
ECOLOGIA

Laura de Carvalho Pereira Vieira

**DIFERENTES CARBOIDRATOS INFLUENCIAM
AS INTERAÇÕES ENTRE FUNGOS ASSOCIADOS
ÀS FORMIGAS ATÍNEAS?**

LAURA DE CARVALHO PEREIRA VIEIRA

**DIFERENTES CARBOIDRATOS INFLUENCIAM AS INTERAÇÕES
ENTRE FUNGOS ASSOCIADOS ÀS FORMIGAS ATÍNEAS?**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Bacharela em Ecologia.

Orientadora: Mariana de Oliveira Barcoto

Supervisor: Prof. Dr. André Rodrigues

Rio Claro - SP
2023

V658d Vieira, Laura de Carvalho Pereira
Diferentes carboidratos influenciam as interações entre fungos associados às formigas atíneas? / Laura de Carvalho Pereira Vieira. -- Rio Claro, 2023
45 f. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ecologia) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Mariana de Oliveira Barcoto

1. Contexto-dependência. 2. Interações microbianas. 3. Fungos. 4. Formigas Attini. 5. Açúcares simples. 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.

Laura de Carvalho Pereira Vieira

**DIFERENTES CARBOIDRATOS INFLUENCIAM AS INTERAÇÕES
ENTRE FUNGOS ASSOCIADOS ÀS FORMIGAS ATÍNEAS?**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de bacharela em Ecologia

BANCA EXAMINADORA:

Mariana de Oliveira Barcoto (orientadora)

Prof. Dr. André Rodrigues (supervisor)

Prof. Dr. Mauricio Bacci Junior

Aprovado em: 03 de julho de 2023



Laura de Carvalho Pereira Vieira



Mariana de Oliveira Barcoto



Prof. Dr André Rodrigues

Dedico este trabalho aos meus pais, José e Geralda, por estarem sempre ao meu lado me apoiando, ensinando e amando.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família por me amar, incentivar, apoiar, acreditar em mim e por estarem sempre ao meu lado. Gostaria de agradecer especialmente à minha mãe, Geralda, por nunca soltar minha mão, por ser minha melhor amiga, por sempre saber o que dizer e ter sempre um abraço apertado para me oferecer. Também agradeço por ser meu refúgio, por não me deixar desistir e, principalmente, por me ensinar a ver o melhor de cada processo. Agradeço ao meu pai, José, por todo esforço e dedicação para que eu pudesse realizar os meus sonhos. Aos meus sobrinhos, Bernardo e Theodoro, agradeço por alegrarem meus dias. Agradeço ao meu namorado, Matheus, por todo amor e companheirismo.

Agradeço aos meus amigos, Sandy, Lara, Vanessa, Leonardo, Mateus, Lilian e Raquel, por todas as conversas, conquistas, angústias e trabalhos compartilhados. Agradeço também aos demais alunos da turma de 2018 por fazerem parte da minha jornada na UNESP.

Agradeço à minha orientadora, Mariana, por me inspirar, por ser um exemplo de mulher e pesquisadora. Por incentivar meu senso crítico e criativo. Por sempre achar um tempo (em meio ao turbilhão de compromissos e responsabilidades) para me ouvir e me ajudar.

Ao meu supervisor, Prof. Dr. André Rodrigues, agradeço pela oportunidade de fazer parte do LESF, assim como por estar sempre presente e disposto a me ajudar. Agradeço por ser um exemplo de organização, ética e responsabilidade. Por todos os ensinamentos e conversas a respeito da ciência.

Agradeço aos meus colegas de laboratório por todos os momentos compartilhados e por todo suporte que me foi dado durante os meus quase três anos de Iniciação Científica.

Por fim, agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro (EDITAL PROPe Unesp N° 04/2021 – PIBIC RT AF + Subsídio Alimentação COPE n° 2962).

RESUMO

Frente às alterações nas condições ambientais, os organismos podem assumir distintos papéis ecológicos e estabelecer diferentes interações. O conteúdo nutricional, em particular, parece modular interações microbianas em diversos ambientes. A simbiose nutricional mantida entre formigas atíneas e o fungo que cultivam fornece um modelo interessante para o estudo da contexto-dependência nas interações microbianas. Em uma simbiose mutualista, as atíneas cultivam fungos do gênero *Leucoagaricus*, em estruturas denominadas de jardins de fungo. Fungos mutualistas convertem material vegetal recalcitrante em fontes de carbono de fácil assimilação, incluindo açúcares simples, como glicose, xilose e maltose. No entanto, a possível influência do conteúdo nutricional dos jardins de fungo nas eventuais interações microbianas que ocorrem nestes ambientes foi pouco investigada. Neste trabalho, avaliamos a influência de diferentes açúcares no crescimento e interações entre *Leucoagaricus* spp., *Escovopsis* sp., *Syncephalastrum* sp. e *Trichoderma* sp., fungos estes associados às colônias das atíneas. Através de ensaios de co-cultivo *in vitro*, verificamos que todos os fungos são capazes de crescer em meios contendo glicose, maltose, xilose e extrato bruto de jardim de fungo. No entanto, o crescimento de *Leucoagaricus* sp. e *Escovopsis* sp. varia tanto em diferentes meios, quanto durante as interações com outros fungos. Já *Syncephalastrum* sp. e *Trichoderma* sp. não tiveram o crescimento influenciado pelos nutrientes disponíveis e pela interação com outros fungos. Nossos resultados sugerem que o conteúdo nutricional, além de influenciar o crescimento fúngico, pode modular as interações entre os fungos associados aos jardins de atíneas.

Palavras chave: Interação. Contexto-dependência. Açúcares. Formigas Attini.

ABSTRACT

When facing environmental changes, organisms may assume different ecological roles, establishing different interactions. Nutritional content, in particular, appears to modulate microbial interactions in several environments. The nutritional symbiosis maintained between attine ants and the fungus they cultivate provides an interesting model for the study of context-dependency in microbial interactions. Attines cultivate mutualistic fungi in the genus *Leucoagaricus*, in structures named fungus gardens. Mutualistic fungi convert recalcitrant plant material into labile carbon sources, including simple sugars such as glucose, xylose, and maltose. However, the possible influence of the fungus garden's nutritional content on microbial interactions occurring in these environments has been poorly investigated. Here we evaluated the influence of different sugars on the growth and interactions among *Leucoagaricus* spp., *Escovopsis* sp., *Syncephalastrum* sp. and *Trichoderma* sp., fungi associated with attine ant colonies. Through *in vitro* dual-culture assays, we verified that all fungi are able to grow on media containing glucose, maltose, xylose and fungus garden extract. However, the growth of *Leucoagaricus* sp. and *Escovopsis* sp. vary both in different media and during interactions with other fungi. The growth of *Syncephalastrum* sp. and *Trichoderma* sp. was not influenced neither by the available nutrients nor by the interaction with other fungi. Our results suggest that the nutritional content, besides influencing the fungal growth, may modulate interactions between fungi associated with attine ants gardens.

Keywords: Interaction. Context-dependence. Sugars. Attini ants.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	10
2.1	Associação entre as formigas atíneas, fungos basidiomicetos e outros microrganismos.....	10
2.2	Microrganismos potencialmente antagonistas às colônias.....	12
2.3	Contexto-dependência de interações simbióticas	13
3	OBJETIVOS	16
3.1	Geral	16
3.2	Específicos	16
4	MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1	Origem e manutenção dos fungos.....	17
4.2	Crescimento dos fungos em diferentes fontes de carbono	18
4.3	Bioensaios de co-cultivo na presença de recursos adicionais de nutrição	18
4.4	Crescimento em extrato bruto do jardim de fungo.....	19
4.5	Análises estatísticas	20
5	RESULTADOS	21
5.1	Crescimento dos fungos em diferentes fontes nutricionais.....	21
5.2	Co-cultivo entre os fungos mutualistas e seus potenciais antagonistas em diferentes fontes nutricionais.....	24
5.3	Co-cultivo entre os fungos antagonistas	26
6	DISCUSSÃO	28
7	CONCLUSÕES.....	32
	REFERÊNCIAS.....	33

1 INTRODUÇÃO

Alterações nas condições ambientais podem influenciar a dinâmica de interações microbianas (THOMPSON, 1988). Muitas dessas interações não apresentam limites fixos, de forma que seus resultados estão condicionados ao contexto ambiental e ecológico em que se inserem (LEUNG; POULIN, 2008; JIMÉNEZ-GÓMEZ et al., 2021; SIX; KLEPZIG, 2021). Assim, um mesmo organismo pode causar benefícios ou danos, dependendo de fatores como temperatura, umidade, pH e disponibilidade de nutrientes (LEUNG; POULIN, 2008). A dinâmica de interações microbianas influencia a composição das comunidades, assim como sua estabilidade e resiliência, periodicidade e sazonalidade, além de respostas às perturbações ambientais (FUHRMAN et al., 2015; GONZE e al., 2018). Considerando a diversidade microbiana reportada em colônias de formigas atíneas (Hymenoptera: Formicidae: Attini: Attina), tal sistema é propício para a investigação acerca do contexto-dependência de interações microbianas (BIEDERMANN; ROHLFS, 2017).

As formigas atíneas (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini: Attina) mantêm um mutualismo obrigatório com fungos basidiomicetos pertencentes a ordem *Agaricales* (*Agaricaceae*), incluindo àqueles do gênero *Leucoagaricus*, que são cultivados no interior de câmaras subterrâneas em estruturas denominadas de jardim de fungo (Figura 1). Para nutrir o fungo mutualista, formigas operárias forrageiam por folhas frescas, flores, sementes e carcaças de insetos (DE FINE LICHT; BOOMSMA, 2010). O substrato é limpo e fragmentado pelas formigas, e então incorporado no jardim. A partir de então, o micélio fúngico metaboliza o substrato vegetal, disponibilizando todos os nutrientes requeridos pelas rainhas e larvas, constituindo também parte da dieta das operárias (WEBER, 1972; QUINLAN; CHERRETT, 1979; SILVA et al., 2003). Tais nutrientes incluem carboidratos, aminoácidos, ácidos carboxílicos e lipídeos, além de açúcares simples, como glicose, maltose e xilose (MARTIN et al., 1969; HUANG et al., 2014; SOMERA et al., 2015; CARABALLO-RODRÍGUEZ et al., 2021).

A glicose, fonte preferencial de carbono e energia dos microrganismos eucarióticos (VAULONT et al., 2000), é o açúcar mais abundante no jardim de fungo das atíneas (SILVA et al., 2003). Através de dez etapas, a rota enzimática da glicólise converte a glicose em piruvato e duas moléculas de ATP (JOHNSTON, 1999; ALCALDE, 2002; PANHOTA, 2002; CHANDEL, 2021). A maltose, por sua vez, é oriunda da degradação do amido e consiste em um dissacarídeo de glicose. A hidrólise deste açúcar ocorre pela ação da enzima intracelular alfa-glucosidase, também conhecida como maltase (SERRANO, 2017). A xilose é classificada

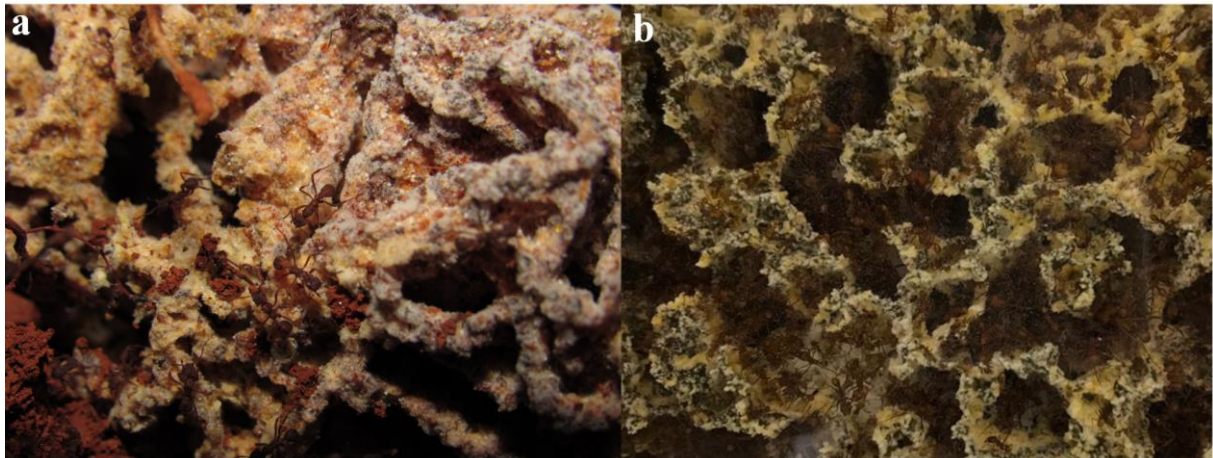
como um monossacarídeo do tipo aldopentose, sendo catabolizada por duas reações de oxirredução (envolvendo as enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase) e uma fosforilação (através da xiluloquinase). Tais etapas resultam na molécula xilulose 5-fosfato, a qual é metabolizada na via de fosfopentoses (FUGITA, 2010).

Além de estarem disponíveis às formigas, os nutrientes dos jardins de fungo podem fornecer recursos para diversos microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos também encontrados nesse ambiente. Dentre esses, alguns gêneros de fungos filamentosos têm recebido atenção, seja pela sua coevolução com o sistema das atíneas, como é o caso de *Escovopsis* (*Ascomycota: Hypocreales*; CURRIE et al., 2003; MONTOYA et al., 2021); pela possível natureza patogênica, como *Syncephalastrum* (*Mucoromycota: Mucorales*; BARCOTO et al., 2020; BAUTZ et al., 2023), ou pela abundância no jardim, como *Trichoderma* (*Ascomycota: Hypocreales*; MONTOYA et al., 2016). *Escovopsis* sp. compartilha uma história de coevolução com as atíneas e seus fungos (CURRIE et al., 2003) e sua interação com o sistema das formigas ainda é incerta. Inicialmente, *Escovopsis* foi classificado como micoparasita necrotrófico do fungo cultivado, o que implica na obtenção de energia a partir das células mortas de seus hospedeiros, podendo também crescer como competidores saprotróficos de outros fungos, dependendo das condições ambientais (JEFFRIES et al., 1995; REYNOLDS; CURRIE, 2004). Entretanto, as interações entre *Escovopsis* e o jardim de fungo dependem da suscetibilidade dos hospedeiros, sugerindo que *Escovopsis* atue como um patógeno oportunista (JIMÉNEZ-GÓMEZ et al., 2021). Por sua vez, *Syncephalastrum* apresenta um potencial patogênico frente ao fungo cultivado por *Atta sexdens*, assim como aos jardins dessa formiga (BARCOTO et al., 2017). Também encontrados em colônias de atíneas, fungos do gênero *Trichoderma* (RODRIGUES et al., 2011; MONTOYA et al., 2016) podem impactar negativamente o crescimento do fungo mutualista (CURRIE et al., 1999; LOPEZ e ORDUZ, 2003). O gênero *Trichoderma* também é reconhecido pela produção de enzimas extracelulares relacionadas à degradação de polímeros vegetais (TRIPATHI et al., 2013), o que também poderia ocorrer no ambiente do jardim de fungo.

Pouco se sabe sobre as interações entre os microrganismos que ocorrem no jardim, nem como estas poderiam ser moduladas pelos recursos nutricionais desse ambiente. Açúcares, em particular, podem regular a composição e a diversidade metabólica de comunidades fúngicas e, em certas circunstâncias, favorecer a dominância de fungos patogênicos. Comunidades fúngicas em meios enriquecidos com açúcares tendem a apresentar interações mais complexas, indicando compartilhamento de nicho (REN et al., 2020; WANG et al., 2021). A assimilação de glicose, maltose e xilose foi verificada para *L. gongylophorus* (SILVA et al., 2003), assim

como para linhagens de *Escovopsis* sp. (MAN et al., 2016), *Syncephalastrum* sp. (HOBOT; GULL, 1977; HASHEM et al., 2020) e *Trichoderma* (SEYIS; AKSOZ, 2005; MAN et al., 2016). Apesar de o metabolismo de diferentes açúcares sustentar o crescimento das linhagens investigadas, este varia conforme o açúcar, sugerindo que algumas rotas podem apresentar maior eficiência metabólica. Assim, o intuito deste trabalho consistiu em avaliar a influência dos açúcares mais abundantes no jardim no crescimento e nas interações entre fungos que habitam tal ambiente. Primeiramente, determinamos o crescimento de linhagens de *Leucoagaricus*, *Escovopsis*, *Syncephalastrum* e *Trichoderma* em meios enriquecidos com glicose, maltose, xilose e extrato bruto de jardim de fungo. Em seguida, avaliamos a influência desses nutrientes nas interações entre os fungos mencionados acima. Com isso, verificamos que o conteúdo nutricional influencia o crescimento fúngico, podendo modular as interações estabelecidas entre o fungo mutualista e os demais fungos associados aos jardins de atíneas.

Figura 1. Jardins de fungo de formigas atíneas. A estrutura esponjosa é constituída pelo micélio esbranquiçado do fungo mutualista e fragmentos de material vegetal. **a** Jardim de *Mycetomoellerius tucumanus*, formiga não-cortadeira de folhas que cultiva *Leucoagaricus* sp. **b** Jardim de *Atta sexdens*, formiga cortadeira de folhas, que cultiva *Leucoagaricus gongylophorus*.



Fonte: Rodolfo Bizarria Júnior.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Associação entre as formigas atíneas, fungos basidiomicetos e outros microrganismos

As formigas da subtribo Attina formam um grupo monofilético com 20 gêneros e 246 espécies descritas (SCHULTZ, 2022), sendo caracterizadas pelo o cultivo de fungos para alimentação (também denominado “fungicultura”; MUELLER et al., 2001; SCHULTZ; BRADY, 2008; BRANDÃO, MAYHÉ-NUNES; SANHUDO, 2011; SOSA-CALVO et al., 2013). A fungicultura das formigas atíneas provavelmente evoluiu entre 55-65 milhões de anos, em florestas úmidas da América do Sul (SCHULTZ; BRADY, 2008; BRANSTETTER et al., 2017). Durante o período de coevolução, as atíneas dos gêneros *Sericomyrmex*, *Trachymyrmex*, *Acromyrmex* e *Atta* (conhecidas como *higher attines*) domesticaram fungos basidiomicetos da ordem *Agaricales* (*Agaricaceae*) pertencentes ao gênero *Leucoagaricus*. Os fungos cultivados apresentam adaptações morfológicas e nutricionais específicas para vida conjunta com as atíneas. Uma das adaptações mais características são os gongilídios, que consistem em hifas intumescidas que acumulam aminoácidos essenciais, lipídios, carboidratos e proteínas. O conteúdo dos gongilídios constitui a única fonte de alimentos das larvas e da rainha, e complementa a dieta das operárias adultas (MARTIN; MARTIN, 1970; CHERRETT, 1980; DE FINE LICHT et al., 2014). Acredita-se que o elevado grau de domesticação tenha bloqueado o fluxo gênico entre linhagens de vida livre e o fungo cultivado, que não parece sustentar a existência deste em vida livre. Assim, o fungo mutualista não foi, até o momento, encontrado fora das colônias das atíneas, pelo menos para as *higher attines* (DE FINE LICHT et al., 2014; NYGAARD et al., 2016).

As formigas atíneas geralmente cultivam o fungo mutualista no interior de ninhos subterrâneos, mas também podem construir ninhos sob rochas, troncos podres ou sob a serrapilheira. O micélio fúngico cresce no material vegetal fresco, formando uma estrutura esponjosa denominada jardim de fungo. No caso das atíneas cortadeiras (gêneros *Atta* e *Acromyrmex*), formigas operárias cortam e transportam até os ninhos uma grande quantidade de folhas frescas para promover o crescimento do simbionte (MUELLER et al., 2001; SILVA-PINHATI et al., 2004). Assim que o substrato vegetal é carregado para o interior das colônias, as formigas iniciam o processo de fragmentação, mastigando as folhas até estas se tornarem pequenas partículas. Durante o processo, as operárias lambem a superfície do material vegetal, removendo ceras e microrganismos. As etapas iniciais são fundamentais para o cultivo fúngico, pois além de diminuir os riscos de contaminação, aumentam a superfície disponível para a

inoculação de *L. gongylophorus*, acelerando o processo de decomposição subsequente (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). O material resultante da mastigação é incorporado no topo do jardim de fungo e sua superfície é inoculada com hifas do fungo mutualista. Antes da incorporação, as formigas depositam no substrato vegetal gotas de líquido fecal rico em enzimas digestivas (como proteinases, pectinases e amilases), que potencializam a degradação de polímeros da parede celular vegetal. Assim, as hifas do fungo entram em contato com os recursos intracelulares mais rapidamente (MARTIN; MARTIN, 1971; BOYD; MARTIN, 1975; RØNHEDE et al., 2004; MOLLER et al., 2011; DE FINE LICHT et al., 2013; KOOIJ et al., 2014, 2016). As enzimas presentes no fluido fecal são produzidas pelo fungo mutualista e ingeridas pelas formigas, passando por todo sistema digestivo destes insetos sem sofrer alterações, mantendo sua atividade (RØNHEDE et al., 2004; SCHIØTT et al., 2010).

Nos jardins, o fungo mutualista metaboliza polissacarídeos vegetais como xilana, amido, pectina e celulose (Siqueira et al., 1998), liberando açúcares simples, como glicose, maltose e xilose, que estimulam o crescimento do simbiote e fornecem uma fonte constante de nutrientes para as atíneas (SILVA et al., 2003). Além de açúcares simples, os jardins de fungo são ricos em aminoácidos livres (como beta-alanina, ácido aspártico, ácidos glutâmicos e ácido nicotínico; HUANG et al., 2014), polióis (SOMERA et al., 2015), lipídeos e ácidos carboxílicos. Os carboidratos disponíveis nos jardins representam uma parcela significativa da dieta das rainhas e operárias, sendo que as hifas do fungo mutualista suprem apenas 9% dos requerimentos nutricionais destes insetos (QUILAN; CHERRETT, 1979; BASS; CHERRETT, 1995). No estágio larval, as formigas dependem exclusivamente do simbiote para sua nutrição. O fungo cultivado é constituído por 46,69% de proteínas (POLTRONIERI; SERZEDELLO, 1980), 27% de carboidratos, 17,7% de aminoácidos e 0,2% de lipídios (QUILAN; CHERRETT, 1979).

Além de nutrir os simbioss, as formigas são também responsáveis pela propagação clonal de seus parceiros fúngicos. Desse modo, o fungo se reproduz a partir da dispersão vertical, que ocorre quando uma rainha deixa o ninho parental, levando consigo um inóculo do fungo na cavidade infrabucal. Tal inóculo será utilizado para formação do jardim de fungo no novo ninho a ser fundado (CHAPELA et al., 1994; MUELLER et al., 2010).

As atíneas proporcionam proteção aos mutualistas contra infecções microbianas por meio de uma série de adaptações fisiológicas e comportamentais. Estas incluem a remoção física de microrganismos contaminantes através de comportamentos específicos: i) *grooming*, que consiste em lambar a superfície do jardim, coletando esporos na cavidade infrabucal e, posteriormente, descartando-os fora do jardim de fungo; ii) *weeding*, no qual as formigas

removem fragmentos infectados do jardim e os descartam (CURRIE; STUART, 2001). As formigas também podem inibir o crescimento de microrganismos patogênicos através da liberação de compostos antimicrobianos como ácido fenilacético, ácido indolacético e 3-hidroxicaproico. Tais compostos são produzidos nas glândulas metapleurais (FISHER; STRADLING; PEGLER, 1994; CURRIE, 2001; POULSEN et al., 2002; FERNÁNDEZ-MARÍN et al., 2006). Além disso, a cutícula de alguns gêneros de formigas é colonizada por bactérias dos gêneros *Streptomyces* e *Pseudonocardia*, que produzem metabólitos secundários com atividades antimicrobianas, auxiliando na defesa dos mutualistas contra fungos patogênicos (POULSEN; CURRIE, 2010).

Outras bactérias associadas aos jardins também parecem influenciar a fungicultura através da potencial fixação de nitrogênio, produção de antimicrobianos, degradação de lignocelulose, detoxificação de metabólitos vegetais, decomposição de biomassa fúngica, metabolismo de açúcares simples e nutrientes, formação de biofilme (PINTO-TOMÁS et al., 2009; DE FINE LICHT, 2014; BARCOTO et al., 2020; FRANCOEUR et al.; 2021) e produção de aminoácidos essenciais (AYLWARD et al., 2012). Ainda, bactérias associadas aos gongilídios estão relacionadas a um aumento na produção de estáfilas (conjunto de gongilídios) e da biomassa fúngica dos simbiontes. Tais bactérias podem formar agregados semelhantes a biofilmes na superfície dos gongilídios, o que sugere alguma influência no desenvolvimento e crescimento dos jardins (MARTIARENA et al., 2023).

2.2 Microrganismos potencialmente antagonistas às colônias

As colônias abrigam uma comunidade microbiana diversa, composta por leveduras (MENDES et al., 2012), bactérias (AYLWARD et al., 2014; KELLNER et al., 2015; BARCOTO et al. 2020; KHADEMPOUR et al., 2020) e fungos filamentosos (REIS et al., 2015; PEREIRA et al., 2016), que são continuamente introduzidos nas colônias a partir do material vegetal forrageado pelas formigas. Microrganismos podem ainda ser introduzidos durante a fundação da colônia, através do tegumento das rainhas e do inóculo que elas transportam (RODRIGUES et al., 2008; VAN BAEL et al., 2009; PAGNOCCA et al.; 2012; MEIRELLES et al., 2016). Incluem-se neste microbioma microrganismos que podem ser prejudiciais à fungicultura, como fungos endofíticos (*Clonostachys* e *Verticillium*) e de solo (*Fusarium*, *Syncephalastrum*, *Trichoderma* e *Cunninghamella*; RODRIGUES et al., 2005, 2008; BIZARRIA et al., 2018), leveduras negras (estritamente relacionadas a fungos do gênero *Phialophora*; LITTLE; CURRIE, 2008) e fungos pertencentes ao gênero *Escovopsis*, que

parecem exclusivos ao ambiente dos jardins de fungo das formigas atíneas (CURRIE et al., 1999).

Bizarria e colaboradores (2018) demonstraram que o antagonismo microbiano poderia resultar da produção e liberação de metabólitos inibitórios solúveis por fungos filamentosos, prejudicando o crescimento dos fungos mutualistas. Da mesma forma, existem evidências de que os compostos produzidos por leveduras negras suprimem o crescimento de actinobactérias. Assim, haveria um comprometimento na eficiência da defesa antimicrobiana dos jardins de fungo, tornando-os vulneráveis a ação de outros microrganismos prejudiciais (LITTLE; CURRIE, 2008). Fungos endofíticos também podem afetar negativamente as formigas e sua cultura. Quando o material forrageado apresenta fungos endofíticos, as operárias aumentam o tempo de processamento do substrato vegetal, desacelerando o ritmo de trabalho das colônias (VAN BAEL et al., 2012). Além disso, os carboidratos simples disponíveis nos jardins de fungo fornecem um recurso nutricional prontamente assimilável para as formigas, o fungo simbiote e, ainda, para fungos saprotróficos e micoparasitas. Assim, esses recursos nutricionais podem estimular a competição por interferência nas colônias, prejudicando o funcionamento do sistema das atíneas (BIZARRIA et al., 2018).

2.3 Contexto-dependência de interações simbióticas

Alterações nas condições ambientais podem influenciar a composição de comunidades microbianas, a dinâmica de interações interespecíficas e, ainda, promover mudanças no papel ecológico desempenhado por algumas espécies. Diversas variáveis são capazes de influenciar os resultados de interações simbióticas, incluindo pH, salinidade, nível de oxigênio dissolvido, as características do hospedeiro e a disponibilidade de nutrientes (DASKIN; ALFORD, 2012). Variações na dieta, por exemplo, podem modular a microbiota intestinal de humanos (SONNENBURG; SONNENBURG, 2014) e outros primatas (CABANA et al., 2019; FRANKEL et al., 2019). Nesses casos, a ingestão de carboidratos na forma de fibras pode alterar a composição, diversidade e perfil funcional da microbiota intestinal. A composição das comunidades microbianas associadas ao sistema digestivo influencia diretamente na função do sistema imunológico (HOOPER et al.; 2012), na colonização por patógenos (BUFFIE; PAMER, 2013), na assimilação de nutrientes (HACQUARD et al., 2015) e energia (TURNBAUGH et al., 2006).

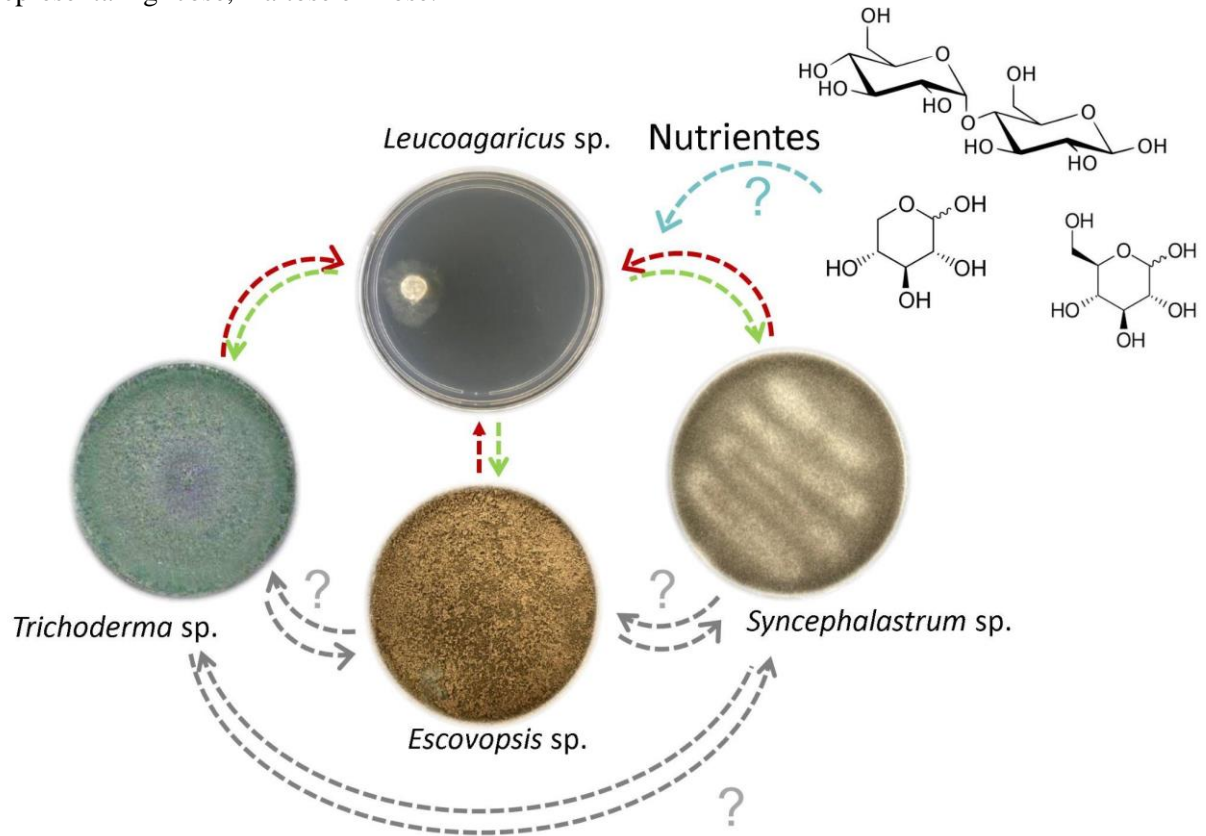
Flutuações na temperatura corporal de diversas espécies, principalmente de animais ectotérmicos como répteis, anfíbios, peixes e insetos, podem alterar a função, composição e

estabilidade das comunidades microbianas associadas ao intestino destes organismos (MOELLER et al., 2020; SEPULVEDA; HUUS; LEY, 2021; ZHAO et al., 2021). De um modo geral, o aumento da temperatura corporal destes animais pode resultar na redução da abundância relativa de alguns clados de microrganismos, como *Firmicutes*, e aumentar a dominância de bactérias prejudiciais ao hospedeiro (KOHL; YAHN, 2016; FONTAINE et al., 2018; MOELLER et al., 2020). De maneira semelhante, variações na temperatura do ambiente também podem influenciar a microbiota de alguns organismos (THAPA et al., 2019). Por exemplo, o aumento da temperatura da água do oceano pode influenciar a composição do microbioma de esponjas e corais, podendo causar a perda de táxons específicos de bactérias e arqueias benéficas e provocar um aumento de microrganismos oportunistas e prejudiciais (FAN et al., 2013; SWEET; BULLING, 2017; RAMSBY et al., 2018).

A disponibilidade de nitrogênio e potássio podem alterar as interações estabelecidas entre fungos micorrízicos arbusculares e *Lactuca sativa* (alface; AZCÓN et al., 2003). Fungos micorrízicos desempenham um importante papel na aquisição de nutrientes pelas plantas, permitindo a sobrevivência dessas em ambientes com baixo teor nutricional (BETHLENFALVAY; SCHÜEPP, 1994). Entretanto, em ambientes nutricionalmente ricos, os efeitos positivos das interações com micorrizas deixam de existir, podendo até se tornar prejudiciais para as plantas (AZCÓN et al., 2003). As interações entre *Candida albicans* e camundongos também parecem ser contexto-dependentes. Tso e colaboradores (2018) demonstraram que *Candida albicans*, uma espécie de fungo associada à microbiota intestinal de camundongos, que normalmente atua como um patógeno oportunista, pode se tornar menos virulenta e até proteger seus hospedeiros de infecções, na ausência de microrganismos competidores.

A disponibilidade de nutrientes tem sido associada a processos importantes como a composição de comunidades microbianas (CHIGINEVA et al., 2009), o aumento de competição interespecífica (NABITY et al., 2021) e alterações no papel ecológico de algumas espécies (JOHNSON et al., 1997; SMITH 2005). No contexto do jardim de fungo, é possível que o conteúdo nutricional influencie as interações estabelecidas entre os microrganismos associados a esses ambientes. Considerando a abundância de açúcares simples no jardim, nossos objetivos consistiram em avaliar a influência da glicose, maltose e xilose no crescimento e nas interações entre fungos associados ao jardim (Figura 2). A influência desses açúcares foi comparada à influência de um recurso nutricional mais complexo, como extrato de jardim de fungo.

Figura 2. Representação esquemática das interações investigadas. Setas em verde representam interações positivas, vermelhas representam interações negativas e àquelas em cinza referem-se a interações cujo resultado ainda é desconhecido. A seta em azul indica que os efeitos dos nutrientes presentes nos jardins, nas interações entre os fungos, ainda não são conhecidos. Estruturas químicas representam glicose, maltose e xilose.



Fonte: Elaborado pela autora.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Determinar se diferentes composições nutricionais influenciam o crescimento e as interações estabelecidas entre os fungos associados às colônias das formigas atíneas.

3.2 Específicos

- Avaliar o crescimento de *Leucoagaricus gongylophorus*, *Leucoagaricus* sp., *Escovopsis* spp., *Syncephalastrum* sp., e *Trichoderma virens* em três fontes de carbono simples (glicose, maltose, xilose), assim como na presença de extrato bruto de jardim de fungo.
- Inferir a influência dos açúcares simples e do extrato bruto de jardim de fungo nas interações entre os fungos cultivados pelas formigas e seus antagonistas.
- Investigar as interações entre *Escovopsis* spp., *Syncephalastrum* sp. e *T. virens* em meios de cultivo contendo apenas um açúcar e extrato bruto de jardim de fungo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem e manutenção dos fungos

Foram utilizados três isolados de *Escovopsis* sp., um isolado de *Syncephalastrum* sp. e um isolado de *Trichoderma* sp. Tais linhagens são provenientes de colônias de diversas espécies de formigas atíneas (Tabela 1), obtidas em estudos anteriores. Todos os isolados estão depositados no acervo do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF), pertencente à Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP), preservados na forma de suspensão de micélio e esporos, em glicerol 10%, a - 80 °C. Para reativação, a suspensão foi transferida para placas contendo meio de cultivo Batata Dextrose Ágar (BDA, NEOGEN® Culture Media) e incubadas a 25 °C, no escuro, durante sete dias.

Tabela 1. Origem dos fungos utilizados no presente estudo.

Código ¹	Fungo	Clado ²	Formiga	Local de coleta Cidade/Estado
LESF 023	<i>Escovopsis</i> sp.	weberi	<i>Atta cephalotes</i>	Alta Floresta/MT
LESF 046	<i>Escovopsis</i> sp.	weberi	<i>Trachymyrmex</i> sp.	Rio Claro/SP
LESF 048	<i>Escovopsis</i> sp.	moelleri	<i>Trachymyrmex</i> sp.	Uberlândia/MG
LESF 004	<i>Trichoderma virens</i>	-	<i>Atta sexdens rubropilosa</i>	Corumbataí/SP
LESF 127	<i>Syncephalastrum</i> sp.	-	<i>Atta sexdens rubropilosa</i>	Corumbataí/SP
MJSM220219-01	<i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	-	<i>Atta sexdens</i>	Rio Claro/SP
RB201207-01	<i>Leucoagaricus</i> sp.	-	<i>Mycetomoellerius tucumanus</i>	Rio Claro/SP

¹ LESF: Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (UNESP, Rio Claro, SP).

² Os isolados de *Escovopsis* utilizados no presente estudo não foram identificados até espécies, entretanto, foram classificados em clados filogenéticos, segundo Montoya et al. (2021).

Também foram utilizados dois isolados de fungos mutualistas cultivados pelas atíneas: i) *Leucoagaricus* sp., obtido em uma colônia de *Mycetomoellerius tucumanus* (a partir daqui referido como *Leucoagaricus* sp. MT) e ii) *Leucoagaricus gongylophorus* isolado de uma colônia de *Atta sexdens* (a partir daqui referido como *L. gongylophorus* AS). Estes também estão mantidos no acervo do LESF, sob transferência contínua em placas de Petri contendo meio BDA, incubados a 25 °C, no escuro, durante 21 dias.

4.2 Crescimento dos fungos em diferentes fontes de carbono

Para avaliar o efeito das diferentes fontes de carbono no crescimento micelial de *Escovopsis* spp., *Syncephalastrum* sp. e *T. virens*, os isolados foram cultivados na presença de glicose, maltose e xilose. Para isso, meios de cultivo foram preparados através da suplementação de *Yeast Nitrogen Base* (6,7 g L⁻¹; YNB, Difco) com cada uma das fontes de carbono (10 g L⁻¹), sendo posteriormente esterilizados através de membrana filtrante com porosidade de 0,22 µm e transferidos para frascos contendo ágar (15 g L⁻¹).

Suspensões de esporos foram preparadas a partir de culturas de *Escovopsis* spp., *Syncephalastrum* sp. e *T. virens*. mantidas em meio BDA, a 25 °C, no escuro, durante sete dias. Esporos e hifas foram obtidos através da raspagem da superfície das colônias, sendo suspendidos em 10 mL⁻¹ de água deionizada esterilizada. A suspensão foi agitada durante três minutos e filtrada segundo o método descrito por Newmeyer (1990), para separar os esporos dos fragmentos de hifas. Após a filtração, a suspensão foi diluída até atingir a quantidade de 10⁶ esporos mL⁻¹, determinada em câmara de Neubauer. Ágar (0,2%) foi adicionado na suspensão, e 50 µL foram transferidos para o centro de placas de Petri contendo uma única fonte de carbono. As placas foram incubadas a 25 °C, no escuro. O crescimento radial das colônias foi registrado através da digitalização por *scanner* em dias alternados, durante 28 dias. A área de crescimento radial (em cm²) foi mensurada no *software* ImageJ v. 1.6.0_24 (ABRAMOFF et al., 2004).

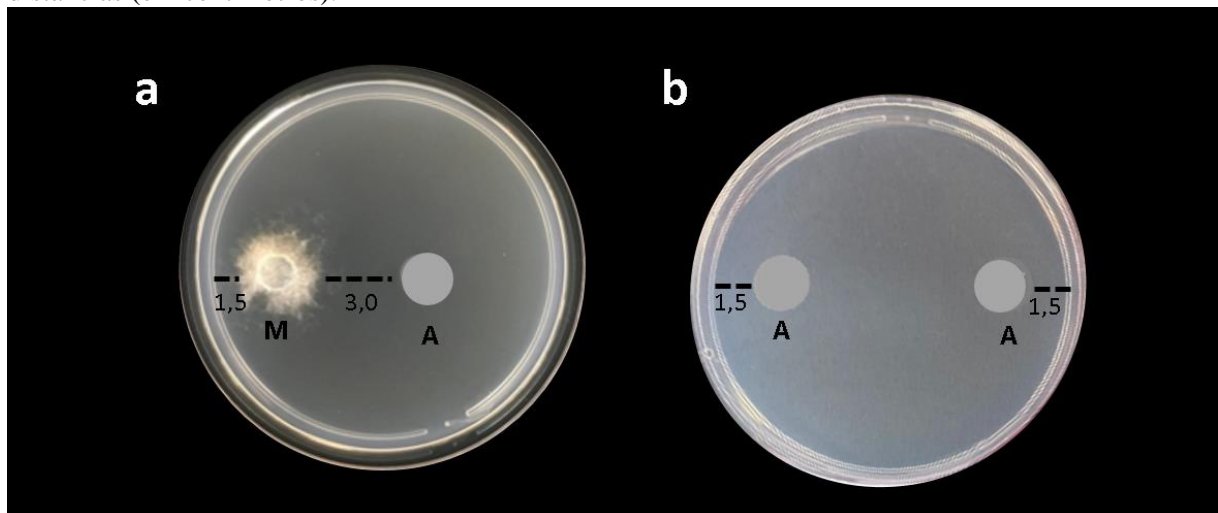
Os isolados dos fungos mutualistas também foram cultivados na presença das três diferentes fontes de carbono. Para tanto, *L. gongylophorus* AS e *Leucoagaricus* sp. MT foram cultivados em placas contendo uma única fonte de carbono, durante 21 dias, no escuro, a 25 °C. Posteriormente, discos de micélio (6 mm de diâmetro) de cada fungo mutualista foram transferidos a uma distância de 1,5 cm da borda de placas de Petri contendo os três tratamentos. A área de crescimento foi mensurada durante 28 dias, conforme descrito previamente.

4.3 Bioensaios de co-cultivo na presença de recursos adicionais de nutrição

A influência das diferentes fontes de carbono nas interações fúngicas foi avaliada através de co-cultivo *in vitro*. Resumidamente, as interações foram avaliadas entre pares de fungos crescendo em diferentes fontes de carbono, sendo cada inóculo disposto em extremidades opostas da placa. Isolados dos fungos mutualistas, previamente cultivados na

presença das três fontes de carbono e incubados durante 21 dias, a 25°C, no escuro, foram transferidos a uma distância de 1,5 cm da borda de placas de Petri contendo YNB, ágar e uma das fontes de carbono. Após 14 dias de incubação, os fungos antagonistas foram transferidos para as placas a uma distância de 3 cm do limite do micélio de cada fungo mutualista, nas seguintes formulações: i) suspensões de conídios de *Escovopsis* sp.; ii) suspensão de esporos de *Syncephalastrum* sp. e iii) suspensão de esporos de *T. virens* (Figura 3a). A influência das diferentes fontes de carbono nas interações entre (i) *T. virens* vs. *Escovopsis* sp., (ii) *T. virens* vs. *Syncephalastrum* sp. e (iii) *Escovopsis* sp. vs. *Escovopsis* sp., foram avaliadas a partir de suspensões de esporos de cada um dos fungos, inoculadas a 1,5 cm da extremidade das placas (Figura 3b).

Figura 3. Ensaio de co-cultivo. (a) Representação do co-cultivo entre os fungos mutualistas e fungos antagonistas e (b) co-cultivo entre os fungos antagonistas. (M) Disco de micélio do fungo mutualista. (A) Suspensão de conídios e/ou esporos dos fungos antagonistas. Linhas tracejadas representam distâncias (em centímetros).



Fonte: Elaborado pela autora.

4.4 Crescimento em extrato bruto do jardim de fungo

A fim de mimetizar a complexidade nutricional na qual as interações fúngicas possivelmente ocorrem, ensaios de co-cultivo também foram realizados em extrato bruto de jardim de fungo de *A. sexdens*. Com isso, o crescimento dos diferentes isolados foi avaliado em condições nutricionais consideradas mais próximas às naturalmente encontradas no jardim.

Os extratos foram preparados através de modificações no método descrito por Silva e colaboradores (2003): 10 fragmentos de 1 g do jardim de fungo foram coletados e divididos em 10 tubos falcon contendo 10 mL⁻¹ de tampão acetato 50 mM gelado (pH 5,0), sendo

posteriormente agitados em vortex. Em seguida, a suspensão foi filtrada em papel filtro e, logo após, em membrana filtrante de 0,22 μm de porosidade. Ágar (15 g L⁻¹) foi adicionado ao extrato esterilizado, e o crescimento dos fungos foi avaliado conforme descrito anteriormente.

4.5 Análises estatísticas

Comparamos o desenvolvimento de cada isolado nas quatro formulações de meio de cultivo (glicose, maltose, xilose e extrato de jardim de fungo), com o teste de Kruskal-Wallis, para verificar se houveram diferenças significativas na assimilação dos nutrientes. Utilizamos esse teste pois os dados não seguiram o modelo de distribuição normal e nem homogeneidade de variâncias. Posteriormente, o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn, foi utilizado para comparar as respostas de crescimento de cada isolado, em cada uma das fontes nutricionais, quando cultivado sozinho (controle) e nas interações com os demais fungos. Os testes foram realizados com um valor de erro de 5%. Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software* R v3.5.1 (R Core Team 2018).

5 RESULTADOS

5.1 Crescimento dos fungos em diferentes fontes nutricionais

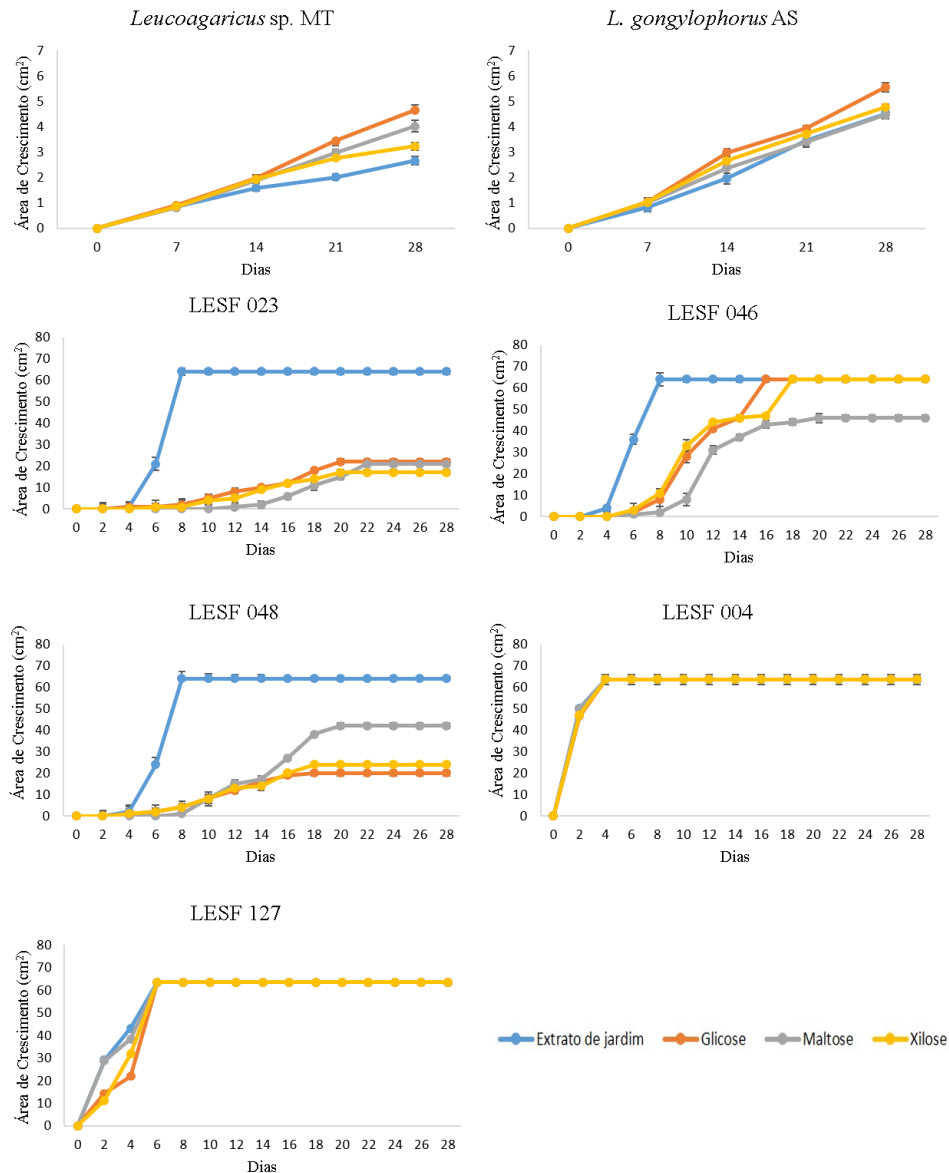
Leucoagaricus gongylophorus AS, *Leucoagaricus* sp. MT, *Escovopsis* spp., *Syncephalastrum* sp. e *T. virens* foram cultivados em meios enriquecidos com uma única fonte de carbono: glicose, maltose, xilose e extrato bruto de jardim de fungo. De modo geral, verificamos que um mesmo isolado tende a apresentar diferentes padrões de crescimento em diferentes composições nutricionais. Assim, após 28 dias, o crescimento de *L. gongylophorus* AS e *Leucoagaricus* sp. MT variou de acordo com os nutrientes fornecidos (Figura 4). O crescimento em glicose constituiu uma exceção a esse padrão, já que ambos fungos mutualistas apresentaram crescimento semelhante neste açúcar (Figura 5).

Figura 4. Crescimento micelial dos fungos mutualistas *Leucoagaricus gongylophorus* AS e *Leucoagaricus* sp. MT, em diferentes fontes de carbono e em extrato bruto de jardim de fungo, no último dia do bioensaio (dia 28). E. Jardim: extrato de jardim de fungo.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 5. Crescimento micelial dos isolados do fungo mutualista (*Leucoagaricus* sp. MT e *Leucoagarcius gongylophorus* AS), *Escovopsis* spp. (LESF 023, LESF 046 e LESF 048), *Trichoderma virens* LESF 004 e *Syncephalastrum* sp. LESF 127, na presença de fontes simples de carbono (glicose, maltose e xilose) e em extrato de jardim de fungo. Crescimento representado pela área média (em cm²) mensurada durante 28 dias.

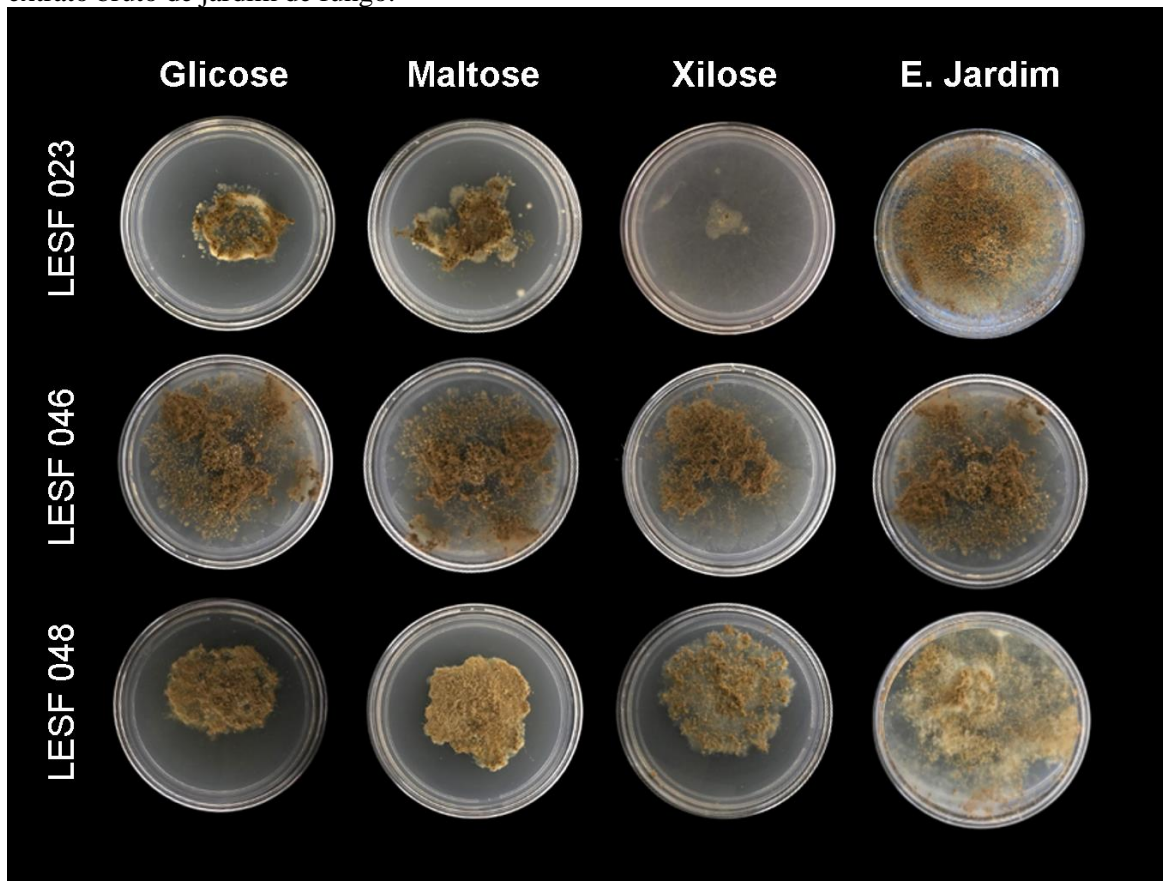


Fonte: Elaborado pela autora.

Todos os isolados de *Escovopsis* apresentaram crescimento micelial superior a 30% da área da placa de Petri (área total da placa: 63,58 cm²), nas quatro formulações de meios de cultivo (Figura 6). Tais isolados apresentam um crescimento mais lento na presença de glicose, maltose e xilose, em comparação com o extrato de jardim de fungo (Figura 5). Além disso, verificamos que a resposta de crescimento dos isolados variou de acordo com o nutriente disponível. Por exemplo, LESF 048 apresentou crescimento de 31,45% do total da placa em glicose, 62,9% em maltose e 34,6% em xilose (Figura 6). Mesmo que os isolados pertençam ao

mesmo clado filogenético (LESF 023 e LESF 046), estes podem apresentar diferentes padrões de crescimento em um nutriente, como ocorreu com LESF 023 e LESF 046 em glicose ($p = 0.0004914$; comparação entre o crescimento de ambos os fungos em glicose). *Escovopsis* apresentou maior crescimento no meio de cultivo contendo extrato bruto de jardim, crescendo também de modo mais rápido (Figura 5). Nessa formulação, os isolados levaram oito dias para atingir seu crescimento máximo (100% da placa), enquanto que nas demais, o crescimento foi iniciado a partir do sexto dia de experimento e a área final de crescimento foi atingida em aproximadamente 18 dias (Figura 5).

Figura 6. Crescimento micelial (28 dias) de três isolados de *Escovopsis* spp. (LESF 023, LESF 046, LESF 048) em diferentes fontes de carbono e em extrato bruto de jardim de fungo. E. Jardim: extrato bruto de jardim de fungo.

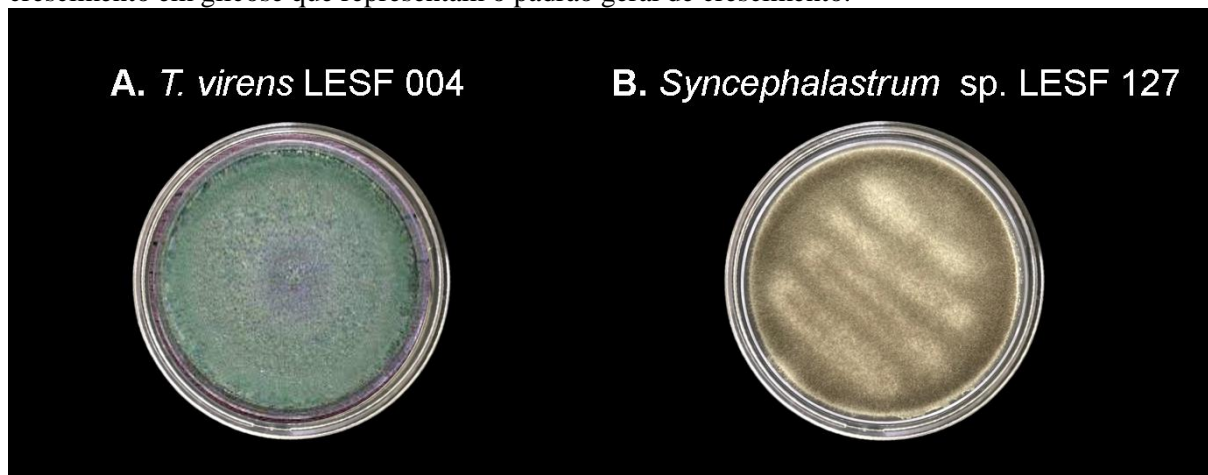


Fonte: Elaborado pela autora.

O crescimento de *Syncephalastrum* sp. LESF 127 e *T. virens* LESF 004 não foi influenciado pelas fontes nutricionais, sendo que ambos cresceram de forma semelhante em todas as formulações, ocupando a área total da placa de Petri (Figura 7). O tempo de crescimento dos fungos também não variou em decorrência da formulação fornecida. *Syncephalastrum* sp. atingiu crescimento máximo no sexto dia de experimento, enquanto *T.*

virens completou a área da placa no terceiro dia (Figura 5), em todas as formulações.

Figura 7. Crescimento micelial de (A) *Trichoderma virens* LESF 004 e (B) *Syncephalastrum* sp. LESF 127 em meio de cultivo enriquecido com glicose, no último dia de bioensaio. Como não houveram variações no crescimento destes isolados nas diferentes fontes nutricionais, foram selecionadas fotos do crescimento em glicose que representam o padrão geral de crescimento.



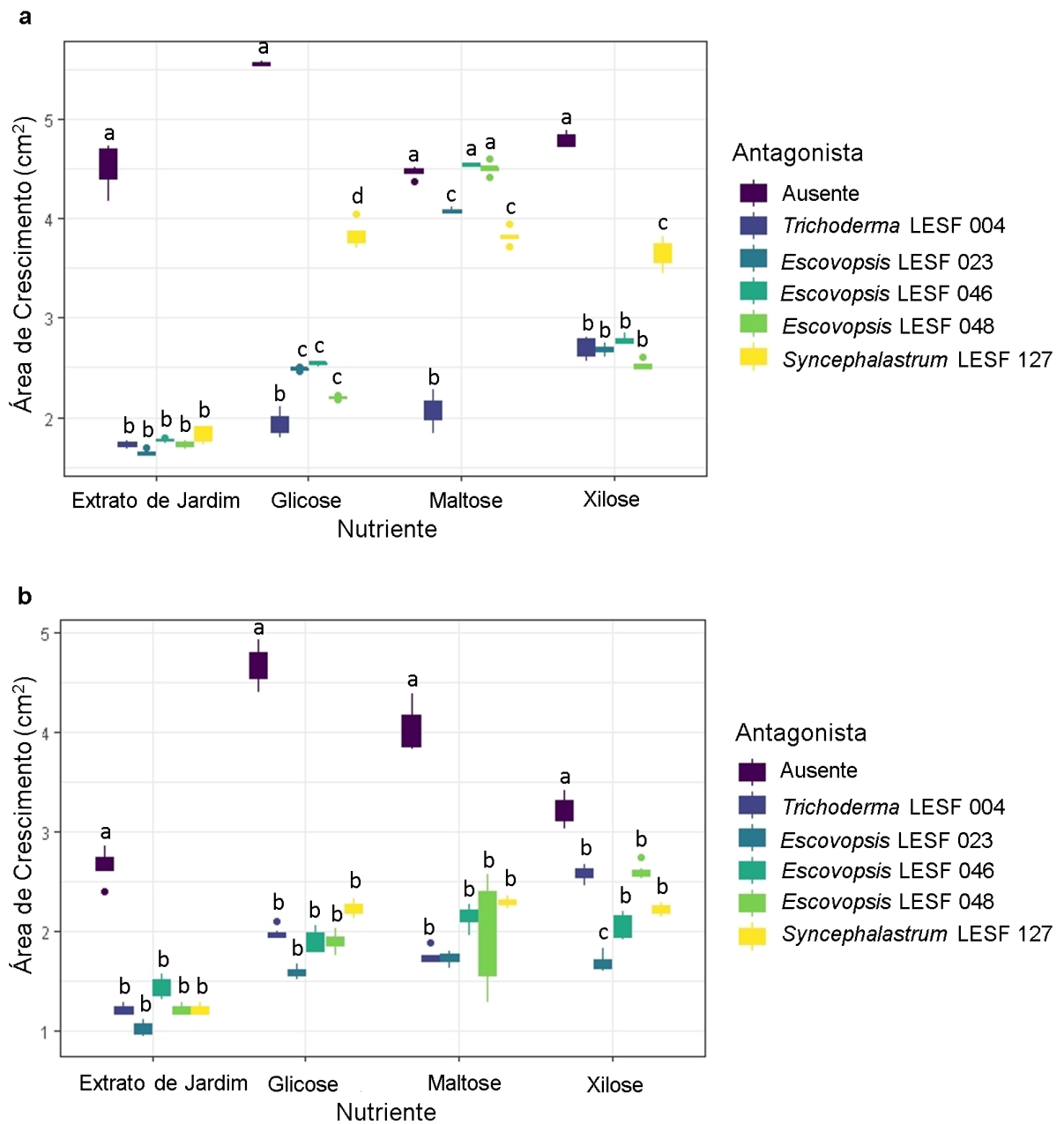
Fonte: Elaborado pela autora.

5.2 Co-cultivo entre os fungos mutualistas e seus potenciais antagonistas em diferentes fontes nutricionais

A disponibilidade nutricional parece influenciar o resultado das interações fúngicas. Após 28 dias, as interações entre *Escovopsis* spp. e os fungos mutualistas variaram de acordo com o nutriente disponível. Aparentemente, os três isolados de *Escovopsis* tiveram seu crescimento estimulado por *Leucoagaricus* sp. MT nas quatro formulações, enquanto que o crescimento do mutualista foi inibido em todas estas interações (Figura 8). Em contrapartida, as interações entre *Escovopsis* spp. e *L. gongylophorus* AS resultaram na inibição do crescimento de ambos *Escovopsis* sp. LESF 023 e *Escovopsis* sp. LESF 046 em xilose, assim como *Escovopsis* sp. LESF 046 em glicose (Figura 9). Além disso, a interação com *L. gongylophorus* AS não causou efeito sobre o crescimento de *Escovopsis* sp. LESF 046 em maltose e de *Escovopsis* sp. LESF 048 em glicose (Figura 9). Os três isolados de *Escovopsis* proporcionaram a inibição de *L. gongylophorus* AS em glicose e xilose, enquanto que em maltose, somente *Escovopsis* sp. LESF 023 ocasionou a inibição desse fungo (Figura 8).

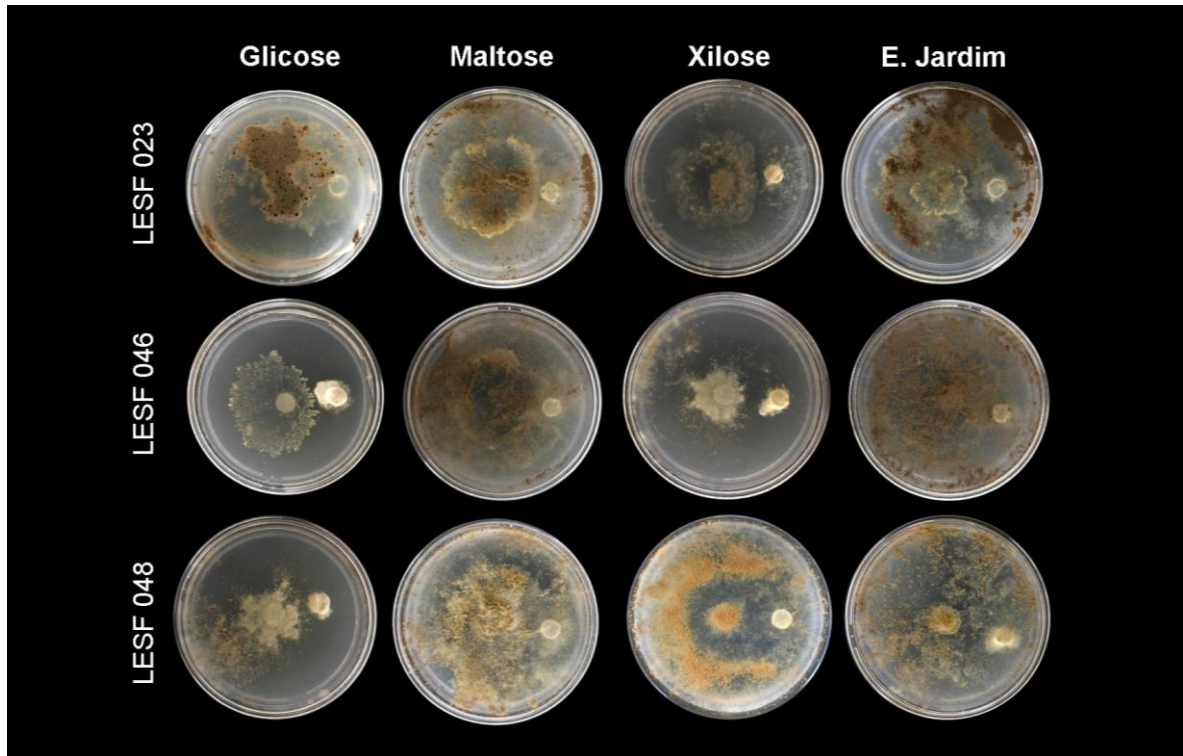
Figura 8. Crescimento dos fungos mutualistas de formigas atíneas na ausência e presença de fungos antagonistas (*Escovopsis* spp., *Trichoderma virens* e *Syncephalastrum* sp.) em diferentes fontes de

carbono. **a** *L. gongylophorus* AS. **b** *Leucoagaricus* sp. MT. Diferentes isolados de *Escovopsis*, *T. virens* e *Syncephalastrum* sp. estão representados pelos diferentes códigos LESF. Letras distintas denotam diferenças significativas nas respostas de crescimento frente aos isolados (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$).



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 9. Interação do fungo mutualista *Leucoagaricus gongylophorus* AS com os isolados de *Escovopsis* spp. (LESF 023, LESF 046 e LESF 048) em diferentes fontes nutricionais. E. Jardim: extrato de jardim de fungo.



Fonte: Elaborado pela autora.

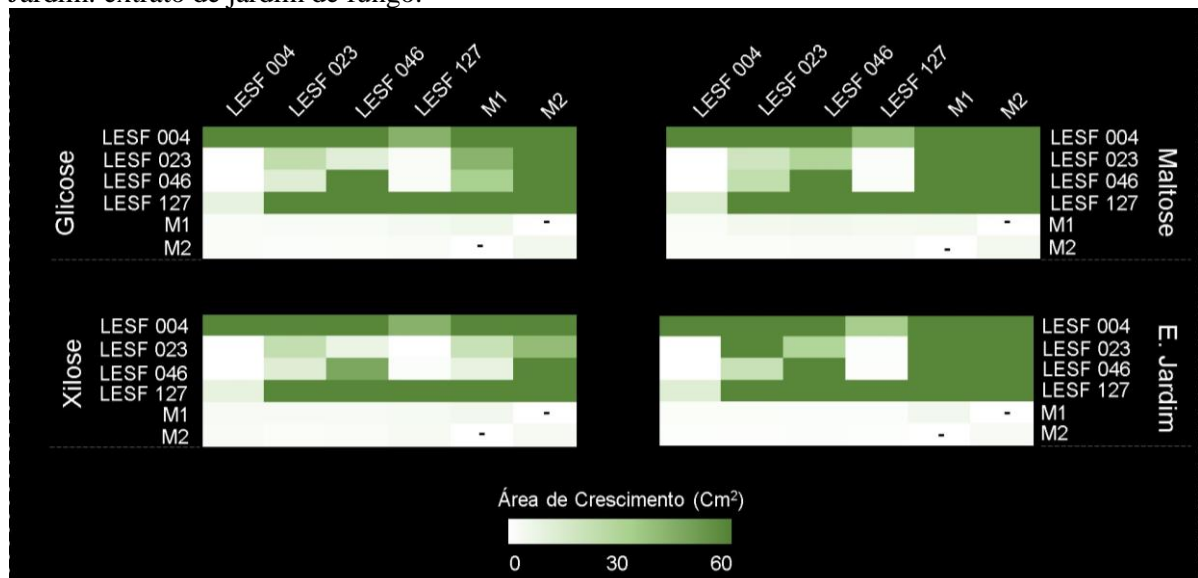
Variações no crescimento de *T. virens* e *Syncephalastrum* sp. frente aos isolados do fungo mutualista não foram identificadas. Em todas as formulações, *T. virens* e *Syncephalastrum* sp. ocuparam a área total da placa de Petri frente aos dois isolados do fungo mutualista, assim como ocorrido no experimento controle. *Leucoagaricus* sp. MT e *L. gonylophorus* AS apresentaram crescimento reduzido quando interagindo com *T. virens* e *Syncephalastrum* sp., em todas as condições nutricionais avaliadas, reforçando que tais fungos podem atuar como antagonistas ao fungo mutualista (Figura 8).

5.3 Co-cultivo entre os fungos antagonistas

Avaliamos as interações entre os potenciais antagonistas dos fungos cultivados pelas atíneas, nas quatro formulações de meio de cultivo, nas seguintes configurações: i) *Escovopsis* vs *Syncephalastrum*; ii) *Escovopsis* vs *T. virens* iii) *Escovopsis* vs *Escovopsis*; iv) *Syncephalastrum* sp. vs *T. virens*. Após 28 dias de experimento, as interações entre *Syncephalastrum* sp. e *Escovopsis* spp. resultaram na inibição do crescimento dos dois isolados de *Escovopsis*, em todos os tratamentos. Já o crescimento de *Syncephalastrum* sp. não apresentou diferenças quanto ao controle (Figura 10). Algo semelhante ocorreu com as interações entre *T. virens* e *Escovopsis* spp., onde os isolados de *Escovopsis* foram inibidos por

T. virens nas quatro fontes nutricionais. Da mesma forma, o crescimento de *T. virens* não apresentou diferenças quanto ao controle, ocupando a área total da placa quando interagindo com *Escovopsis*. De maneira oposta, o co-cultivo entre *T. virens* e *Syncephalastrum* sp. ocasionou a inibição do crescimento de ambos os fungos, em todos os tratamentos. De um modo geral, os isolados de *Escovopsis* apresentaram crescimento reduzido em interações em glicose e xilose. Entretanto, em maltose, *Escovopsis* sp. LESF 023 apresentou crescimento estimulado frente a *Escovopsis* sp. LESF 046 (Figura 10).

Figura 10. Área de crescimento de cada um dos isolados em controle e co-cultivo, nas diferentes fontes nutricionais. O controle compreende o crescimento do isolado na presença dele mesmo. (-) Sem interação. *Trichoderma virens* LESF 004; *Escovopsis* spp. (LESF 023 e LESF 046); *Syncephalastrum* sp. LESF 127; M1: Mutualista *L. gongylophorus* AS; M2: Mutualista *Leucoagaricus* sp. MT; E. Jardim: extrato de jardim de fungo.



Fonte: Elaborado pela autora.

6 DISCUSSÃO

A composição e distribuição de nutrientes em um dado ambiente influenciam o tamanho, biodiversidade e estabilidade de populações microbianas, assim como nas interações entre microrganismos (RATZKE et al., 2020; ESTRELA et al., 2021). Considerando a complexidade nutricional dos jardins de fungo de formigas atíneas, investigamos como diferentes configurações nutricionais poderiam influenciar os resultados das interações entre fungos que habitam esses ambientes. Observamos que, além dos fungos mutualistas, *Leucoagaricus* sp. MT e *L. gongylophorus* AS, fungos potencialmente antagônicos como *Escovopsis* sp., *Syncephalastrum* sp. e *T. virens*, metabolizam nutrientes presentes no jardim de fungo. As interações entre os fungos antagonistas e o fungo cultivado pelas formigas parece ser modulada pelos nutrientes. De forma “nutriente-dependente”, a interação entre dois fungos pode variar em um *continuum* entre estímulo e inibição do crescimento, de acordo com os nutrientes nos quais estas ocorrem. Um padrão semelhante ocorre nas interações dos fungos antagonistas entre si.

Os isolados de *Escovopsis* spp. (LESF 023, LESF 046 e LESF 048) foram capazes de metabolizar xilose, apresentando crescimento superior a 32% da área da placa neste açúcar. Por outro lado, Man e colaboradores (2016) reportaram baixo crescimento de *E. weberi* na presença de xilose. Tais diferenças podem estar relacionadas: i) com variações metabólicas nas linhagens utilizadas, ou ii) variação metodológica (consideramos somente a área de crescimento dos fungos, enquanto Man et al., 2016 se baseia também na área de esporulação). O rápido crescimento de *T. virens* e *Syncephalastrum* sp. nos três açúcares reforça a eficiência e flexibilidade metabólica desses gêneros, que inclui a produção de enzimas glicolíticas, amilases e xilose redutase (CHET; INBAR, 1994; CHUTRAKUL et al., 2008; NAKARI-SETÄLÄ et al., 2009; ATANASOVA; DRUZHININA, 2010; MALINICH et al., 2019).

Todos os isolados utilizaram extrato bruto de jardim de fungo com relativa eficiência, o que poderia estar relacionado ao conteúdo nutricional mais diverso desse substrato. A composição nutricional dos jardins inclui aminoácidos livres (como beta-alanina, ácido aspártico, ácidos glutâmicos e ácido nicotínico), açúcares (como a manose, glicose, xilose, maltose, trealose, frutose, celobiose e ribose), polióis, lipídeos e ácidos carboxílicos (MARTIN et al., 1969; SILVA et al., 2003; HUANG et al., 2014; SOMERA et al., 2015). O crescimento dos três isolados de *Escovopsis* em extrato bruto de jardim foi superior ao seu crescimento nas fontes de açúcares, indicando que *Escovopsis* poderia requerer uma fonte nutricional mais diversa e complexa. No contexto da fungicultura, *Escovopsis* poderia atuar como um comensal,

utilizando os recursos nutricionais disponíveis no jardim. De acordo com a saúde da colônia, este poderia se tornar um patógeno, situação na qual poderia utilizar o fungo mutualista como recurso nutricional (JIMÉNEZ-GÓMEZ et al., 2021).

Os resultados das interações entre os microrganismos em diferentes nutrientes podem ser interpretados através da perspectiva de competição (GHOUL; MITRI, 2016). A competição pode ser definida como a disputa entre dois ou mais indivíduos por recursos essenciais finitos (TRINDER et al., 2013). Nesse sentido, açúcares simples parecem estimular a competição microbiana (FERNANDEZ; KENNEDY, 2015; BÖDEKER et al., 2016). Por exemplo, Chigineva e colaboradores (2009) mostraram que a adição de sacarose na rizosfera de *Populus tremula* (choupo-tremedor), *Quercus robur* (carvalho-vermelho) e *Picea abies* (píceia-europeia) altera a composição das comunidades microbianas associadas, aumentando a abundância relativa de alguns gêneros (como *Acremonium*) e diminuindo a de outros (como *Penicillium*). Nesse contexto, espécies de fungos r-estrategistas (espécies não especialistas que investem em crescimento acelerado, produzindo grande número de descendentes) são beneficiadas e se tornam dominantes. Por outro lado, espécies de fungos celulolíticos considerados k-estrategistas (espécies associadas a ambientes mais estáveis, que investem energia em crescimento e produzem proles menos numerosas) têm suas populações reduzidas. Assim, *T. virens* e *Syncephalastrum* sp. apresentariam vantagens competitivas em relação à *Escovopsis* e os fungos mutualistas, talvez devido ao rápido crescimento e a grande diversidade metabólica desses gêneros.

Os fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* possuem alta capacidade de dispersão, apresentando adaptações para os mais diversos ambientes (WANG; ZHUANG, 2020). A vantagem competitiva pode estar associada a genes que codificam: i) enzimas hidrolíticas, incluindo glucanases, quitinases e proteases; ii) chaperonas, que reparam os danos celulares provocados pelo crescimento em condições adversas; e iii) transportadores ABC, proteínas da membrana celular que facilitam a entrada de muitos nutrientes (RUOCCO et al., 2009). Já as vantagens competitivas de *Syncephalastrum* sp. podem estar relacionadas ao rápido processo germinativo, que tende a ocorrer por volta de 8 horas e 16 minutos, dependendo das condições de Atividade de Água (aw) e temperatura (HOCKING; MISCAMBLE, 1995). *Syncephalastrum* sp. também apresenta grande flexibilidade metabólica, incluindo a produção de enzimas como a β -amilase, lipases, desoxirribonucleases, celulasas, quitina deacetilase e sincefapepsina (CHOPRA et al., 1982; CHEN et al., 1993; HO et al., 1996; RAY; CHAKRAVERTY, 1998; AMORIM, et al., 2005; SAPRE et al. 2005). A flexibilidade metabólica e a taxa de crescimento de *T. virens* e *Syncephalastrum* sp. permitiria que esses

fungos consumissem nutrientes do meio antes que os demais fungos, limitando o acesso de *Escovopsis* e *Leucoagaricus* spp. a estes recursos. Uma vez que ambos apresentam vantagens competitivas semelhantes, *T. virens* e *Syncephalastrum* sp. inibem-se mutuamente, possivelmente, devido à restrição de espaço e nutrientes.

Por outro lado, *Escovopsis* parece apresentar desvantagem competitiva em alguma extensão. *Escovopsis weberi* (linhagem CC031208-10) apresenta um genoma relativamente reduzido em termos de quantidades de pares de bases e conteúdo genético, embora codifique genes críticos para a utilização de recursos oriundos do fungo mutualista (MAN et al., 2016). Apesar de *E. weberi* apresentar todos os genes necessários para o crescimento em meios contendo uma única fonte de carbono, este isolado demonstrou crescimento muito lento na presença dos açúcares, quando comparado a linhagens de *Trichoderma atroviride*. Em *Escovopsis*, a modulação do metabolismo de nutrientes pode não apresentar base filogenética, de modo que clados próximos podem apresentar diferentes padrões de crescimento em uma mesma fonte nutricional. Quando *Escovopsis* sp. LESF 046 e *Escovopsis* sp. LESF 023 interagiram entre si, ambos foram inibidos nos meios contendo glicose, xilose e extrato de jardim de fungo. No entanto, *Escovopsis* sp. LESF 023 apresentou vantagem competitiva no meio contendo maltose, inibindo *Escovopsis* sp. LESF 046.

Embora as interações entre *Escovopsis* e *Leucoagaricus* spp. sejam comumente interpretadas como interações patógeno-hospedeiro (CURRIE et al., 2001; CURRIE et al., 2003; GERARDO et al., 2006), consideramos possível que os fungos estejam competindo por recursos nutricionais (WICKLOW, 1992). *Escovopsis* parece apresentar vantagens competitivas *in vitro*, que incluem a atração em direção ao fungo mutualista através da quimiotaxia (GERARDO et al., 2006) e produção de metabólitos (como alcalóides do tipo shearinina que apresentam ação antifúngica; FOLGARAIT et al., 2011; BOYA et al., 2017; VARANDA-HAIFIG et al., 2017; DHODARY et al., 2018). Os fungos mutualistas cultivados pelas atíneas derivadas, por sua vez, apresentam alto grau de especificidade das adaptações para vida em simbiose (como a produção de gongilídios e alterações metabólicas; DE FINE LICHT et al., 2014; NYGAARD et al., 2016). Por dependerem das formigas para sua alimentação, proteção e reprodução, na ausência desses insetos e das bactérias, os fungos mutualistas apresentariam grande desvantagem competitiva, independente do recurso nutricional disponível. No jardim de fungo, por outro lado, ambos os fungos apresentariam vantagens e desvantagens competitivas. Nesse sentido, o fungo mutualista degrada polímeros vegetais recalcitrantes, capacidade que não é sugerida pelo genoma de *Escovopsis*. Assim, *Leucoagaricus* sp. poderia apresentar maior facilidade em assimilar o conteúdo nutricional

proveniente da biomassa vegetal incorporada (DE SIQUEIRA et al., 1998; AYLWARD et al., 2013; VIGUERAS et al., 2017). Já *Escovopsis* seria favorecido pelos polissacarídeos lábeis disponíveis no jardim (SILVA et al., 2003), além do crescimento acelerado em relação ao mutualista. De fato, a inibição do fungo mutualista em ensaios de co-cultivo *in vitro* aparentemente não é replicada nas colônias, de modo que estas se recuperam e sobrevivem à infecção por *Escovopsis* (JIMÉNEZ-GÓMEZ et al., 2021). Nossa estratégia consistiu em verificar o crescimento e interações em nutrientes específicos e de forma isolada. Embora essa configuração não represente fielmente as interações que ocorrem no jardim, esta consiste em uma simplificação útil para compreender a influência dos recursos nutricionais na dinâmica das interações microbianas.

7 CONCLUSÕES

Verificamos que os nutrientes que compõem os jardins de fungo influenciam as interações entre *Leucoagaricus* spp., *Escovopsis* spp., *Syncephalastrum* sp. e *Trichoderma virens*. Nossos resultados demonstram a plasticidade das interações desses fungos e reforçam a importância de se considerar o contexto ambiental e ecológico durante o estudo de interações simbióticas. Estudos futuros deverão considerar a complexidade das interações que ocorrem nos jardins, assim como avaliar a influência de outros fatores ambientais na dinâmica das interações dos fungos associados às colônias das atíneas.

REFERÊNCIAS

- ABRÀMOFF, M. D.; MAGALHÃES, P. J.; RAM, S. J. Image processing with ImageJ. **Biophotonics International**, Pittsfield, v. 11, n. 7, p. 36-42, 2004.
- ALCALDE, F. S. C. Elucidação do destino metabólico de glicose no fungo filamentoso *Trichoderma reesei* por análise EST (Expressed Sequence Tags) e “microarrays” de cDNA. 2002. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Instituto de Química, São Paulo, 2002.
- AMORIM, R. V. S.; LEDINGHAM, W. M.; FUKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Screening of chitin deacetylase from Mucoralean strains (Zygomycetes) and its relationship to cell growth rate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 19-23, 2005.
- ATANASOVA, L.; DRUZHININA, I. S. Global nutrient profiling by Phenotype MicroArrays: a tool complementing genomic and proteomic studies in conidial fungi. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 11, n. 3, p. 151-168, 2010.
- AYLWARD, F. O.; BURNUM, K. E.; SCOTT, J. J.; SUEN, G.; TRINGE, S. G.; ADAMS, S. M. et al. Metagenomic and metaproteomic insights into bacterial communities in leaf-cutter ant fungus gardens. **The ISME journal**, v. 6, n. 9, p. 1688-1701, 2012.
- AZCÓN, R.; AMBROSANO, E.; CHAREST, C. Nutrient acquisition in mycorrhizal lettuce plants under different phosphorus and nitrogen concentration. **Plant Science**, v. 165, n. 5, p. 1137-1145, 2003.
- BARCOTO, M. O.; PEDROSA, F.; BUENO, O. C.; RODRIGUES, A. Pathogenic nature of *Syncephalastrum* in *Atta sexdens rubropilosa* fungus gardens. **Pest management science**, v. 73, n. 5, p. 999-1009, 2017.
- BASS, M.; CHERRETT, J.M. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **Physiology Entomology**, v. 20, p. 1-6, 1995.
- BAUTZ, K. R.; CAIXETA, M. C.; DEL PUPPO, N. P.; RODRIGUES, A.; KLOSS, T. G.; ELLIOT, S. L. Limited impacts of the fungus *Syncephalastrum* on nests of leaf-cutting ants. **Fungal Ecology**, v. 62, p. 101198, 2023.
- BETHLENFALVAY, G. J.; SCHÜEPP, H. Arbuscular mycorrhizas and agrosystem stability. **Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems**, p. 117-131, 1994.
- BIEDERMANN, P. H.; ROHLFS, M. (2017). Evolutionary feedbacks between insect sociality and microbial management. **Current opinion in insect science**, v. 22, p. 92-100, 2017.
- BIZARRIA, R.; MOIA, I. C.; MONTOYA, Q. V.; POLEZEL, D. A.; RODRIGUES, A.

Soluble compounds of filamentous fungi harm the symbiotic fungus of leafcutter ants. **Current microbiology**, v. 75, p. 1602-1608, 2018.

BÖDEKER, I. T.; LINDAHL, B. D.; OLSON, Å.; CLEMMENSEN, K. E. Mycorrhizal and saprotrophic fungal guilds compete for the same organic substrates but affect decomposition differently. **Functional Ecology**, v. 30, n. 12, p. 1967-1978, 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.

BOYD, N. D.; MARTIN, M. M. Faecal proteinases of the fungus-growing ant, *Atta texana*: their fungal origin and ecological significance. **Journal of Insect Physiology**, v. 21, n. 11, p. 1815-1820, 1975.

BRANDÃO, C. R. F.; MAYHÉ-NUNES, A. J.; SANHUDO, C. E. D. Taxonomia e filogenia das formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.) Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo. Viçosa: Ed. UFV, 2011, p. 27-48.

BRANSTETTER, M. G.; JEŠOVNIK, A.; SOSA-CALVO, J.; LLOYD, M. W.; FAIRCLOTH, B. C.; BRADY, S. G.; SCHULTZ, T. R. Dry habitats were crucibles of domestication in the evolution of agriculture in ants. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 284, n. 1852, p. 20170095, 2017.

BUFFIE, C. G.; PAMER, E. G. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 11, p. 790-801, 2013.

CABANA, F.; CLAYTON, J. B.; NEKARIS, K. A. I.; WIRDATETI, W.; KNIGHTS, D.; SEEDORF, H. Nutrient-based diet modifications impact on the gut microbiome of the Javan slow loris (*Nycticebus javanicus*). **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.

CALDERA, E. J.; POULSEN, M.; SUEN, G.; CURRIE, C. R. Insect symbioses: A case study of past, present and future fungus-growing and research. **Environmental Entomology**, College Park, v. 38, n. 1, p. 78-92, 2009.

CHAPELA, I.; REHNER, S.A; SCHULTZ, T.R, MUELLER, U.G. Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. **Science**. Washington, v.266, n.5191, p. 1691-1694, 1994.

CHAVERRI, P.; SAMUELS, G. J. *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): species with green ascospores. *Studies in Mycology*, Utrecht, v. 48, [s.n], p. 1-116, 2003.

CHEN, L. Y.; HO, H. C.; TSAI, Y. C.; LIAO, T. H. Deoxyribonuclease of *Syncephalastrum racemosum*-enzymatic properties and molecular structure. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 303, n. 1, p. 51-56, 1993.

CHET, I.; INBAR, J. Biological control of fungal pathogens. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 48, n. 1, p. 37-43, 1994.

CHERRETT, J. M. Possible reasons for the mutualism between leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) and their fungus. **Biol. Ecol. Mediter**, v. 7, p. 113-122, 1980.

CHIGINEVA, N. I.; ALEKSANDROVA, A. V.; TIUNOV, A. V. The addition of labile carbon alters litter fungal communities and decreases litter decomposition rates. **Applied Soil Ecology**, v. 42 n. 3, p. 264-270, 2009.

CHOPRA, A. K.; CHANDER, H.; SINGH, J. Lipolytic activity of *Syncephalastrum racemosum*. **Journal of dairy science**, v. 65, n. 10, p. 1890-1894, 1982.

CHUTRAKUL, C.; Alcocer, M.; Bailey, K.; Peberdy, J.F. The production and characterisation of trichotoxin peptaibols, by *Trichoderma asperellum*. **Chemistry & biodiversity**, v. 5, n. 9, p. 1694-1706, 2008.

CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 96, n. 7, p. 7998-8002, 1999.

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

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

CURRIE, C. R.; WONG, B.; STUART, A. E. et al. Ancient tripartite coevolution in the attine ant microbe symbiosis. **Science**, Washington, v. 299, n. 5605, p. 386-388, 2003.

DASKIN, J. H.; ALFORD, R. A. Context-dependent symbioses and their potential roles in wildlife diseases. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 279, n. 1733, p. 1457-1465, 2012.

DE FINE LICHT, H.; BOOMSMA, J. J.; TUNLID, A. Forage collection, substrate preparation, and diet composition in fungus-growing ants. **Ecological Entomology**, v. 35, n. 3, p. 259-269, 2010.

DE FINE LICHT, H.; BOOMSMA, J. J.; TUNLID, A. Symbiotic adaptations in the fungal cultivar of leaf-cutting ants. **Nature Communications**, London, v. 5, n. 5675, p. 1-10, 2014.

DE FINE LICHT, H. H.; SCHIØTT, M.; ROGOWSKA-WRZESINSKA, A.; NYGAARD, S.; ROEPSTORFF, P.; BOOMSMA, J. J. Laccase detoxification mediates the nutritional alliance between leaf-cutting ants and fungus-garden symbionts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 2, p. 583-587, 2013.

DE SIQUEIRA, C. G.; BACCI JR, M.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. 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.

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.

ESTRELA, S.; SANCHEZ-GOROSTIAGA, A.; VILA, J. C.; SANCHEZ, A. Nutrient dominance governs the assembly of microbial communities in mixed nutrient environments. **Elife**, v. 10, p. e65948, 2021.

FAN, L.; LIU, M.; SIMISTER, R.; WEBSTER, N. S.; THOMAS, T. Marine microbial symbiosis heats up: the phylogenetic and functional response of a sponge holobiont to thermal stress. **The ISME journal**, v. 7, n. 5, p. 991-1002, 2013.

FERNANDEZ, C. W.; KENNEDY, P. G. Revisiting the ‘Gadgil effect’: do interguild fungal interactions control carbon cycling in forest soils?. **New phytologist**, v. 209, n. 4, p. 1382-1394, 2015.

FERNÁNDEZ-MARÍN, H.; ZIMMERMAN, J. K.; REHNER, S.A.; WCISLO, W. T. Active use of the metapleural glands by ants in controlling fungal infection. **Proceedings of the Royal Society of London, Series B**, London, v. 273, n.1594, p. 1689–1695, 2006.

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

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.

FONTAINE, S. S.; NOVARRO, A. J.; KOHL, K. D. Environmental temperature alters the digestive performance and gut microbiota of a terrestrial amphibian. **Journal of**

Experimental Biology, v. 221, n. 20, p. jeb187559, 2018.

FRANCOEUR, C. B.; MAY, D. S.; THAIRU, M. W.; HOANG, D. Q., PANTHOFER, O.; BUGNI, T. S.; 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.

FRANKEL, J. S.; MALLOTT, E. K.; HOPPER, L. M.; ROSS, S. R.; AMATO, K. R. The effect of captivity on the primate gut microbiome varies with host dietary niche. **American journal of primatology**, v. 81, n. 12, p. e23061, 2019.

FUGITA, T. P. L. Desempenho de leveduras que metabolizam xilose para produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. 2010. 60f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Jaboticabal, 2010.

FUHRMAN, J. A.; CRAM, J. A.; NEEDHAM, D. M. Marine microbial community dynamics and their ecological interpretation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 133-146, 2015.

GERARDO, N. M.; JACOBS, S. R.; CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G. Ancient host-pathogen associations maintained by specificity of chemotaxis and antibiosis. **Plos Biology**, v. 4, n. 8, p. 235, 2006.

GHOUL, M.; MITRI, S. The ecology and evolution of microbial competition. **Trends in microbiology**, v. 24, n. 10, p. 833-845, 2016.

GONZE, D.; COYTE, K. Z.; LAHTI, L.; FAUST, K. Microbial communities as dynamical systems. **Current opinion in microbiology**, v. 44, p. 41-49, 2018.

HACQUARD, S.; GARRIDO-OTER, R.; GONZÁLEZ, A.; SPAEPEN, S.; ACKERMANN, G.; LEBEIS, S.; SCHULZE-LEFERT, P. Microbiota and host nutrition across plant and animal kingdoms. **Cell host & microbe**, v. 17, n. 5, p. 603-616, 2015.

HASHEM, A. H.; SULEIMAN, W. B.; ABU-ELREESH, G.; SHEHABELDINE, A. M.; KHALIL, A. M. A. Sustainable lipid production from oleaginous fungus *Syncephalastrum racemosum* using synthetic and watermelon peel waste media. **Bioresource Technology Reports**, v. 12, p. 100569, 2020.

HOBOT, J. A.; GULL, K. 1977. The influence of glucose availability on events during germination of *Syncephalastrum racemosum* sporangiospores. **Microbiology**, v. 98, n. 2, p. 431-437, 1977.

HOCKING, A. D.; MISCAMBLE, B. F. Water relations of some Zygomycetes isolated from

food. **Mycological Research**, Cambridge, v. 99, n. 9, p. 1113-1118, 1995.

HO, H.C.; CHEN, L.Y.; LIAO, T.H. Identification of a Fungal Protein of *Syncephalastrum racemosum* Aspartic Proteinase. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 334, n. 1, p. 97-103, 1996.

HOOPER, L. V.; LITTMAN, D. R.; MACPHERSON, A. J. Interactions between the microbiota and the immune system. **Science**, v. 336, n. 6086, p. 1268-1273, 2012.

HUANG, E. L.; AYLWARD, F. O.; KIM, Y.-M.; WEBB-ROBERTSON, B.-J. M.; NICORA, C. D.; HU, Z.; METZ, T. O.; LIPTON, M. S. et al. The fungus gardens of leaf-cutter ants undergo a distinct physiological transition during biomass degradation. **Environmental Microbiology Reports**, v. 6, n. 4, p. 389–395, 2014.

HUUS, K. E.; LEY, R. E. Blowing hot and cold: body temperature and the microbiome. **Msystems**, v. 6, n. 5, p. e00707-21, 2021.

JEFFRIES, P. Biology and ecology of mycoparasitism. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, n. S1, p. 1284–1290, 1995.

JIMÉNEZ-GÓMEZ, I.; BARCOTO, M. O.; MONTOYA, Q. V.; GOES, A. C.; MONTEIRO, L. S. V. E.; BUENO, O. C.; RODRIGUES, A. Host Susceptibility Modulates *Escovopsis* Pathogenic Potential in the Fungiculture of Higher Attine Ants. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 67344, 2021.

JOHNSTON, M. Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast and other cells. **Trends in Genetics**, v. 15, n. 1, p. 29-33, 1999.

JOHNSON, N. C.; GRAHAM, J. H.; SMITH, F. A. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism–parasitism continuum. **The New Phytologist**, v. 135, n. 4, p. 575-585, 1997.

KOHL, K. D.; YAHN, J. Effects of environmental temperature on the gut microbial communities of tadpoles. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 1561-1565, 2016.

KOOIJ, P. W.; PULLENS, J. W.; BOOMSMA, J. J.; SCHIØTT, M. Ant mediated redistribution of a xyloglucanase enzyme in fungus gardens of *Acromyrmex echinatior*. **BMC microbiology**, v. 16, n. 1, p. 1-9, 2016.

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.

KOTHARI, S. K.; MARSCHNER, H.; GEORGE, E. Effect of VA mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms on root and shoot morphology, growth and water relations in maize. **New Phytologist**, v. 116, n. 2, p. 303-311, 1990.

KOIDE, R. T. Nutrient supply, nutrient demand and plant response to mycorrhizal infection. **New Phytologist**, v. 117, n. 3, p. 365-386, 1991.

LEUNG, T. L. F.; POULIN, R. Parasitism, commensalism, and mutualism: exploring the shades of symbioses. **Vie et Milieu**, v. 58, n. 2, p. 107–115, 2008.

LI, H.; SOSA-CALVO, J.; HORN, H. A.; PUPO, M. T.; CLARDY, J.; RABELING, C.; SCHULTZ, T.; CURRIE, C. R. Convergent evolution of complex structures for ant–bacterial defensive symbiosis in fungus-farming ants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 115, n. 42, p. 10720-10725, 2018.

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

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

MALINICH, E. A.; WANG, K.; MUKHERJEE, P. K.; KOLOMIETS, M.; KENERLEY, C. M. Differential expression analysis of *Trichoderma virens* RNA reveals a dynamic transcriptome during colonization of *Zea mays* roots. **BMC genomics**, v. 20, n. 1, p. 1-19, 2019.

MAN, T. J. B.; STAJICH, J. E.; KUBICEKC, C. P. et al. Small genome of the fungus *Escovopsis weberi*, a specialized disease agent of ant agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 113, n. 13, p. 3567–3572, 2016.

MARTIARENA, M. J. S.; DEVEAU, A.; MONTOYA, Q. V.; FLÓREZ, L. V.; RODRIGUES, A. The Hyphosphere of Leaf-Cutting Ant Cultivars Is Enriched with Helper Bacteria. **Microbial Ecology**, p. 1-16, 2023.

MARTIN, M. M.; MARTIN, J. S. The biochemical basis for the symbiosis between the ant, *Atta colombica tonsipes*, and its food fungus. **Journal of Insect Physiology**, v. 16, n. 1, p. 109-119, 1970.

MARTIN, M. M.; MARTIN, J. S. The presence of protease activity in the rectal fluid of primitive attine ants. **Journal of insect physiology**, v. 17, n. 10, p. 1897-1906, 1971.

MEIRELLES, L. A.; MCFREDERICK, Q. S.; RODRIGUES, A.; MANTOVANI, J. D.; DE MELO, C. R.; FERREIRA, H.; MUELLER, U. G. Bacterial microbiomes from vertically transmitted fungal inocula of the leaf-cutting ant *Atta texana*. **Environmental Microbiology Reports**, v. 8, n. 5, p. 630-640, 2016.

MONTOYA, Q. V.; MEIRELLES, L. A.; CHAVERRI, P.; RODRIGUES, A. Unraveling *Trichoderma* species in the attine ant environment: description of three new taxa. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 109, n. 5, p. 633-651, 2016.

MOELLER, A. H.; IVEY, K.; CORNWALL, M. B.; HERR, K.; REDE, J.; TAYLOR, E. N.; GUNDERSON, A. R. The lizard gut microbiome changes with temperature and is associated with heat tolerance. **Applied and environmental microbiology**, v. 86, n. 17, p. e01181-20, 2020.

MOLLER, I. E.; DE FINE LICHT, H. H.; HARHOLT, J.; WILLATS, W. G.; BOOMSMA, J. J. The dynamics of plant cell-wall polysaccharide decomposition in leaf-cutting ant fungus gardens. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. e17506, 2011.

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

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

NABITY, P. D.; BARRON-GAFFORD, G. A.; WHITEMAN, N. K. Intraspecific competition for host resources in a parasite. **Current Biology**, v. 31, n. 6, p. 1344-1350, 2021.

NAKARI-SETÄLÄ, T.; PALOHEIMO, M.; KALLIO, J.; VEHEMAANPERÄ, J.; PENTTILÄ, M.; SALOHEIMO, M. Genetic modification of carbon catabolite repression in *Trichoderma reesei* for improved protein production. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 14, p. 4853-4860, 2009.

NEWMAYER, D. Filtering small quantities of conidial suspensions to remove mycelial fragments. **Fungal Genetics Newsletter**, Kansas City, v. 37, n. 1, p. 27. 1990.

NYGAARD, S.; HU, H.; LI, C.; SCHIOTT, M.; CHEN, Z.; YANG, Z.; BOOMSMA, J. J. Reciprocal genomic evolution in the ant–fungus agricultural symbiosis. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 12233, 2016.

PANHOTA, R. S. Degradação da Glicose pelo Bacterioplâncton: Mineralização e Formação de Produtos Intermediários. 2002. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2002.

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

PINTO-TOMÁS, A. A.; ANDERSON, M. A.; SUEN, G.; STEVENSON, D. M.; CHU, F. S.; CLELAND, W. W. et al. Symbiotic nitrogen fixation in the fungus gardens of leaf-cutter ants. *Science*, v. 326, n. 5956, p. 1120-1123, 2009.

POULSEN, M.; BOT, A. N. M.; NIELSEN, M. G.; BOOMSMA, J. J. Experimental evidence for the costs and hygienic significance of the antibiotic metapleural gland secretion in leafcutting ants. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. New York, v. 52, p. 151-157, 2002.

POULSEN, M.; CURRIE, C. R. Symbiont interactions in a tripartite mutualism: exploring the presence and impact of antagonism between two fungus-growing ant mutualists. *PLoS One*, v. 5, n. 1, p. e8748, 2010.

POLTRONIERI, H.; SERZEDELLO, A. Produção de biomassa de *Rozites gongylophora* visando emprego como complemento alimentar. *Reviews Microbiology*, v.11, n. 4, p. 131-135, 1980.

QUINLAN, R. J.; CHERRETT, J. M. The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L). *Ecological Entomological*, v. 4, p. 151-160, 1979.

RAMSBY, B. D.; HOOGENBOOM, M. O.; WHALAN, S.; WEBSTER, N. S. Elevated seawater temperature disrupts the microbiome of an ecologically important bioeroding sponge. *Molecular Ecology*, v. 27, n. 8, p. 2124-2137, 2018.

RATZKE, C.; BARRERE, J.; GORE, J. Strength of species interactions determines biodiversity and stability in microbial communities. *Nature ecology & evolution*, v. 4, n. 3, p. 376-383, 2020.

RAY, R. R.; CHAKRAVERTY, R. Extracellular β -amylase from *Syncephalastrum racemosum*. *Mycological research*, v. 102, n. 12, p. 1563-1567, 1998.

R Core Team (2018) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

REN, G.; MENG, T.; MA, Y. Sugars altered fungal community composition and caused high network complexity in a *Fusarium* wilt pathogen-infested soil. *Biology and Fertility of Soils*, v. 56, p. 395-409, 2020.

REYNOLDS, H. T.; CURRIE, C. R. Pathogenicity of *Escovopsis weberi*: the parasite

of the attine-microbe symbiosis directly consumes the ant-cultivated fungus. **Mycologia**, Lawrence, v. 96, n. 5, p. 955–959, 2004.

RODRIGUES, A.; BACCI, M. Jr.; MUELLER, U. G.; ORTIZ, A.; PAGNOCCA, F. C. Microfungal “weeds” in the leafcutter ant symbiosis. **Microbial Ecology**, Washington, v. 56, n. 4, p. 604-614, 2008.

RODRIGUES, A.; MÜELLER, U. G.; ISHAK, H. D.; BACCI, M. J.; PAGNOCCA, F. C. Ecology of microfungal communities in gardens of fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae): A year-long survey of three species of attine ants in Central Texas. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 78, n. 2, p. 244–255, 2011.

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

RØNHEDE, S.; BOOMSMA, J. J.; ROSENDAHL, S. Fungal enzymes transferred by leaf-cutting ants in their fungus gardens. **Mycological research**, v. 108, n. 1, p. 101-106, 2004.

RUOCCO, M.; LANZUISE, S.; VINALE, F.; MARRA, R.; TURRÀ, D.; WOO, S. L.; LORITO, M. Identification of a new biocontrol gene in *Trichoderma atroviride*: the role of an ABC transporter membrane pump in the interaction with different plant-pathogenic fungi. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 22, n. 3, p. 291-301, 2009.

SAPRE, M. P.; JHA, H.; PATIL, M. B. Purification and characterization of a thermostable-cellulase free xylanase from *Syncephalastrum racemosum* Cohn. **The Journal of general and applied microbiology**, v. 51, n. 6, p. 327-334, 2005.

SCHIOTT, M.; ROGOWSKA-WRZESINSKA, A.; ROEPSTORFF, P.; BOOMSMA, J. J. Leaf-cutting ant fungi produce cell wall degrading pectinase complexes reminiscent of phytopathogenic fungi. **BMC biology**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2010.

SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America**, Washington, v. 105, n. 14, p. 5435-54401, 2008.

SCHULTZ, T. R. The convergent evolution of agriculture in humans and fungus-farming ants. **The convergent evolution of agriculture in humans and insects**, 2022.

SEPULVEDA, J.; MOELLER, A. H. The effects of temperature on animal gut microbiomes. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 384, 2020.

SERRANO, D. F. T. Identificação de alterações no perfil proteômico de uma estirpe industrial mutante, *Saccharomyces cerevisiae* PYCC 5334, capaz de consumo simultâneo de glucose e maltose. 2017. Dissertação (Mestrado) - Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Lisboa, 2017.

SEYIS, I.; AKSOZ, N. Effect of carbon and nitrogen sources on xylanase production by *Trichoderma harzianum* 1073 D3. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 55, n. 2, pág. 115-119, 2005.

SMITH, V. H.; JONES, T. P.; SMITH, M. S. Host nutrition and infectious disease: an ecological view. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 3, n. 5, p. 268-274, 2005.

SILVA, A.; BACCI, M. Jr.; SIQUEIRA, C. G. et al. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 49, n. 4, p. 307–313, 2003.

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

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**, Washington, v. 64, n. 12, p. 4820–4822, 1998.

SILVA, R.N.; STEINDORFF, A.S.; MONTEIRO, V.N. Metabolic diversity of *Trichoderma*. **In Biotechnology and biology of Trichoderma**, v. p. 363-376, 2014.

SIX, D. L.; KLEPZIG, K. D. Context dependency in bark beetle-fungus mutualisms revisited: assessing potential shifts in interaction outcomes against varied genetic, ecological, and evolutionary backgrounds. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 682187, 2021.

SOMERA, A. F.; LIMA, A. M.; DOS SANTOS, A. J.; LANÇAS, F. M.; BACCI Jr, M. Leaf-Cutter Ant Fungus Gardens are Biphase Mixed Microbial Bioreactors that Convert Plant Biomass to Polyols with Biotechnological Application. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 81, n. 13, p. 4525-4535, 2015.

SONNENBURG, E. D.; SONNENBURG, J. L. Starving our microbial self: the deleterious consequences of a diet deficient in microbiota-accessible carbohydrates. **Cell metabolism**, v. 20, n. 5, p. 779-786, 2014.

SOSA-CALVO, J.; SCHULTZ, T. R.; BRANDÃO, C. R. F.; KLINGENBERG, C.;

FEITOSA, R. M.; RABELING, C.; BACCI Jr, M.; LOPES, C. T.; VASCONCELOS, H. L. *Cyatta abscondita*: Taxonomy, Evolution, and Natural History of a New Fungus-Farming Ant Genus from Brazil. **PloS One**, San Francisco, v. 8, n. 11, p. e80498, 2013.

SWEET, M. J.; BULLING, M. T. On the importance of the microbiome and pathobiome in coral health and disease. **Frontiers in Marine Science**, v. 4, p. 9, 2017.

THAPA, S.; ZHANG, Y.; ALLEN, M. S. Effects of temperature on bacterial microbiome composition in *Ixodes scapularis* ticks. **MicrobiologyOpen**, v. 8, n. 5, p. e00719, 2019.

THOMPSON, J. N. Variation in interspecific interactions. **Annual review of ecology and systematics**, v. 19, n. 1, p. 65-87, 1988.

TRINDER, C. J.; BROOKER, R. W.; ROBINSON, D. Plant ecology's guilty little secret: understanding the dynamics of plant competition. **Functional Ecology**, v. 27, p. 918–929, 2013.

VAULONT, S.; VASSEUR-COGNET, M.; KAHN, A. Glucose regulation of gene transcription. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 41, p. 31555-31558, 2000.

TRIPATHI, P.; SINGH, P. C.; MISHRA, A.; CHAUHAN, P. S.; DWIVEDI, S.; BAIS, R. T.; TRIPATHI, R. D. *Trichoderma*: a potential bioremediator for environmental clean up. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 15, p. 541-550, 2013.

TSO, G. H. W.; REALES-CALDERON, J. A.; TAN, A. S. M.; SEM, X.; LE, G. T. T.; TAN, T. G.; PAVELKA, N. Experimental evolution of a fungal pathogen into a gut symbiont. **Science**, v. 362, n. 6414, p. 589-595, 2018.

TURNBAUGH, P. J.; LEY, R. E.; MAHOWALD, M. A.; MAGRINI, V.; MARDIS, E. R.; GORDON, J. I. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1027-1031, 2006.

VAN BAEL, S. A.; FERNÁNDEZ-MARÍN, H.; VALENCIA, M. C.; ROJAS, E. I.; WCISLO, W. T.; HERRE, E. A. Two fungal symbioses collide: endophytic fungi are not welcome in leaf-cutting ant gardens. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 276, n. 1666, p. 2419-2426, 2009.

VAN BAEL, S. A.; SEID, M. A.; WCISLO, W. T. Endophytic fungi increase the processing rate of leaves by leaf-cutting ants (*Atta*). **Ecological Entomology**, v. 37, n. 4, p. 318-321, 2012.

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.

VIGUERAS, G.; PAREDES- HERNÁNDEZ, D.; REVAH, S.; VALENZUELA, J.; OLIVARES- HERNÁNDEZ, R.; LE BORGNE, S. Growth and enzymatic activity of *Leucoagaricus gongylophorus*, a mutualistic fungus isolated from the leaf- cutting ant *Atta mexicana*, on cellulose and lignocellulosic biomass. **Letters in applied microbiology**, v. 65, n. 2, p. 173-181, 2017.

WANG, C.; ZHUANG, W. Y. Carbon metabolic profiling of *Trichoderma* strains provides insight into potential ecological niches. **Mycologia**, v. 112, n. 2, p. 213-223, 2020.

WANG, Z.; JI, X.; WANG, S.; WU, Q.; XU, Y. Sugar profile regulates the microbial metabolic diversity in Chinese Baijiu fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 359, p. 109426, 2021.

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

WICKLOW, D. T. Interference competition. **The fungal community: its organization and role in the ecosystem, 2nd Edn. (Carroll, GC and Wicklow, DT, Eds.)**, p. 265-274, 1992.

ZHAO, B., XING, P., & WU, Q. L. Interactions between bacteria and fungi in macrophyte leaf litter decomposition. **Environmental microbiology**, v. 23, n.2, p. 1130-1144, 2021.