os resultados mostraram que os extratos obtidos dos co-cultivos inibem o crescimento do antagonista, mas não os fungos mutualistas das atíneas. Nenhum dos extratos obtidos das culturas axênicas inibiu os três fungos avaliados. Nossos resultados sugerem que metabólitos difundidos no meio podem estar envolvidos na inibição e que estes são produzidos quando os fungos estão em co-cultivo (i.e., em interação). Provavelmente, os metabólitos são derivados dos fungos mutualistas como um mecanismo de defesa contra antagonistas. Por outro lado, presumimos que a inibição dos fungos mutualistas ocasionada por *E. nivea*, observada nos experimentos realizados no Capítulo I, pode ser devida a outros fatores, como substâncias voláteis, competição por nutrientes, ou uma combinação desses e não somente por metabólitos solúveis. Embora a análise metabolômica encontra-se em andamento, acreditamos que esta fornecerá pistas sobre quais compostos foram produzidos durante os co-cultivos, permitindo entender os mecanismos químicos envolvidos na interação *E. nivea* com os fungos mutualistas.

Palavras-chaves: Compostos químicos. Simbiose. Antagonismo. Competição.

INTRODUÇÃO

Os microrganismos são ávidos produtores de metabólitos, pois os utilizam para se comunicarem com outros microrganismos, defenderem contra patógenos e interagirem com o ambiente (BENNETT et al., 2012; KÜES et al., 2018; ZHANG et al., 2015). Metabólitos são importantes, especialmente em interações simbióticas, tanto aquelas que trazem benefícios recíprocos (mutualismo), quanto as que ocasionam algum dano (parasitismo) para os organismos envolvidos. As interações envolvendo microrganismos podem ser moldadas por metabólitos, sejam eles voláteis ou difusíveis no meio (BARKA et al., 2016; FRIES 1973).

A interação entre as formigas atíneas e fungos é alvo de muitos estudos químicos. Nesse mutualismo, as formigas fornecem substrato vegetal para o desenvolvimento do fungo, enquanto este é a principal fonte de alimento para larvas e rainha da colônia (WEBER, 1972). O fungo mutualista apresenta um arsenal enzimático capaz de degradar os polímeros vegetais presentes no substrato vegetal, disponibilizando nutrientes no jardim de fungo, local onde o parceiro fúngico é cultivado (KOOIJ et al., 2014; SIQUEIRA et al., 1998). Como resultado desse metabolismo, o jardim é um substrato rico em nutrientes, os quais podem ser explorados por microrganismos antagonistas e competidores do fungo cultivado pelas formigas. Para proteger o jardim da ação desses microrganismos indesejáveis, as formigas e os fungos desenvolveram mecanismos para proteger o jardim (AYLWARD et al., 2013). Uma estratégia é a secreção de substâncias antimicrobianas, tanto por parte do fungo mutualista, quanto pelas formigas (ANGELI-PAPA, 1984; FERNANDÉZ-MARÍN et al., 2009; HERVEY; ROBERSON; LEONG, 1977). Além disso, as formigas formaram associações com diversos microrganismos auxiliadores, tais como bactérias do gênero *Pseudonocardia*, encontradas no tegumento desses insetos, além de bactérias do gênero *Burkholderia*, presentes nos jardins de fungo. Esses microrganismos produzem compostos antimicrobianos que visam proteger o jardim de antagonistas (CALDERA; CURRIE, 2012; CURRIE, et al., 1999a; FRANCOEUR et al., 2021; MARSH et al., 2013).

O mutualismo das formigas atíneas com fungos é influenciado por fatores internos e externos do sistema (DOUGLAS, 2010). Um possível fator externo é o acesso dos microrganismos antagonistas ao jardim de fungo. Um exemplo bem conhecido, é o fungo filamentoso do gênero *Escovopsis* (*Ascomycota*: *Hypocreales*). Este fungo coevoluiu com o sistema das formigas atíneas e é considerado um parasita do fungo cultivado (CURRIE et al., 2003; REYNOLDS; CURRIE, 2004). A redução do crescimento do jardim de fungo é o principal sintoma da infecção por *Escovopsis* (CURRIE, 2001) e pode ocasionar a morte de

colônias, especialmente colônias jovens (incipientes), de cerca de 6 - 12 meses de idade (CURRIE; MUELLER; MALLOCH, 1999b). Estudos demonstraram que o parasita produz compostos com ação antifúngica, alguns com a capacidade de degradar as hifas do fungo cultivado pelas formigas, antes mesmo do contato com o parasita (BOYA et al., 2017; DHODARY et al., 2018; REYNOLDS; CURRIE, 2004; VARANDA-HAIFIG et al., 2017). Esses metabólitos foram descritos como: shearininas e os policetídeos emodina e cicloartropsona (BOYA et al., 2017; DHODARY et al., 2018).

Considerado outro antagonista dos jardins, o fungo filamentoso *Escovopsioides nivea* (*Ascomycota*: *Hypocreales*) é filogeneticamente relacionado a *Escovopsis* (AUGUSTIN et al., 2013). Embora compartilhe o mesmo ambiente, estudos demonstraram que *E. nivea* apresenta padrões de interação com os fungos cultivados distintos de *Escovopsis* (OSTI; RODRIGUES, 2018; PIETROBON et al., 2022; VARANDA-HAIFIG et al., 2017). Em ensaios *in vitro* de interação com diferentes fungos mutualistas, *E. nivea* apresentou dois padrões: (i) crescimento sobre o micélio do fungo cultivado pelas formigas e (ii) inibição do crescimento micelial de *E. nivea* por parte dos fungos mutualistas (PIETROBON et al., 2022). Não se sabe se há metabólitos químicos envolvidos nesses padrões de respostas. Nesse contexto, o presente estudo investigou se metabólitos solúveis estão envolvidos na interação, bem como pretendeu determinar o perfil dos compostos químicos produzidos por *E. nivea* e os fungos cultivados pelas formigas atíneas. Para tanto, realizamos experimentos de co-cultivo entre um isolado de *E. nivea* frente a dois fungos mutualistas distintos. Desses co-cultivos, foram preparados extratos brutos, os quais foram incorporados em meio de cultivo para avaliar o crescimento dos três fungos na presença dos possíveis metabólitos envolvidos nas interações. Além disso, os extratos também foram analisados por espectrometria de massa, para tentar determinar o perfil químico dessas amostras.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos utilizados

Foi utilizado o isolado de *E. nivea* LESF 159, proveniente de uma colônia de *Atta sexdens rubropilosa*, empregado no estudo de Pietrobon et al. (2022). O isolado depositado no acervo do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF), UNESP – Rio Claro, SP. O isolado está preservado em glicerol 10% a -80 °C, em suspensão de conídios. Para reativação, os conídios foram transferidos para placas de Petri contendo meio *Potato Dextrose Agar* (PDA,

NEOGEN® Culture Media) e incubados a 25 °C, no escuro, durante sete dias. Adicionalmente, foram utilizados dois isolados de fungos mutualistas, a saber: *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006, obtido de uma colônia de formiga atínea derivada, *Atta sexdens*; e *Myrmecopterula nudihortorum* RBI03, proveniente de uma colônia de formiga atínea basal, *Apterostigma* sp. Esses fungos mutualistas, também estão depositados no acervo do LESF, porém mantidos em repique contínuo a cada 21 dias, em PDA.

Os isolados de fungos mutualistas foram selecionados com base nos extremos de interação observados nos experimentos realizados no Capítulo I: (i) *M. nudihortorum* inibiu o crescimento de *E. nivea* LESF 159 e (ii) *L. gongylophorus* não ocasionou tal inibição (PIETROBON et al., 2022). Durante a pandemia da COVID-19, o isolado *M. nudihortorum* M55 utilizado nos experimentos anteriores perdeu a viabilidade, portanto, foi necessário realizar uma nova coleta de jardim de fungo de *Apterostigma* sp. para reisolar o fungo mutualista.

Isolamento de Myrmecopterula nudihortorum

Foram coletadas colônias de formigas do gênero *Apterostigma*, em uma expedição no Parque Nacional do Itatiaia (PNI, Itatiaia-RJ), no período de 25 a 30 de janeiro de 2021. O PNI apresenta fragmentos de Mata Atlântica, nos quais suspeitávamos a ocorrência de *Apterostigma* sp. Foram encontradas duas colônias desse gênero localizadas em barrancos adjacentes às estradas no interior do PNI. O solo ao redor do jardim de fungo foi removido com cuidado para expor essa estrutura. As colônias de *Apterostigma* sp. apresentaram somente uma câmara, portanto, o único jardim, juntamente com a rainha e as operárias, foi coletado. O jardim foi acondicionado em recipiente plástico, contendo gesso na base para manter a umidade. Um dia após a coleta, fragmentos de 3 mm^3 do jardim foram transferidos em placas de Petri contendo meio de cultivo PDA, suplementando com 150 µg mL^{-1} de cloranfenicol (Sigma). O crescimento micelial nessas placas foi monitorado diariamente e somente as colônias que apresentaram o morfotipo do fungo mutualista de interesse foram selecionadas e semeadas em novas placas de PDA. Obtivemos sucesso de isolamento do fungo mutualista de umas das colônias de *Apterostigma* sp. Após a purificação dessa cultura, denominada de RBI03, o DNA genômico foi extraído e sequenciado pelo método de Sanger, no sequenciador ABI 3500 (Life Technologies). O gene que codifica para a região 26S do rDNA foi sequenciado. O fungo foi identificado como *M. nudihortorum* RBI03, baseado nos resultados de BLAST no NCBI-GenBank.

Inibição de Escovopsioides nivea por Myrmecopterula nudihortorum

Após confirmar que o isolado obtido pertence à espécie *M. nudihortorum*, foi necessário refazer o experimento realizado no estudo de Pietrobon et al. (2022), para saber se o novo isolado também proporcionaria a inibição de *E. nivea* observada anteriormente. Portanto, um novo teste de co-cultivo foi realizado entre o isolado *E. nivea* LESF 159 e *M. nudihortorum* RBI03. Em placas de Petri (150 mm x 15 mm) contendo PDA, foi depositado, a 2 cm da borda, um fragmento de micélio de *M. nudihortorum* RBI03. Essas placas foram incubadas durante 14 dias, a 25 °C, no escuro. Em seguida, na direção oposta, a 8 cm do crescimento do fungo mutualista, foi semeado um fragmento de micélio de *E. nivea* LESF 159. As culturas axênicas dos dois fungos serviram de controle. Todas as placas (de co-cultivo e de controle) foram incubadas durante 14 dias, a 25 °C, no escuro. As áreas de crescimento (cm^2) de *E. nivea* e do fungo mutualista foram digitalizadas e mensuradas no *Image J* v. 1.38 (RASBAND, 2018). Cada tratamento apresentou 10 placas, consideradas réplicas técnicas.

Com o intuito de validar a inibição de *M. nudihortorum* RBI03 frente ao isolado *E. nivea* LESF 159, comparamos esse co-cultivo com aqueles na presença de *M. nudihortorum* M55 e *M. velohortorum* M46, utilizados no estudo de Pietrobon et al. (2022). Para tanto, foram realizadas análises estatísticas utilizando os valores de crescimento dos fungos no 14° dia de experimento, em três diferentes interações: *E. nivea* LESF 159 x *M. nudihortorum* M55, *E. nivea* LESF 159 x *M. velohortorum* M46 e *E. nivea* LESF 159 x *M. nudihortorum* RBI03. Para verificar diferenças no crescimento de *E. nivea* LESF159 na presença e na ausência dos fungos mutualistas, foi realizado o teste de ANOVA, seguido por *post hoc* de Tukey. Essas análises foram utilizadas, pois os dados seguiram a homogeneidade de variâncias e normalidade, ambas confirmadas pelos testes de Bartlett e Shapiro-Wilk, respectivamente. Para analisar o crescimento dos fungos mutualistas, na presença e ausência de *E. nivea*, foi utilizado o teste de *Wilcoxon signed rank test* para as interações de *E. nivea* LESF 159 com *M. nudihortorum* M55 e *M. velohortorum* M46, pois os dados não seguiram uma distribuição normal. Para a interação entre *E. nivea* e *M. nudihortorum* RBI03 foi utilizada a análise *Two Sample t-test*, pois os dados apresentaram uma distribuição normal e homogeneidade de variâncias. As análises estatísticas foram realizadas no R (THE R CORE TEAM, 2017).

Bioensaios de co-cultivo para estudo dos metabólitos

Os bioensaios apresentados nessa seção foram utilizados como base para os demais experimentos descritos neste estudo. O bioensaio de co-cultivo seguiu o método apresentado no Capítulo I, sendo que os confrontos realizados foram: *E. nivea* LESF 159 x *L. gongylophorus* FF2006 e *E. nivea* LESF 159 x *M. nudihortorum* RBI03; além dos controles dessas interações (i.e., fungos em culturas axênicas).

Extração dos metabólitos

Para avaliar se há metabólitos secundários envolvidos na interação entre *E. nivea* e os fungos mutualistas, utilizamos os co-cultivos no 14º dia de experimento. Pré-testes foram realizados para otimizar os métodos utilizados nesse experimento. O micélio de ambos os fungos presentes na área de interação foi removido e o meio de cultivo dessa área foi coletado. Como controle, foi utilizado as placas que continham o crescimento de cada fungo em modo axênico. Os fragmentos com meio foram separados em pequenas porções e transferido para frascos tipo Erlenmeyer. A extração foi realizada com o solvente metanol, sob agitação, durante 12 horas, a temperatura ambiente. O extrato resultante foi filtrado em membranas PTFE e seco a vácuo para contabilização da massa dos extratos brutos. Uma parte desses extratos foi destinada ao teste de incorporação no meio de cultivo e a outra parte para as análises de cromatografia líquida de ultra eficiência e espectrometria de massas (UPLC-qTOF-MS/MS).

Extratos brutos incorporados no meio de cultivo

Os extratos foram solubilizados em 1 mL de Etanol P.A. mais 9 mL de água ultra-pura autoclavada. Os frascos foram agitados até que todos os extratos fossem solubilizados por completo. Obtivemos seis diferentes tipos de extratos (Tabela 1), os quais foram adicionados, separadamente, em frascos contendo meio PDA a 50 °C (perto do ponto de verter). Um total de 15 mL de meio de cultivo contendo os extratos foi vertido em placas de Petri (60 mm x15 mm). Após a solidificação do meio, no centro da placa foi semeado um fragmento de micélio dos fungos utilizados nas interações.

Um total de dez combinações (tratamentos) foi realizado nesse experimento, sendo que cada uma apresentou dez réplicas técnicas (Tabela 1). As placas foram incubadas a 25 °C, no

escuro, e a área do crescimento (cm²) dos fungos foi digitalizada e mensurada no Image J v. 1.38 (RASBAND, 2018). Os valores das áreas de crescimento foram analisados segundo o teste de *Kruskal-Wallis*, para os dados que não seguiram uma distribuição normal. Para os dados que seguiram tal distribuição, foi utilizado o teste de ANOVA.

A concentração total dos extratos em cada placa foi de 500 µg mL^{-1} (RIOS et al., 1988). O emprego dessa concentração pode ser exemplificado da seguinte forma: considerando o extrato proveniente do cultivo de *E. nivea* em cultura axênica, este foi utilizado para preparar 20 placas (dez foram dispostas para crescer o fungo *L. gongylophorus* FF2006 e outras dez para crescer *M. nudihortorum* RBI03). Portanto, foram necessários 300 mL de meio de cultivo com extrato (15 mL para cada placa). Considerando que utilizamos a concentração de 500 µg mL^{-1}, então, foram adicionados 150 mg de extrato em cada placa. Neste experimento, o crescimento dos fungos no meio que continha o extrato proveniente somente do meio PDA foi considerado como controle (branco).

Análise dos extratos por espectrometria de massa

Para análise do perfil metabólico das frações por cromatografia líquida de ultra eficiência e espectrometria de massas in tandem, estas foram ressuspendidas em acetonitrila (ACN) na concentração de 1 mg mL^{-1} e injetadas no equipamento Acquity UPLC-H, Class – Xevo G2-XS qTOF (Waters). A fase estacionária utilizada foi uma coluna Acquity UPLC BEH C 18 (1,7 µm, 2,1 x 100 mm). Para fase móvel foram utilizados um gradiente de ACN + 0,1% ácido fórmico (A) e outro de H_2O + 0.1% ácido fórmico (B); primeiramente indo de 10% a 100% de A (por 10 min), seguido de 100% de A em modo isocrático (por 1 min) e, para fase de reequilíbrio, foi utilizado 5% de A e 95% de B (por 1 min). A vazão foi de 400 µL min^{-1}.

Dados no nível MS1 foram adquiridos na faixa de m/z entre 100 e 1500, com tempo de scan de 150 ms. A aquisição de dados no nível MS2 foi realizada em modo DDA (Data Dependent Acquisition), com três scans MS2 adquiridos por ciclo a partir dos cinco íons MS1 mais abundantes. A energia de ionização foi 1,2 Kv, os valores de m/z foram gravados em modo centróide e as detecções foram realizadas em modo positivo. Brancos referentes aos solventes utilizados foram analisados nas mesmas condições. Os espectros resultantes foram analisados, primeiramente, com a ferramenta Mzmine 3, seguida de análises no MetaboAnalist 5.0, Sirius e na Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) com Ion Identity.

Testes de atividade fungicida ou fungistática

Este experimento foi realizado para avaliar se a inibição ocorrida nas interações foi de caráter fungicida (causa a morte do fungo) ou fungistática (interrompe ou retarda o crescimento do fungo). Das mesmas interações dos bioensaios de co-cultivo (*E. nivea* LESF159, *L. gongylophorus* FF2006 e *M. nudihortorum* RBI03), após os 14 dias de experimento, fragmentos de micélio foram retirados das áreas onde os fungos estavam mais próximos e, separadamente, depositados em placas de 60 mm x 15 mm contendo PDA e incubadas a 25 °C, no escuro. As placas foram monitoradas diariamente e, caso identificado crescimento, os extratos correspondentes foram considerados como de atividade fungistática.

Análise microscópica da interação

Realizamos análises de microscopia de campo claro com o objetivo de identificar mudanças morfológicas nas estruturas dos fungos, devido às inibições. Fragmentos de micélio de *E. nivea* LESF 159 foram retirados das placas de interações e dispostos em lâminas de microscopia. Tais fragmentos foram corados com lacto fucsina e visualizados no microscópio Leica DM 750, no aumento de 40x. Os fragmentos foram retirados de diferentes locais das placas de co-cultivo, a saber: (i) a área na qual *E. nivea* se aproxima dos fungos mutualistas e (ii) em uma área mais distante dessa interação, na base da colônia (que tratamos como a área controle). Essas lâminas foram visualmente analisadas e os conidióforos, clamidósporos e aleuroconídios foram medidos para avaliar se houve ou não mudanças morfológicas, em relação as estruturas medidas da área controle. Obtivemos 30 medições de cada estrutura, quando possível. Diferenças nas medidas das estruturas da área de interação vs a área controle foram avaliadas com *Wilcoxon signed rank test*, para os dados que não seguiram a normalidade, e *Paired t-test* para dados que seguiram distribuição normal.

RESULTADOS

Myrmecopterula nudihortorum RBI03 inibe E. nivea

O crescimento micelial de *E. nivea* foi inibido na presença de *M. nudihortorum* RBI03, quando comparado com o crescimento na ausência deste (Tukey *posthoc* $P < 0.05$, Tabela 2).

Esse resultado foi obtido comparando o crescimento de *E. nivea* no 14° dia de experimento, pois a intenção era observar se haveria contato entre os micélios dos fungos, o que de fato não ocorreu. Tal inibição de *E. nivea* sem contato com o micélio de *M. nudihortorum* RBI03 perdurou até o 21° dia de experimento (Figura S1). No geral, *M. nudihortorum* RBI03 foi o fungo que mais inibiu o crescimento de *E. nivea*, quando comparada à inibição ocasionada por *M. velohortorum* M46 e aquela demonstrada pelo isolado original de *M. nudihortorum* M55 (ANOVA, Tukey *posthoc* $P< 0.05$, Tabela 2). Como o objetivo desse experimento era o de confirmar se *M. nudihortorum* RBI03 inibe *E. nivea*, prosseguimos com os demais experimentos de co-cultivo com esse isolado de fungo mutualista.

Os experimentos realizados no Capítulo I demonstraram que o crescimento de *M. velohortorum* M46 e *M. nudihortorum* M55 também foi inibido na presença de *E. nivea* LESF 159, quando comparado ao controle, ou seja, crescimento dos fungos mutualistas na ausência do antagonista (*Kruskal Wallis test*, $P< 0,05$, Tabela S4 do Capítulo I). Entretanto, no experimento de revalidação o isolado *M. nudihortorum* RBI03 não apresentou diferença significativa no seu crescimento, quando cultivado na presença de *E. nivea* LESF159 (*Wilcoxon rank test*, $P> 0,05$, Figura 1).

Efeito fungistático das interações

Todos os fragmentos de micélio de *E. nivea* e dos fungos mutualistas removidos das placas de co-cultivo apresentaram crescimento, quando semeados em novas placas de PDA (Figura 2). Tal resultado sugere a ação fungistática dos efeitos observados nos co-cultivos (Figura 2).

Fungos mutualistas utilizam metabólitos solúveis para inibir E. nivea

Neste experimento foi analisado o crescimento micelial (em cm^2) de *E. nivea*, de *M. nudihortorum* RBI03 e de *L. gongylophorus* FF2006, na presença dos extratos obtidos nos co-cultivos entre esses fungos (Tabela 1). O crescimento de *E. nivea* foi inibido somente nos extratos originados dos co-cultivos, quando comparado com o crescimento no controle (*Kruskal-Wallis*, $P< 0,05$, Tabela 3; Figura S2). Os dois fungos mutualistas não apresentaram diferenças no crescimento em nenhum dos tratamentos (ANOVA, $P> 0,05$, Tabela 3; Figura S2).

Estruturas microscópicas de E. nivea apresentam alterações na área de inibição

As estruturas microscópicas de *E. nivea* que foram examinadas nas áreas de interação com o fungo mutualista *M. nudihortorum* RBI03 (cultivar que inibiu *E. nivea*) apresentaram alterações na morfologia (Figura 3). Por exemplo, os clamidósporos encontrados na área de inibição apresentaram tamanhos (comprimento e largura) menores, quando comparados com as mesmas estruturas presentes na área mais afastada da interação (*Wilcoxon signed rank test*, $P< 0,05$, Figura 3). Por outro lado, os aleuroconídios apresentaram maior tamanho próximos à área de inibição (*Wilcoxon signed rank test*, $P< 0,05$, Figura 3). O comprimento e largura dos conidióforos próximas à área de inibição não apresentaram diferenças significativas, quando comparado com as mesmas estruturas distantes da zona de inibição (*Paired t-test*, $P>0,05$, Figura 3).

Na interação de *E. nivea* com *L. gongylophorus* FF2006 (que não inibiu *E. nivea*), os clamidósporos não apresentaram diferenças de tamanho entre as duas regiões avaliadas (*Wilcoxon signed rank test*, $P> 0,05$). As demais estruturas de *E. nivea* não foram encontradas em ambas as áreas da placa ou em quantidades suficientes para realizar análise estatística.

Análise metabolômica

Houve um atraso na obtenção dos dados, devido aos problemas decorrentes da pandemia (restrição de acesso aos laboratórios) e à problemas técnicos no UPLC-qTOF-MS/MS utilizado nas análises químicas. Portanto, as análises metabolômicas estão em andamento.

DISCUSSÃO

Escovopsioides nivea é um antagonista dos fungos cultivados pelas formigas atíneas. Em contrapartida, os cultivares das atíneas apresentam respostas defensivas frente a *E. nivea*. O objetivo do presente estudo foi entender se metabólitos solúveis estão envolvidos nos padrões de inibição observados nos experimentos descritos no Capítulo I (PIETROBON et al., 2022). Nossos resultados sugerem que metabólitos solúveis podem estar envolvidos na interação, visto que extratos advindos dos co-cultivos entre *E. nivea*-fungos mutualistas apresentaram atividade inibitória (fungistática) em *E. nivea*. Embora a determinação química esteja em andamento, os

resultados sugerem que metabólitos derivados dos fungos mutualistas estão presentes nos extratos.

Nos bioensaios de revalidação, *E. nivea* foi inibido por *M. nudihortorum* RBI03, confirmando os resultados obtidos por Pietrobon et al. (2022). Suspeitamos que a inibição de *E. nivea* foi devida a *M. nudihortorum* apresentar um sistema de defesa diferente (CHRISTOPHER et al., 2021) daquele encontrado nos fungos das formigas atíneas derivadas (FERNANDÉZ-MARÍN et al., 2015). Esse sistema de defesa diferenciado pode estar relacionado aos perfis químicos distintos apresentados pelos fungos das atíneas basais (WANG; MUELLER; CLARDY, 1998; BATEY et al., 2020), quando comparados aos compostos produzidos por *L. gongylophorus* (SOUSA et al., 2020). Adicionalmente, a distância filogenética de *L. gongylophorus* e *M. nudihortorum* (LEAL-DUTRA et al., 2020) também pode ser responsável pelos resultados observados, visto que esses fungos apresentam evolução distinta e os mecanismos de defesa desses fungos evoluíram de modo independente (FUKUDA et al., 2021).

A princípio, suspeitamos que a inibição do crescimento de *E. nivea*, observada no experimento de revalidação, talvez esteja relacionada à presença de metabólitos difundidos no meio. Segundo os bioensaios com os extratos, o crescimento de *E. nivea* foi inibido nas placas que continham os extratos provenientes do co-cultivo com *M. nudihortorum* RBI03, reforçando nossa hipótese. É importante salientar que, essa inibição foi visualizada e analisada no segundo dia de experimento (Figura S2), pois no quinto dia, *E. nivea* cresceu e preencheu toda a placa de Petri contendo o meio com os extratos, semelhante ao crescimento observado nas placas controle que não tinham o extrato incorporado de nenhum fungo (Tabela 2). Portanto, é possível argumentar que a inibição observada no experimento de revalidação e que perdurou por 21 dias (Figura S1), pode ser devida não somente a metabólitos, mas também a outros fatores, como competição por nutrientes ou compostos voláteis, sendo estes já relatados para os fungos cultivados pelas formigas cortadeiras (MASIULIONIS; PAGNOCCA 2020; SOUSA et al., 2020).

Quando extratos provenientes dos co-cultivos entre *E. nivea* e *L. gongylophorus* FF2006 foram incorporados no meio e o antagonista semeado neste, observamos inibição do crescimento desse fungo. Isso não era esperado, pois *L. gongylophorus* não inibiu *E nivea* nos experimentos de co-cultivo realizados no Capítulo I. É possível que o fungo mutualista produza metabólitos difusíveis relacionados à defesa (HERVEY; NAIR 1979; SILVA et al., 2005), porém só produza esses compostos após o contato com o antagonista. Como esse experimento foi analisado no 14º dia, quando o contato entre os fungos já havia acontecido, e a área de coleta

dos extratos foi justamente próxima ao contato, então é possível que os metabólitos responsáveis pela inibição de *E. nivea* concentraram nessa região (BERTRAND et al., 2013).

Escovopsioides nivea não foi inibido por nenhum dos extratos provenientes das culturas axênicas dos fungos mutualistas. Esse resultado sugere que, se há metabólitos nos extratos, esses são produzidos pelos fungos mutualistas somente quando em confronto com o antagonista. Por outro lado, *E. nivea* não apresentou estímulo no crescimento em nenhum dos extratos dos cultivos axênicos com *L. gongylophorus* e *M. nudihortorum* (Tabela 2). Estudos demonstraram que extratos de cultivo de *Leucoagaricus* estimulam o crescimento de *Escovopsis* (FOLGARAIT; MARFETÁN; CAFARO, 2011; OLIVEIRA, 2020). Contrário desse fungo parasita, *E. nivea* não apresenta tal estímulo, reforçando a ideia de que esse antagonista apresenta um padrão de interação diferente daqueles demonstrados por *Escovopsis* (PIETROBON et al., 2022).

Tanto *L. gongylophorus* FF2006, quanto *M. nudihortorum* RBI03 não apresentaram inibição do crescimento, independente dos extratos em que foram semeados. No co-cultivo de revalidação com *E. nivea*, *M. nudihortorum* RBI03 não foi inibido (Figura 1), portanto, era esperado que os extratos de *E. nivea* também não inibissem esse cultivar, o que de fato ocorreu (Tabela 3). Com relação ao fungo *L. gongylophorus* FF2006, o esperado era que esse fosse inibido (OSTI; RODRIGUES, 2018; PIETROBON et al., 2022; VARANDA-HAIFIG et al., 2017), quando confrontado com os extratos da interação com *E. nivea*, porém isso não foi observado. Segundo o estudo de Varanda-Hafig et al. (2017), o extrato aquoso de *E. nivea* inibiu o crescimento de *L. gongylophorus* FF2006, porém, em menor intensidade do que a inibição no co-cultivo. Embora o estudo de Varanda-Haifig et al. (2017) e o presente trabalho não são diretamente comparáveis, pois um utilizou extrato aquoso e o outro extrato orgânico, podemos especular que a inibição dos fungos mutualistas por *E. nivea*, observada nos experimentos de co-cultivos realizados no Capítulo I e nos estudos de Varanda-Haifig et al. (2017) e Osti e Rodrigues (2018), pode ser devida não somente a presença de metabólitos solúveis, mas também a outros fatores, como substâncias voláteis, competição por nutrientes, ação enzimática ou uma combinação desses.

Foi possível observar uma diferença na quantidade de estruturas microscópicas de *E. nivea*, frente aos diferentes fungos mutualistas. Quando *E. nivea* foi semeado na presença de *L. gongylophorus* FF2006, o antagonista apresentou um maior número de clamidósporos, quando comparado com a quantidade dessas estruturas na presença de *M. nudihortorum* RBI03 (dados não apresentados). Nesta última interação, as estruturas mais encontradas foram conidióforos e aleuroconídios (dados não apresentados). No caso específico da interação com *M.*

nudihortorum RBI03, também notamos uma mudança no tamanho dessas estruturas (Figura 3). Possivelmente, esse aumento ocorreu em resposta ao ambiente desfavorável, o que levou ao desenvolvimento de uma estratégia de sobrevivência, pois os conidióforos são as estruturas que sustentam os conídios, os quais são responsáveis pela reprodução (RUISI et al., 2007).

CONCLUSÕES

É provável que a inibição do crescimento micelial de *E. nivea*, frente aos fungos mutualistas, seja devida à presença de compostos solúveis no meio de cultivo. A inibição foi observada nos extratos advindos das placas de co-cultivo entre *E. nivea* e os fungos mutualistas, sugerindo que, se há metabólitos envolvidos, esses possivelmente são produzidos pelos fungos cultivados pelas atíneas. Especulamos que esses metabólitos sejam resultado de um processo de defesa desses fungos. Por outro lado, a inibição dos fungos mutualistas ocasionada por *E. nivea*, observada nos experimentos do Capítulo I, pode ser resultante de outros fatores, incluindo substâncias voláteis, competição por nutrientes, produção de enzimas, quando os fungos mutualistas crescem na presença de *E. nivea*.

A análise metabolômica fornecerá pistas sobre os compostos que foram produzidos nos co-cultivos e no crescimento axênico dos fungos, permitindo comparar os perfis de metabólitos. Portanto, esperamos avançar no entendimento dos mecanismos químicos envolvidos na interação de *E. nivea* com os fungos mutualistas.

REFERÊNCIAS

ANGELI-PAPA, J. La culture d'e um champignon par les fourmis attinis: mise in evidence the phènomenes d'antibiose dansle nid. **Cryptogamie Mycologie**, v. 5, [s*/n*], p. 147–154, 1984.

AUGUSTIN, J. O.; GROENWALD, J. Z.; NASCIMENTO, R. J.; MIZBURTI, E. S. G.; BARRETO, R. W.; ELLIOT, S. L.; EVANS, H. C. Yet more "weeds" in the gardens: fungal novelties from nests of leaf-cutting ants. **Plos One**, v. 8, n. 9, p. e82265, 2013.

AYLWARD, F. O.; BURNUM-JOHNSON, K. E.; TRINGE, S.G.; TEILING, C.; TREMMEL, D. M.; MOELLER, J. A.; SCOTT, J. J.; BARRY, K.W.; PIEHOWSKI, P. D.; NICORA, C. D.; MALFATTI, S. A.; MONROE, M. E.; PURVINE, S. O.; GOODWIN, L. A.; SMITH, R. D.; WEINSTOCK, G. M.; GERARDO, N. M.; SUEN, A. G.; LIPTON, M. S.; CURRIE, C. R. *Leucoagaricus gongylophorus* produces diverse enzymes for the degradation of recalcitrant plant polymers in leaf-cutter ant fungus gardens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 12, p. 3770–3778, 2013.

BARKA, E. A.; VATSA, P.; SANCHEZ, L.; GAVEAU-VAILLANT, N.; JACQUARD, C.; KLENK, H. P.; CLEMENT, C.; OUHDOUCH, Y.; VAN WEZEL, G. P. Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, p. 1–43, 2016.

BATEY, S. F. D.; GRECO, C.; HUTCHINGS, M. I.; WILKINSON, B. Chemical warfare between fungus-growing ants and their pathogens. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 59, n. 12, p. 172–181, 2020.

BENNETT, J.W.; HUNG, R.; LEE, S.; PADHI, S. Fungal and bacterial volatile organic compounds: an overview and their role as ecological signaling agents. *In:* HOCK, B. **Fungal Association**: The Mycota IX, 2nd ed., Heidelberg: Springer-Verlag Berlin, 2012. p. 373–393.

BERTRAND, S.; SCHUMPP, O.; BOHNI, N.; BUJARDA, A.; AZZOLLINI, A.; MONOD, M.; GINDRO, K.; WOLFENDER, JL. Detection of metabolite induction in fungal co-cultures on solid media by high-throughput differential ultra-high pressure liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. **Journal of Chromatography A**, v. 1292, n. 3, p. 219–228, 2013.

BOYA, C. A.; FERNANDEZ-MARÍN, H.; MEJÍA, L. C.; SPADAFORA, C.; DORRESTEIN, P. C.; GUTIERREZ, M. Imaging mass spectrometry and MS/MS molecular networking reveals chemical interactions among cuticular bacteria and pathogenic fungi associated with fungus-growing ants. **Scientific Reports**, v. 7, n. 5604, p. 5604, 2017.

CALDERA, E. J.; CURRIE, C. R. The population structure of antibiotic-producing bacterial symbionts of *Apterostigma dentigerum* ants: impacts of coevolution and multipartite symbiosis. **The American Naturalist**, v. 180, n. 5, p. 604–607, 2012.

CHRISTOPHER, Y.; WCISLO, W. T.; MARTÍNEZ-LUIS, S.; HUGHES, W. O. H.; GERARDO, N. M.; FERNÁNDEZ-MARÍN, H. Disease management in two sympatric *Apterostigma* fungus-growing ants for controlling the parasitic fungus *Escovopsis*. **Ecology and Evolution**, v. 11, n. 11, p. 6041–6052, 2021.

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

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

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

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

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

DOUGLAS, A. E. **The symbiotic habit.** 1st edn. New York: Princeton University Press, 2010. p. 232.

FERNANDÉZ-MARÍN, H.; ZIMMERMAN, J. K.; NASH, D. R.; BOOMSMA, J. J.; WCISLO, W. T. Reduced biological control and enhanced chemical pest management in the evolution of fungus farming in ants. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 276, n. 1665, p. 2263–2269, 2009.

FERNANDÉZ-MARÍN, H.; NASH, D. R.; HIGGINBOTHAM, S.; ESTRADA, C.; VAN ZWEDEN, J. S.; D'ETTORRE, P.; WCISLO, W. T.; BOOMSMA, J. J. Functional role of phenylacetic acid from metapleural gland secretions in controlling fungal pathogens in evolutionarily derived leaf-cutting ants. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 282, n. 1807, p. 20150212, 2015.

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

FRANCOEUR, C. B.; MAY, D. S.; THAIRU, M. W.; HOANG, D. Q.; PANTHOFER, O.; BUGNI, T. S.; PUPO, M. T.; CLARDY, J.; PINTO-TOMÁS, A. A.; CURRIE, C. R. *Burkholderia* from fungus gardens of fungus-growing ants produces antifungals that inhibit the specialized parasite *Escovopsis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 87, n. 14, p. e00178-21, 2021.

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

FUKUDA, T. T. H.; HELFRICH, E. J. N.; MEVERS, E.; MELO, W. G. P.; VAN ARNAM, E. B.; ANDES, D. R.; CURRIE, C. R.; PUPO, M. T.; CLARDY, J. Specialized metabolites reveal evolutionary history and geographic dispersion of a multilateral symbiosis. **ACS Central Science**, v. 7, n. 2, p. 292–299, 2021.

HERVEY, A.; ROBERSON, C. T.; LEONG, I. Studies on fungi cultivated by ants. **Brittonia** v. 29, n. 2, p. 226–236, 1977.

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

KOOIJ, P.W.; ROGOWSKA-WRZESINSKA, A.; HOFFMANN, D.; ROEPSTORFF, P.; BOOMSMA, J. J.; SCHIØTT, M. *Leucoagaricus gongylophorus* uses leaf-cutting ants to vector proteolytic enzymes towards new plant substrate. **The ISME Journal**, v. 8, n. 5, p.1032–1040, 2014.

KÜES, U.; KHONSUNTIA, W.; SUBBA, S.; DORNTE, B. Volatiles in communication of Agaricomycetes. *In*: ANKE, T.; SCHÜFFLER, A. (Eds.) **Physiology and Genetics**. The Mycota XV, 2nd edn., p. 149–212, 2018.

LEAL-DUTRA, C. A.; GRIFFITH, G. W.; NEVES, M. A.; MCLAUGHLIN, D. J.; MCLAUGHLIN, E. G.; CLASEN, L. A.; DENTINGER, B. T. M. Reclassification of Pterulaceae Corner (Basidiomycota: Agaricales) introducing the ant-associated genus *Myrmecopterula* gen. nov., *Phaeopterula* Henn. and the corticioid *Radulomycetaceae* fam. nov. **IMA Fungus**, v. 11, n. 2, 2020. https://doi.org/10.1186/s43008-019-0022-6

MARSH, S. E.; POULSEN, M.; GOROSITO, N. B.; PINTO-TOMÁS, A. A.; MASIULIONIS, V. E.; CURRIE, C. R. Association between *Pseudonocardia* symbionts and *Atta* leaf-cutting ants suggested by improved isolation methods. **International Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 17–25, 2013.

MASIULIONIS, V. E.; PAGNOCCA, F. C. In vitro study of volatile organic compounds produced by the mutualistic fungus of leaf-cutter ants and the antagonist *Escovopsis*. **Fungal Ecology**, v. 48, n. 12, p. 1009862, 2020.

OLIVEIRA, K. B. **Metabólitos do fungo mutualista das formigas atíneas como mediadores da interação com o parasita *Escovopsis***. Orientador: Andre Rodrigues. 2020. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho- UNESP, Rio Claro, 2020.

OSTI, J. F.; RODRIGUES, A. *Escovopsioides* as a fungal antagonist of the fungus cultivated by leafcutter ants. **BMC Microbiology**, v. 18, n. 130, p. 130, 2018.

PIETROBON, T. C.; KOOIJ, P. W.; MONTOYA, Q. V.; RODRIGUES, A. *Escovopsioides nivea* is a non-specific antagonistic symbiont of ant-fungal crops. **Fungal Ecology**, v. 56, n. 4, p. 101140, 2022.

RASBAND, W. S. **ImageJ, U. S**. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, https://imagej.nih.gov/ij/, 2018.

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.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal Ethnopharmacology**, v. 23, n. 2-3, p. 127–149, 1988.

RUISI, S.; BARRECA, D.; SELBMANN, L.; ZUCCONI, L.; ONOFRI, S. Fungi in Antarctica. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 6, [*s/n*], p. 127–141, 2007.

SILVA, A.; BACCI JR. M.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. Starch metabolism in *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. **Microbiological Research**, v. 161, n. 4, p. 299–303, 2005.

SIQUEIRA, C. G.; BACCI, M. Jr.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. A.; 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.

SOUSA, K. K. A.; CATALANI, G. C.; GIANETI, T. M. R.; CAMARGO, R. S.; CALDATO, N. A volatile semiochemical released by the fungus garden of leaf-cutting ants. **Florida Entomologist**, v. 103, n. 1, p. 1–8, 2020.

THE R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. http://www.R-project.org/, 2017.

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**, v. 110, n. 4, p. 593–605, 2017.

WANG, Y.; MUELLER, U. G.; CLARDY, J. Antifungal diketopiperazines from symbiotic fungus of fungus-growing ants *Cyphomyrmex minutus*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, n. 4, p. 935–941, 1998.

WEBER, N. A. The fungus-culturing behavior of ants. **American Zoologist**, v. 12, [s*/n*], p. 577–587, 1972.

ZHANG, J. B.; WU, A. B.; HE, W. J.; YUAN, Q. S.; HE, J. D.; LIAO, Y. C. The *Shewanella* algae strain YM8 produces volatiles with strong inhibition activity against *Aspergillus* pathogens and aflatoxins. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 1091, 2015. doi:10.3389/fmicb.2015.01091

Tabela 1. Combinações utilizadas para o experimento de extratos brutos incorporados no meio de cultivo. Extratos utilizados nas combinações estão marcados com "X".

Fungos semeados no meio	**Extratos adicionados no meio de cultivo**					
	LESF159	FF2006	RBI03	LESF159 x FF2006	LESF159 x RBI03	Controle (extrato PDA)
LESF 159		X	X	X	X	X
FF2006	X		X	X	X	X
RBI03	X	X		X	X	X

LESF 159: *Escovopsioides nivea*; FF2006: *Leucoagaricus gongylophorus*; RBI03: *Myrmecopterula nudihortorum*.

Tabela 2. Crescimento micelial de *Escovopsioides nivea* LESF 159 (área: média e erro padrão, em cm²), no 14º dia de confronto com os fungos mutualistas das formigas atíneas. Letras distintas nas colunas indicam diferenças estatísticas segundo o teste *post hoc* de Tukey.

Tratamentos	**Crescimento de *E. nivea* (cm²)**
Controle (sem fungo mutualista)	153,04 ± 3,29 a
Myrmecopterula nudihortorum M55	132,26 ± 5,29 a
Myrmecopterula velohortorum M46	103,80 ± 8,07 b
Myrmecopterula nudihortorum RBI03	72,64 ± 4,06 c

Tabela 3. Crescimento micelial (área: média e erro padrão, em cm²) de *Escovopsioides nivea*, *Myrmecopterula nudihortorum* e *Leucoagaricus gongylophorus* nos meios de cultivo com os extratos incorporados. Letras distintas nas colunas indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$), segundo os testes utilizados (ver Material e Métodos).

Extratos adicionados no meio	**Crescimento (em cm²) de**		
	***E. nivea* LESF 159**	***M. nudihortorum* RBI03**	***L. gongylophorus* FF2006**
Controle (extrato de PDA)	25,65 ± 1,34 a	2,01 ± 0,10 a	3,75 ± 0,20 a
M. nudihortorum RBI03	20,20 ± 1,84 a		3,66 ± 0,11 a
L. gongylophorus	23,32 ± 1,69 a	1,63 ± 0,06 a	
E. nivea		1,67 ± 0,08 a	3,57 ± 0,17 a
E. nivea x *M. nudihortorum* RBI03	16,06 ± 0,78 b	1,70 ± 0,07 a	3,84 ± 0,11 a
E. nivea x *L. gongylophorus* FF2006	18,40 ± 1,69 b	1,98 ± 0,08 a	3,42 ± 0,08 a

Figura 1. Crescimento micelial dos fungos mutualistas (áreas em cm^2) no 14º dia de confronto pareado com *Escovopsioides nivea* LESF 159 (laranja) e na ausência deste (azul). Letras distintas para cada par de *boxplots* indicam diferenças significativas, segundo o *Wilcoxon rank test* ($P< 0,05$).

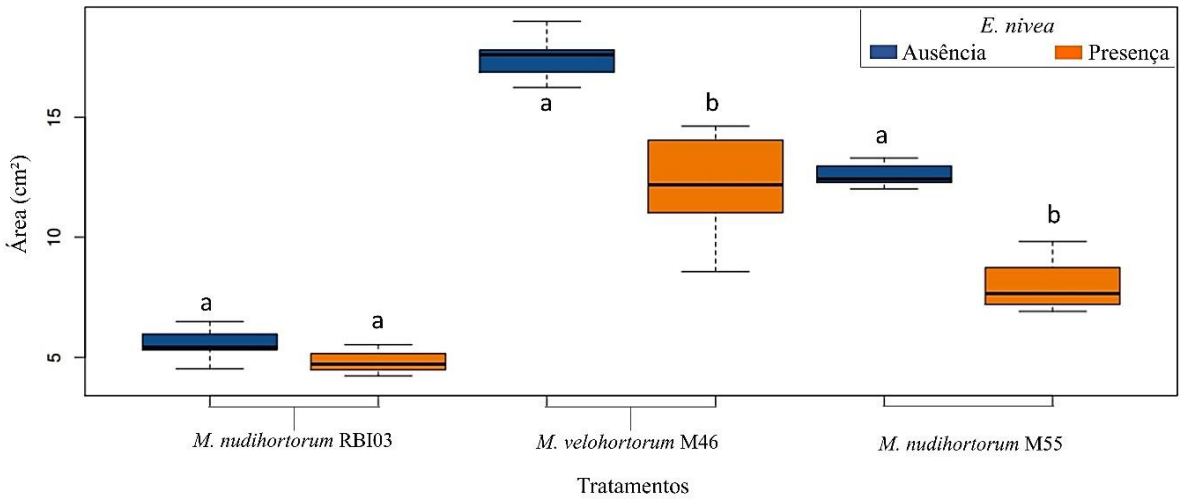


Figura 2. Crescimento confirmado de todos os fungos após fragmentos serem removidos das placas de co-cultivo. Na interação *Leucoagaricus gongylophorus* x *Escovopsioides nivea*, somente o fungo mutualista foi inibido. Na interação *Myrmecopterula nudihortorum* x *E. nivea*, somente o antagonista foi inibido. Assim, essas inibições foram categorizadas como fungistáticas, pois os fragmentos desses fungos apresentaram crescimento quando transferidos para novas placas com meio PDA.

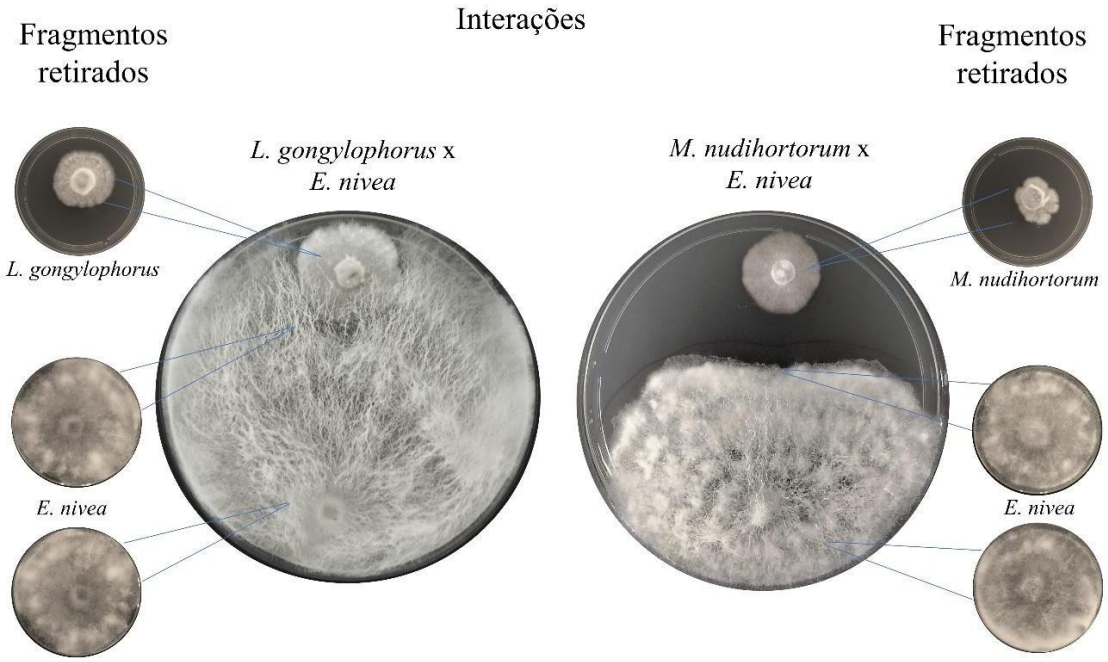
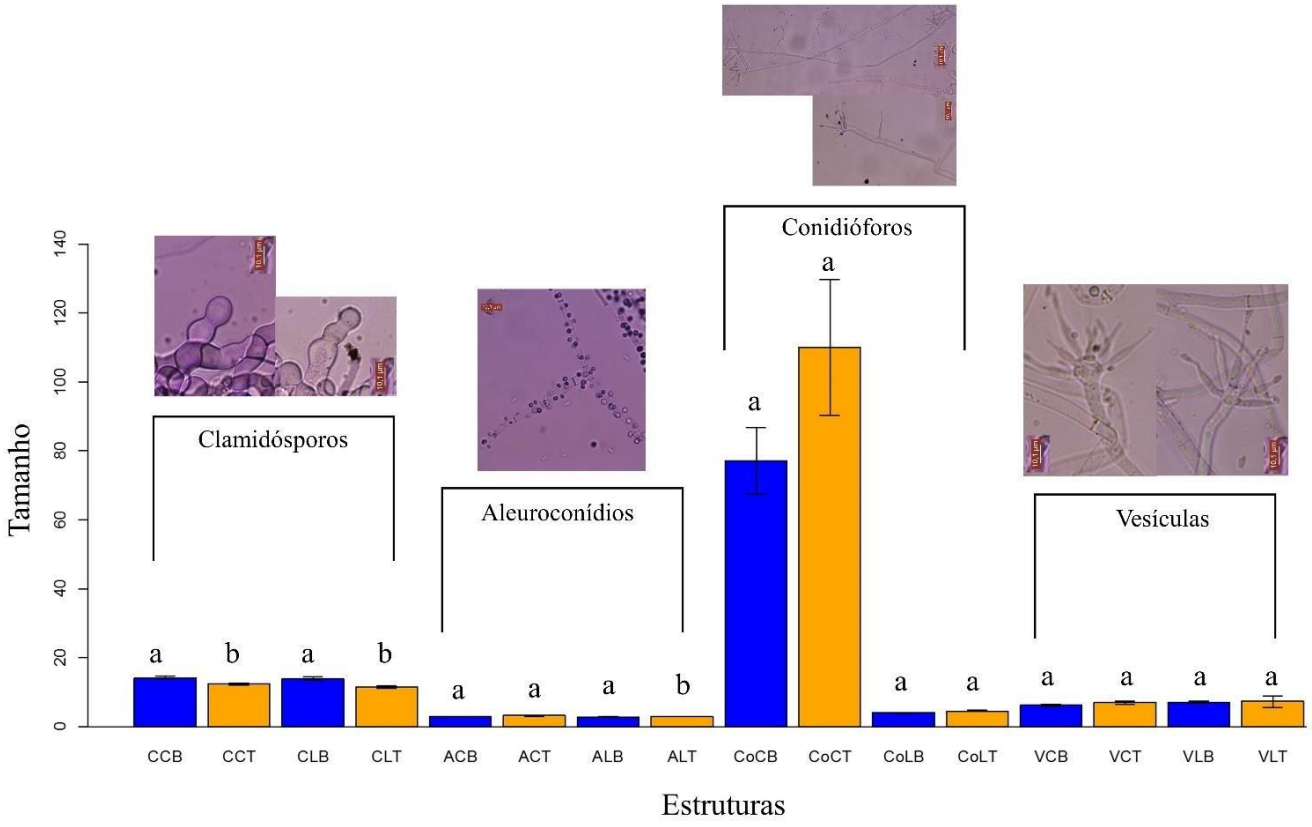


Figura 3. Mediana (± erro padrão) dos valores de medição das estruturas microscópicas de *Escovopsioides nivea* (em µm). Barras azuis são as medidas das estruturas examinadas no local mais afastado da interação com o fungo mutualista *Myrmecopterula nudihortorum*. Barras laranjas são as medições das estruturas na região da interação. Letras distintas para cada par de barras significam diferenças significativas (*Wilcoxon signed rank test*, $P < 0,05$).



CCB: Comprimento de clamidósporos afastados da interação; CCT: Comprimento de clamidósporos na interação; CLB: Largura de clamidósporos afastados da interação; CLT: Largura de clamidósporos na interação; ACB: Comprimento de aleuroconídios afastados da interação; ACT: Comprimento de aleuroconídios na interação; ALB: Largura de aleuroconídios afastados da interação; ALT: Largura de aleuroconídios na interação; CoCB: Comprimento de conidióforos afastados da interação; CoCT: Comprimento de conidióforos na interação; CoLB: Largura de conidióforos afastados da interação; CoLT: Largura de conidióforos na interação; VCB: Comprimento das vesículas afastadas da interação; VCT: Comprimento das vesículas na interação; VLB: Largura das vesículas afastadas da interação; VLT: Largura das vesículas na interação. Todos os valores foram divididos por 1000 para uma melhor estética do gráfico.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Figura S1. Inibição do crescimento de *Escovopsioides nivea* frente a *Myrmecopterula nudihortorum*, quando comparado ao controle (Tukey *post hoc*, $P < 0,05$). Crescimento de *M. nudihortorum* foi semelhante ao controle (*Wilcoxon rank test*, $P > 0,05$). Experimentos com 14° dias (Tukey *post hoc*, $P > 0,05$). Inibição perdurou durante 21 dias de observação.

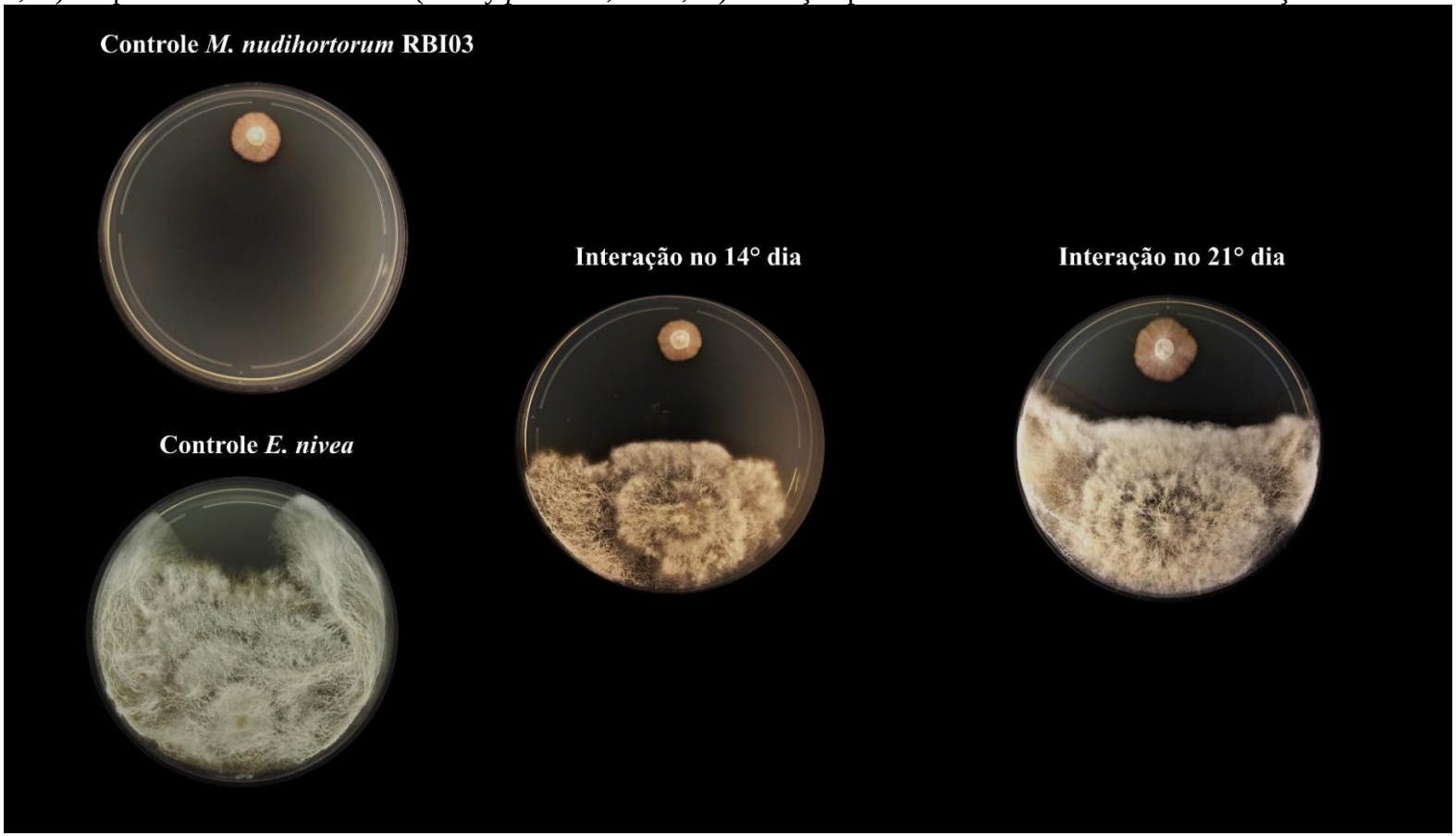
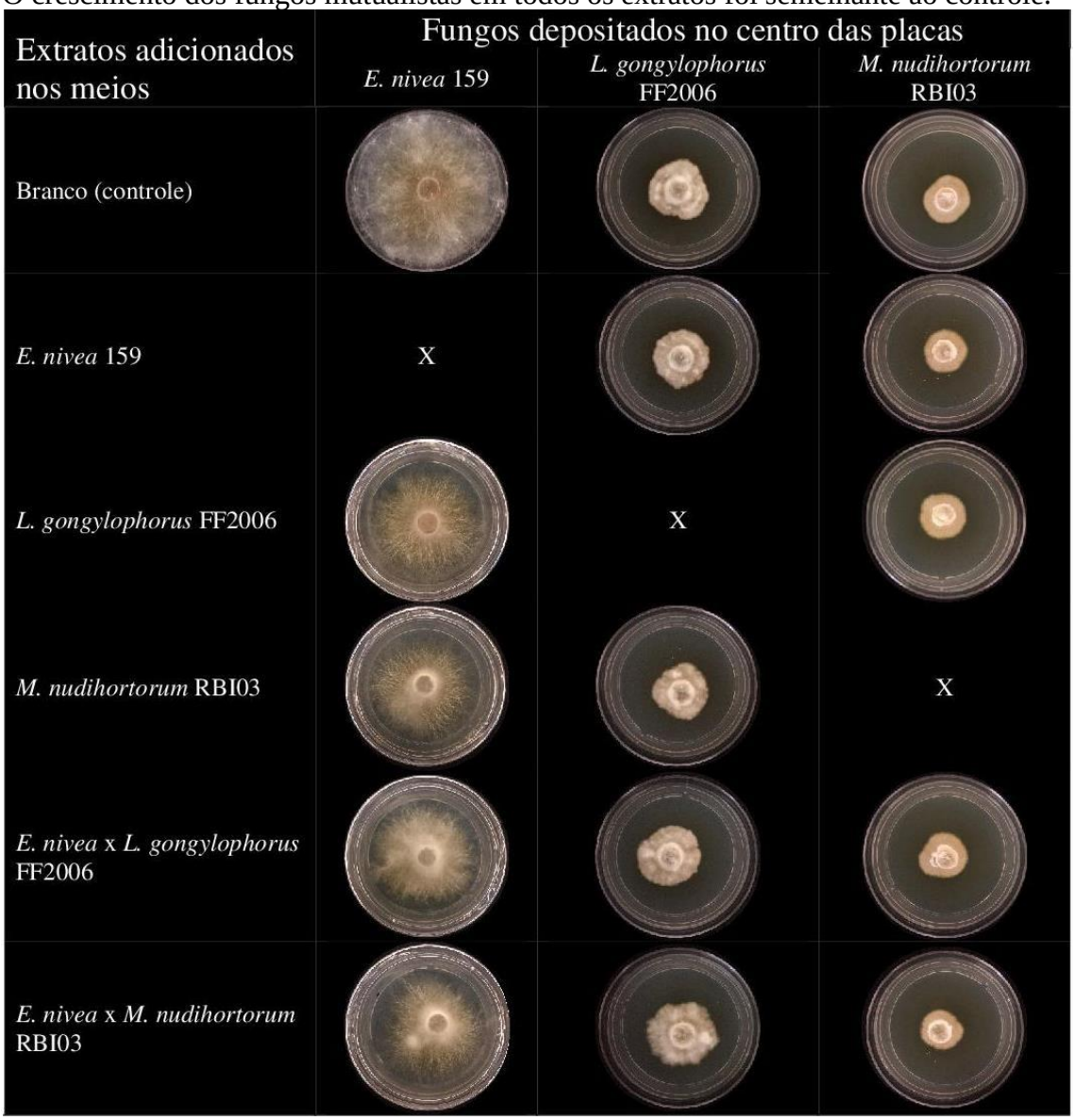


Figura S2. Experimento com extratos incorporados no meio de cultivo. Imagens representativas demonstrando a inibição do crescimento de *Escovopsioides nivea* LESF 159, quando cultivado nos extratos derivados dos confrontos (*Kruskal-Wallis*, $P < 0,05$). O crescimento dos fungos mutualistas em todos os extratos foi semelhante ao controle.



7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nosso trabalho sugere que *E. nivea* está associado ao ambiente das formigas atíneas como um simbionte e um possível antagonista do sistema, com baixa preferência aos fungos cultivados das formigas atíneas. Nossos resultados demonstraram que a interação *E. nivea* – fungos cultivados pode envolver metabólitos solúveis, entretanto, os experimentos preliminares sugerem que outros fatores também podem estar envolvidos nessa interação, como a possível presença de substâncias voláteis, ou mesmo competição por recursos, quando *E. nivea* cresce em co-cultivo com os fungos mutualistas.

A análise metabolômica (que está em andamento) permitirá comparar os perfis de metabólitos que foram produzidos nos co-cultivos e no crescimento axênico dos fungos. Tal comparação e determinação química auxiliará entender os mecanismos químicos dessas interações. Estudos futuros poderão analisar os compostos voláteis presentes nessas interações, bem como considerar outros experimentos que permitam avaliar se a competição por nutrientes é um fator importante nos padrões de inibição observados neste estudo.