
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ALVARO DOS SANTOS NETO

**COMPETIÇÃO POR RECURSOS PELO
PARASITA FÚNGICO *Escovopsis***



Rio Claro
2018

ALVARO DOS SANTOS NETO

COMPETIÇÃO POR RECURSOS PELO PARASITA FÚNGICO *Escovopsis*

Orientador: Prof. Dr. André Rodrigues

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Rio Claro – SP

2018

S237c Santos Neto, Alvaro dos
Competição por recursos pelo parasita fúngico
Escovopsis / Alvaro dos Santos Neto. -- Rio Claro, 2018
30 p. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: André Rodrigues

1. Antagonismo. 2. Parasita-hospedeiro. 3. Interações
fúngicas. 4. Formigas atíneas. 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.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, que sempre proporcionaram boas oportunidades na vida, sendo uma dessas, a oportunidade de aprofundar meus estudos. Agradeço-os por terem me apoiado em todos os momentos difíceis e me fazerem persistir em busca dos meus objetivos.

Agradeço a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, por ter proporcionado a oportunidade de graduar no curso de Ciências Biológicas, com um ótimo nível de qualidade de ensino e um ambiente onde pude conhecer e formar amizades, as quais foram essenciais na minha jornada acadêmica e na minha vida.

Agradeço a todos os professores por esses anos que estive na graduação. Eles foram fundamentais e essenciais para minha formação. Sou grato em especial ao Prof. Dr. André Rodrigues, que foi de fundamental importância nos meus conhecimentos adquiridos, me orientando e dedicando de seus esforços para que fosse possível a conclusão desse trabalho.

Por fim, agradeço a todos os meus colegas do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF), que compartilharam de seus conhecimentos e me ajudaram para que esse trabalho fosse finalizado.

RESUMO

Devido ao caráter ubíquo dos micro-organismos, a competição por recursos é inevitável. Fungos do gênero *Escovopsis* são considerados parasitas do fungo cultivado pelas formigas cortadeiras de folhas (saúvas e quenquês). Esses insetos cultivam um fungo, o qual é utilizado como alimento para as colônias. É sabido que mais de um isolado de *Escovopsis* pode ser encontrado em uma mesma colônia desses insetos. Portanto, é possível que isolados mais infectivos do parasita apresentem maior sucesso no estabelecimento da infecção do hospedeiro, do que aqueles menos nocivos. Nosso objetivo foi avaliar se há competição entre isolados de *Escovopsis* pelo mesmo recurso. Com experimentos de co-cultivo *in vitro*, investigamos as interações entre três isolados de *Escovopsis* tanto na ausência, quanto na presença do fungo cultivado por *Atta sexdens* (saúva-limão). Na ausência do fungo das formigas, o crescimento dos isolados de *Escovopsis* foi menor em co-cultivo, em comparação com o controle (isolados de *Escovopsis* crescendo separadamente). Quando o fungo mutualista foi cultivado na presença de dois isolados de *Escovopsis* simultaneamente, seu crescimento foi semelhante a aquele quando na presença de apenas um isolado do parasita. Esses resultados sugerem uma possível competição entre isolados de *Escovopsis* pelo hospedeiro. Estudos futuros são necessários para elucidar os mecanismos que atuam nessas interações.

Palavras chave: Antagonismo. Parasita-hospedeiro. Interações fúngicas. Formigas atíneas.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	5
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1	Competição entre fungos	7
2.2	Mutualismo formiga-fungo.....	8
2.3	Parasitas do gênero <i>Escovopsis</i>	10
3	OBJETIVO.....	12
4	MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1	Fungos e manutenção das culturas.....	13
4.2	Bioensaios de co-cultivo entre isolados de <i>Escovopsis</i> na ausência do fungo mutualista.....	13
4.3	Bioensaios de competição entre isolados de <i>Escovopsis</i> frente ao fungo mutualista.....	14
4.4	Análise dos dados	16
5	RESULTADOS	17
5.1	Co-cultivo entre isolados de <i>Escovopsis</i> na ausência do fungo mutualista	17
5.2	Co-cultivo entre isolados de <i>Escovopsis</i> na presença do fungo mutualista.....	18
5.2.1	Efeito no crescimento de <i>Escovopsis</i>	18
5.2.2	Efeito no crescimento do fungo mutualista	18
6	DISCUSSÃO	23
7	CONSIDERAÇÕES	26
	REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

Os micro-organismos estão presentes nos mais diversos ambientes. Diferentes micro-organismos ocorrem em um mesmo habitat, pressupondo que haja interação entre eles. Quando esse contato é duradouro, essas interações podem ser denominadas de simbioses. Quando os indivíduos envolvidos recebem benefícios recíprocos, tal associação é denominada de mutualismo. Entretanto, quando somente um deles é beneficiado, o simbiote se torna um comensal, sem afetar diretamente o outro. Por outro lado, quando um simbiote é prejudicado pelo outro, essa relação é considerada um parasitismo (LEUNG; POULIN, 2008).

As formigas cortadeiras de folhas da subtribo *Attina* (gêneros *Atta* e *Acromyrmex*) mantêm um mutualismo com fungos, considerado modelo para entendimento de interações ecológicas. As formigas forrageiam folhas e flores frescas como substrato para o crescimento do fungo, o qual é utilizado como principal alimento da colônia. Algumas espécies de formigas cortadeiras cultivam o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* (Basidiomycota: Agaricales: Agaricaceae; MUELLER et al., 2017). O material vegetal coletado é armazenado no jardim de fungo, uma estrutura composta por fragmentos vegetais e o micélio do fungo. Uma grande quantidade de material vegetal fresco é necessário para o crescimento e manutenção desse jardim. Com isso, esses insetos tornaram-se os herbívoros dominantes do Neotrópico (SCHULTZ; BRADY, 2008). Durante a evolução, as formigas atíneas e o fungo mutualista desenvolveram uma relação intrínseca, onde o fungo é um organismo domesticado e não apresenta a capacidade de viver fora da associação (CHAPELA et al., 1994; SCHULTZ; BRADY, 2008).

Outros micro-organismos presentes no substrato vegetal são frequentemente carregados para o interior das colônias desses insetos. Além disso, o transporte de micro-organismos indesejados também pode ser realizado no corpo das próprias formigas (AUGUSTIN et al., 2017). Assim, a matriz do jardim de fungo apresenta um microbioma complexo, composto por bactérias, fungos filamentosos e leveduras (SCOTT et al., 2010; RODRIGUES et al., 2011, 2014). Apesar das formigas apresentarem mecanismos de defesa do jardim, alguns micro-organismos conseguem se instalar em suas colônias. Um exemplo, é o fungo do gênero *Escovopsis*, que ocorre exclusivamente nos jardins das formigas atíneas (RUSSELL et al., 2017).

Escovopsis é considerado um parasita que inibe o crescimento de *L.*

gongylophorus (CURRIE et al., 1999). Infecções por esse parasita ocasiona um impacto negativo no *fitness* da colônia, podendo levar ao declínio da mesma (CURRIE, 2001; CURRIE; STUART, 2001). Os metabólitos ativos secretados pelo parasita podem destruir as hifas do fungo mutualista, levando-o à morte (VARANDA-HAIFIG et al., 2017). No estudo de Marfetán e colaboradores (2015), os autores sugerem que é necessário o contato entre as hifas do parasita e do hospedeiro para ocorrer a degradação do fungo mutualista.

Segundo Taerum, Cafaro e Currie (2010), em uma mesma colônia de formiga cortadeira podem ocorrer diferentes isolados de *Escovopsis* (da mesma espécie ou de espécies diferentes). Esses fungos podem competir entre si ou apresentarem sinergismo na infecção da colônia. Por exemplo, quando há a infecção por múltiplos isolados, o espectro de defesas que o fungo mutualista apresenta pode aumentar; da mesma forma em que a competição por diferentes isolados de *Escovopsis* pode selecionar o isolado mais infectivo do parasita (TAERUM; CAFARO; CURRIE, 2010).

No presente estudo, foram avaliadas as interações entre diferentes isolados de *Escovopsis* na presença e ausência do fungo cultivado (i.e. hospedeiro) pelas formigas cortadeiras. Buscamos responder se: (i) na ausência do fungo mutualista, isolados de *Escovopsis* competem entre si?; (ii) diferentes isolados de *Escovopsis* competem entre si na presença do fungo mutualista?; e (iii) isolados distintos de *Escovopsis* apresentam vantagens um sobre os outros no momento da infecção?

O presente estudo é de grande importância para o entendimento das interações fúngicas que ocorrem nas colônias de formigas cortadeiras. Tal conhecimento pode auxiliar futuros estudos que pretendem elucidar os mecanismos pelos quais diferentes isolados de *Escovopsis* levam vantagens em seu estabelecimento, em relação à outros. Entender as interações e os mecanismos é um passo importante para o uso desse micro-organismo no biocontrole das saúvas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Competição entre fungos

Os micro-organismos estão presentes nos mais diversos ambientes, o que inevitavelmente pode levar à competição por recursos (WICKLOW, 2005). Bactérias, fungos filamentosos e leveduras utilizam ferramentas (metabolismo secundário) que garantem o sucesso em diferentes habitats e também no confronto com outros organismos. Quando há uma demanda simultânea pelo mesmo recurso por duas ou mais populações, e esse recurso não satisfaz a demanda de ambas, há a competição interespecífica (WICKLOW, 2005). Além disso, pode haver a competição por exploração, onde um indivíduo domina o recurso de outros. No entanto, os recursos remanescentes não são afetados e podem ser explorados por outros organismos (WICKLOW, 2005).

Quando há competição, os micro-organismos utilizam mecanismos para que a sua fonte de recursos seja colonizada. A partir de comportamentos específicos e através de interações químicas, alguns desses organismos levam vantagens sobre outros (GROVER, 1997; WICKLOW, 2005). No estudo de Schroeckha et al. (2009) elucidou-se que, para ocorrer respostas específicas, é necessário um contato físico íntimo entre micro-organismos, no caso do estudo, entre o micélio de um fungo e bactérias. Dessa forma, a resposta específica é a liberação de metabólitos secundários pelos micro-organismos, favorecendo o domínio de um sobre o outro.

Os metabólitos secundários são formados a partir dos precursores do metabolismo primário. São produtos naturais de baixo peso molecular e possuem uma distribuição taxonômica restrita (KELLER; TURNER; BENNETT, 2005). São produzidos por questões fisiológicas, sociais ou predatórias específicas (KELLER; TURNER; BENNETT, 2005; O'BRIEN; WRIGHT, 2011). Dessa forma, esses compostos estão intimamente associados a ecologia de seus produtores (O'BRIEN; WRIGHT, 2011). No caso dos antibióticos, o principal motivo para que micro-organismos os produzam é para o favorecimento em ambientes pobres em nutrientes e melhor adaptação à competição, eliminando ou retardando o crescimento de seus competidores (O'BRIEN; WRIGHT, 2011).

A competição entre os organismos tem papel fundamental na sobrevivência, colonização e até a patogenicidade entre os indivíduos durante a interação

(SCHROECKHA et al., 2009). O antagonismo entre os fungos é uma das formas evolutivas que guiaram esses organismos a colonizarem ambientes e conseqüentemente, formarem populações que se diferenciam entre si (WICKLOW, 2005). Pode-se notar essa característica quando experimentos de co-cultivo *in vitro* são realizados. Cooney, Lauren e Menna (2001) realizaram esses experimentos com diversos isolados de *Fusarium* sp. na presença de *Fusarium graminearum*. O último é responsável por ocasionar infecções nas culturas de grãos. No estudo, os autores notaram que na presença de competidores, a produção da micotoxina produzida por *F. graminearum* foi afetada. Assim, é notável que a competição ocasiona efeitos indiretos na fisiologia e sucesso dos micro-organismos.

A competição entre fungos ocorre de várias formas. Pode ser pelo rápido crescimento, esporulação e adaptação ao estresse; uso de inibidores (metabólitos secundários) contra outras espécies; resistência aos inibidores de outras espécies; colonização de um nicho em especial; e se ambos organismos utilizam a mesma fonte de nutriente (LOSADA et al., 2018). Segundo Losada et al. (2018), espécies de *Aspergillus* normalmente crescem em ambientes onde há a presença de outros micro-organismos. Dessa maneira, esses fungos possuem características que os tornam capazes de lidar constantemente com competição. Relaciona-se então que o *fitness* das espécies é dependente de seus competidores, e não propriamente da espécie em si. Da mesma forma, a relação da produção de metabólitos secundários, está diretamente ligada ao ambiente e aos seus competidores. Os metabólitos secretados por um micro-organismo podem ser diferentes na presença de competidores distintos (LOSADA et al., 2018). Assim, os micro-organismos se adaptam para que sejam bem-sucedidos em seu estabelecimento em diferentes nichos ecológicos e na presença de variados competidores.

2.2 Mutualismo formiga-fungo

A subtribo Attina compreende formigas que cultivam fungos para alimentação. Tal grupo apresenta 15 gêneros e mais de 300 espécies de formigas, distribuídas na região neotropical, desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (MEHDIABADI; SCHULTZ, 2010; JEŠOVNIK; GONZÁLEZ; SCHULTZ, 2016). Tal associação fungo-inseto é resultado de cerca de 50 milhões de anos de co-evolução (SCHULTZ; BRADY, 2008). As espécies de formigas atíneas

consideradas basais (na filogenia), utilizam materiais diversos para o cultivo de seu fungo mutualista basidiomiceto, como folhas secas, carcaças e fezes de outros insetos. Por serem capazes de apresentar vida fora da associação, o fungo apresenta pouca adaptação para o mutualismo. Portanto, a domesticação de outros fungos é recorrente, assim a co-evolução entre as atíneas basais e o fungo mutualista é fraca ou até inexistente (KELLNER et al., 2017). A maioria dos fungos mutualistas cultivados pelas atíneas basais pertence à família Agaricaceae (Basidiomycota, tribo Leucocoprinae) (MUELLER et al., 1998). Porém, há uma exceção, as formigas do gênero *Apterostigma* cultivam fungos basidiomicetos da família Pterulaceae, conhecidos como “fungos coral” (SCHULTZ; BRADY, 2008). Esse é o único caso onde ocorreu a substituição de fungos mutualistas da família Agaricaceae.

Já as atíneas derivadas, são separadas em formigas não-cortadeiras e cortadeiras de folhas. As não-cortadeiras, dos gêneros *Trachymyrmex* e *Sericomyrmex*, utilizam material vegetal seco para o cultivo do parceiro fúngico. As cortadeiras de folhas, dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta*, utilizam folhas e flores frescas (SCHULTZ, BRADY, 2008). As formigas cortadeiras estabeleceram uma co-evolução antiga com dois clados de fungos basidiomicetos, de tal forma que esses fungos não são capazes de viverem livres na natureza (SCHULTZ; BRADY, 2008; MUELLER et al., 2017). No entanto, no estudo de Mueller e colaboradores (2017), desmistificou-se que apenas espécies de formiga atíneas derivadas (gênero *Trachymyrmex*, *Sericomyrmex* e as formigas cortadeiras do gênero *Atta* e *Acromyrmex*) cultivassem uma única espécie, ou seja, *Leucoagaricus gongylophorus*. Portanto, a premissa de que as formigas cortadeiras eram especializadas em cultivar apenas uma espécie de fungo (*L. gongylophorus*) foi derrubada.

O fungo mutualista apresenta uma estreita relação com as formigas cortadeiras. Esse desenvolveu uma estrutura diferenciada em suas hifas, conhecida como gongilídio. Localizada na extremidade da hifa, essa vesícula fornece aminoácidos essenciais e enzimas degradadoras de substrato vegetal às formigas (DE FINE LITCH; BOOMSMA; TUNLID, 2014). A partir das enzimas, o material vegetal trazido pelas formigas é degradado, dessa forma, compostos são liberados estimulando o crescimento do jardim de fungo e também provendo uma fonte de nutrição para as formigas. Aylward e colaboradores (2013) realizaram estudos que comprovaram que *L. gongylophorus* é o responsável por degradar o material vegetal do jardim de fungo das formigas cortadeiras. Foram identificadas 145 lignocelulases,

incluindo pectinases, xilanases, amilases e celulases, essas responsáveis por realizar a degradação da celulose, para que os nutrientes fossem convertidos e disponibilizados as formigas e ao jardim de fungo. *Leucoagaaricus gongylophorus* apresenta um elevado grau de domesticação. Sua aparente incapacidade de existir na forma de vida livre, sem a presença das formigas, ressalta sua dependência com esses insetos (SCHULTZ; BRADY, 2008).

2.3 Parasitas do gênero *Escovopsis*

Por nunca ter sido encontrado fora da associação com formigas atíneas, fungos do gênero *Escovopsis* são considerados micoparasitas específicos do fungo cultivado por esses insetos (CURRIE et al., 1999). Acredita-se que esse micoparasita co-evoluiu com o fungo mutualista, desde o início da fungicultura, há cerca de 50 milhões de anos (CURRIE et al., 2003; MEIRELLES et al., 2015). É possível que *Escovopsis* atue como um parasita necrotrófico, pois quando este infecta o fungo mutualista, metabólitos ativos são secretados, durante a infecção, destruindo as hifas do hospedeiro, e utiliza os produtos dessa quebra como fonte de nutrientes (REYNOLDS; CURRIE, 2004; VARANDA-HAIFIG et al., 2017).

A taxonomia referente a esse grupo de fungos ainda é recente. Até o momento apenas sete espécies foram descritas: *E. weberi* (MUCHOVEJ; DELLA LUCIA, 1990), *E. aspergilloides* (SEIFERT et al., 1995), *E. microspora*, *E. moelleri*, *E. lentecrescens* (AUGUSTIN et al., 2013), *E. kreiselii* (MEIRELLES et al., 2015) e *E. trichodermoides* (MASIULIONIS et al., 2015).

Taerum e colaboradores (2007) demonstraram que isolados de *Escovopsis* provenientes de jardins de *Acromyrmex* spp. podem infectar os jardins de *Atta* spp. Os autores concluíram que um mesmo isolado do parasita é capaz de infectar diversas colônias. O estudo também mostrou que isolados diferentes de *Escovopsis* não exibiram comportamento antagônico entre si, sugerindo que não haja competição entre eles, não havendo interferência para a obtenção de recursos (fungo mutualista). Contudo, uma mesma colônia de formiga cortadeira pode apresentar infecções simultâneas por diversos isolados de *Escovopsis*. Assim, isolados diferentes se encontram na busca por recursos em colônias e nas câmaras do jardim de fungo (TAERUM; CAFARO; CURRIE, 2010). Sabe-se que alguns isolados de *Escovopsis* apresentam mecanismos diferentes que afetam diretamente seu sucesso na infecção do

jardim. No estudo de Elizondo-Wallace; Asensio e Pinto-Tomás (2014), os resultados demonstraram que os mecanismos apresentados por alguns isolados conferem uma maior probabilidade de romper os mecanismos de defesa das formigas e do fungo mutualista. Dessa forma, sugere-se que alguns isolados possam apresentar vantagens em relação à outros, por possuírem mecanismos de ataque mais eficientes. Porém, essa vantagem apresentada pode estar relacionada à adaptação do parasita a um local em particular (KELLNER, 2013). Assim, quando há uma migração longe do seu local de origem, não há tempo suficiente para que haja a especiação do parasita na população local (ELIZONDO-WALLACE; ASENSIO; PINTO-TOMÁS, 2014).

Escovopsis na presença do fungo mutualista maximiza seu crescimento do parasita (FOLGARIT et al., 2011; CUSTODIO; RODRIGUES, 2018). Contudo, *Escovopsis* associados às colônias de atíneas basais apresentam maior atração por fungos mutualistas que parasitam na natureza, havendo impacto positivo em seu crescimento (GERARDO et al., 2006). Enquanto que, quando na presença de fungos mutualistas mais distantes filogeneticamente de seus hospedeiros naturais, apresentam crescimento mais lento (GERARDO et al., 2004; 2006). Portanto, há uma especificidade envolvida no estabelecimento do sistema parasita-hospedeiro. É sabido que tal especificidade é mediada por características referentes ao parasita, assim como ao hospedeiro, considerando as interações químicas que ocorrem entre eles (BIRNBAUM et al., 2016).

Embora é sabido que diferentes isolados de *Escovopsis* podem ocorrer em uma mesma colônia, a competição entre os isolados foi pouco estudada. A partir de experimentos *in vitro*, buscamos explorar aspectos desconhecidos da ecologia do fungo *Escovopsis*, como as interações que ocorrem entre isolados, na presença e na ausência do hospedeiro.

3 OBJETIVO

Descrever se há competição pelo hospedeiro por diferentes isolados do fungo parasita *Escovopsis*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Fungos e manutenção das culturas

Foram utilizados três isolados de *Escovopsis* provenientes de colônias de *Atta sexdens*, a saúva-limão (Tabela 1). Esses isolados foram analisados no estudo de Meirelles et al. (2015). A escolha desses fungos foi baseada na relação filogenética (fungos distantemente relacionados) e por serem provenientes da mesma área de coleta. Segundo Meirelles et al. (2015), esses isolados representam espécies ainda não descritas. Os isolados estão depositados no acervo do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF/IB/UNESP/Rio Claro), associado à Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP). Os fungos estão mantidos em suspensão de conídios, em glicerol 10% a - 80 °C e em água destilada estéril (Castellani).

Tabela 1. Origem dos isolados do gênero *Escovopsis* utilizados no estudo.

Código¹	Formiga	Código da colônia	Substrato	Cidade - Estado
LESF 029	<i>Atta sexdens</i>	13B	Jardim de fungo	Corumbataí - SP
LESF 362	<i>Atta sexdens</i>	AR090402-01	Jardim de fungo	Corumbataí - SP
LESF 365	<i>Atta sexdens</i>	D8b	Jardim de fungo	Corumbataí - SP

Fonte: Autor.

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

Para a reativação dos fungos, os isolados foram retirados do freezer - 80 °C, dispostos em freezer - 20 °C, durante 20 minutos, e mantidos em geladeira até o completo descongelamento. A suspensão de conídios foi transferida para placas de Petri contendo meio BDA (batata dextrose ágar) e incubadas a 25 °C, no escuro, durante sete dias. As culturas foram armazenadas em tubos contendo BDA inclinado (cultura de trabalho) a 7 °C, para a posterior utilização nos bioensaios.

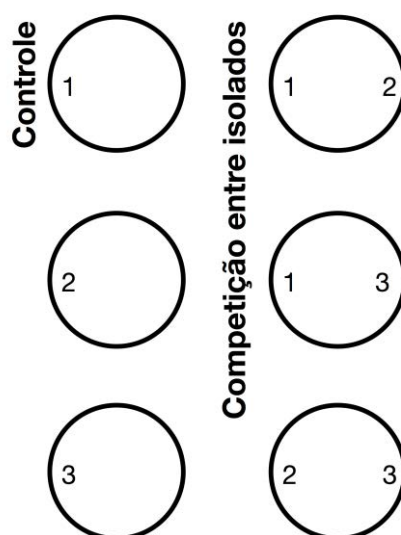
4.2 Bioensaios de co-cultivo entre isolados de *Escovopsis* na ausência do fungo mutualista

Esse experimento foi realizado para avaliar se diferentes isolados de *Escovopsis* competem entre si. Fragmentos de micélio (seis mm de diâmetro) de culturas de *Escovopsis*, previamente incubadas durante sete dias em placas contendo 20 mL de meio BDA, foram transferidos a uma distância de 1,5 cm da borda de

placas de Petri contendo BDA. As placas controles continham somente um dos isolados em cada placa, na mesma posição na qual os fragmentos foram dispostos nos co-cultivos, conforme representado na figura 1. Os isolados foram incubados a 25 °C, durante oito dias, ou até o crescimento do fungo ocupar toda a área da placa.

O crescimento radial dos três isolados de *Escovopsis* foi registrado durante oito dias em *scanner* (HP Deskjet F2050 com 600 dpi de resolução). A área de crescimento micelial (em cm²) foi mensurada no *software* Image J v.1.8.0_112 (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012). Além disso, as placas foram fotodocumentadas diariamente com câmera digital (Sony DSC-H100). Os ensaios de confronto entre os isolados de *Escovopsis* e os controles foram realizados em nove placas para cada combinação.

Figura 1. Esquema dos bioensaios de competição entre isolados de *Escovopsis* na ausência do fungo mutualista, *Leucoagaricus gongylophorus*.



Fonte: Autor. 1. *Escovopsis* sp. LESF 029; 2. *Escovopsis* sp. LESF 365; 3. *Escovopsis* sp. LESF 362.

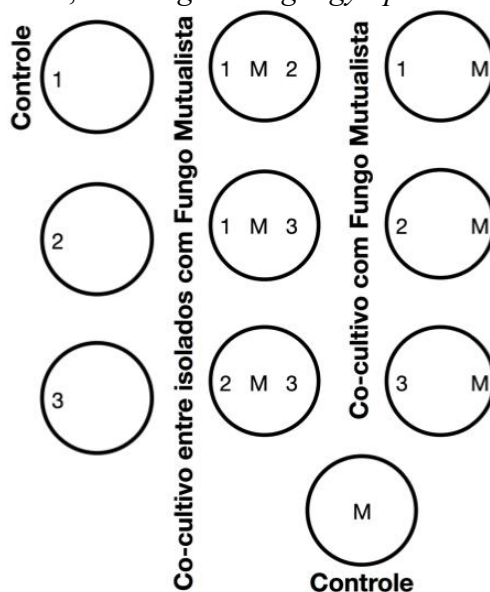
4.3 Bioensaios de competição entre isolados de *Escovopsis* frente ao fungo mutualista

Para responder à pergunta sobre a competição entre diferentes isolados de *Escovopsis* pelo hospedeiro, foram realizados ensaios *in vitro* de co-cultivo (Figura 2). O fungo mutualista cultivado por *A. sexdens* foi previamente cultivado em meio BDA e incubado a 25 °C, durante 18 dias, no escuro.

Fragmentos de micélio (seis mm de diâmetro) do fungo mutualista foram transferidos para o centro de placas de Petri, previamente preparadas contendo 20 mL de meio BDA. Após 14 dias, fragmentos de micélio (seis mm de diâmetro) dos três isolados diferentes de *Escovopsis* (Tabela 1), previamente incubados em meio BDA, foram dispostos a uma distância de 1,5 cm da borda da placa de Petri, separadamente (Figura 2). Esse cultivo foi incubado durante oito dias, a 25 °C. As placas controles foram semeadas apenas com o fungo mutualista, para observar qual o impacto de *Escovopsis* sobre esse fungo.

O crescimento radial dos micro-organismos durante a competição e de *L. gongylophorus* isoladamente, foi registrado em imagens digitalizadas e fotodocumentadas diariamente, durante oito dias, seguindo os métodos descritos no item anterior. Os ensaios de confronto entre os isolados de *Escovopsis* junto com o fungo mutualista, além do controle de *L. gongylophorus* isoladamente, apresentaram nove placas cada.

Figura 2. Esquema dos bioensaios de competição entre isolados de *Escovopsis* na presença do fungo mutualista, *Leucoagaricus gongylophorus*.



Fonte: Autor. 1. *Escovopsis* sp. LESF 029; 2. *Escovopsis* sp. LESF 365; 3. *Escovopsis* sp. LESF 362 e M. *L. gongylophorus* FF2006. A placa demarcada somente com a letra “M” é o controle (*L. gongylophorus*) na ausência de qualquer isolado de *Escovopsis*.

Adicionalmente, foram realizados bioensaios entre os isolados de *Escovopsis* frente ao fungo mutualista para verificar se, na presença do hospedeiro, dois isolados de *Escovopsis* apresentam padrão de crescimento diferenciado em relação às outras condições analisadas. Fragmentos de micélio (seis mm de diâmetro) do fungo

mutualista foram transferidos para placas de Petri contendo 20 mL de meio BDA, a 1,5 cm da borda. Após 14 dias, fragmentos de micélio (seis mm de diâmetro) dos três isolados de *Escovopsis*, previamente incubados em meio BDA, foram dispostos a uma distância de 1,5 cm da borda da placa de Petri. As placas controles continham somente um dos isolados em cada placa, na mesma posição aonde os fragmentos foram dispostos nos co-cultivos, conforme representado na figura 2.

Os isolados foram incubados a 26 °C, durante seis dias. O crescimento radial micelial dos três isolados de *Escovopsis* foi registrado em *scanner* e área de crescimento micelial foi mensurada conforme descrito no item anterior. Os ensaios de co-cultivo entre os isolados de *Escovopsis* e fungo mutualista contiveram oito placas para cada co-cultivo entre os isolados.

4.4 Análise dos dados

As áreas de crescimento micelial nos confrontos e nos controles foram verificadas quanto a normalidade e a homogeneidade de variâncias, no *software* Past v.3.18 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001). Homocedasticidade e normalidade foram analisadas com o teste de Levene, o qual revelou que os dados não apresentaram homogeneidade de variâncias (GOTELLI; ELLISON, 2011). Dessa forma, foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para avaliar as diferenças (DYTHAM, 2011). Para comparações múltiplas entre os grupos, foi utilizado o teste de Student-Newman-Keuls. Tais análises foram realizadas no *software* R v. 3.4.2 (R CORE TEAM, 2017).

5 RESULTADOS

5.1 Co-cultivo entre isolados de *Escovopsis* na ausência do fungo mutualista

Todos os isolados de *Escovopsis*, quando em co-cultivo com outro isolado, apresentaram crescimento micelial significativamente menor, quando comparado ao controle (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$, Tabela 2).

O crescimento dos isolados LESF 029 e LESF 365 foi semelhante quando confrontados entre si e também na presença do isolado LESF 362 (Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$, Tabela 2). Por outro lado, este último apresentou um crescimento significativamente menor na presença do isolado LESF 029, quando comparado com seu crescimento na presença do isolado LESF 365 (Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$, Tabela 2).

Tabela 2. Crescimento micelial (média \pm erro padrão, em cm^2) de isolados do gênero *Escovopsis* em co-cultivo com outro isolado de *Escovopsis* e na ausência deste (controle). A coluna “dia” refere-se quando o controle atingiu o crescimento total da placa de Petri.

Interações ¹	Crescimento (cm^2) ²	Dia
Controle LESF 029	49,732 \pm 1,92 a	3
LESF 029 x LESF 365	27,272 \pm 1,31 b	
LESF 029 x LESF 362	21,029 \pm 1,06 b	
Controle LESF 362	58,055 \pm 1,57 a	3
LESF 362 x LESF 365	46,526 \pm 2,86 b	
LESF 362 x LESF 029	33,588 \pm 1,41 c	
Controle LESF 365	47,729 \pm 2,12 a	8
LESF 365 x LESF 029	17,438 \pm 1,15 b	
LESF 365 x LESF 362	12,555 \pm 1,46 b	

Fonte: Autor.

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

² Letras distintas representam diferenças significativas segundo o teste de Student-Newman-Keuls.

5.2 Co-cultivo entre isolados de *Escovopsis* na presença do fungo mutualista

5.2.1 Efeito no crescimento de *Escovopsis*

Como esperado houve a maximização do crescimento de todos os isolados de *Escovopsis* na presença do hospedeiro, quando comparado com o crescimento na ausência deste (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$). Com exceção do isolado LESF 029, quando na presença do isolado LESF 365, as demais combinações mostraram que o crescimento de um isolado de *Escovopsis*, na presença de outro, não diferiu significativamente, quando comparado ao crescimento somente na presença do fungo mutualista (Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$, Tabela 3). No caso do isolado LESF 029, quando na presença do isolado LESF 365 e do fungo mutualista, o crescimento não diferiu do controle (Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$, Tabela 3).

5.2.2 Efeito no crescimento do fungo mutualista

Como esperado, o crescimento do fungo mutualista na ausência de qualquer isolado de *Escovopsis* foi significativamente maior, quando comparado com aquele na presença do parasita (Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$, Tabela 4). O impacto negativo no crescimento do fungo mutualista ocorreu tanto nas interações em que o hospedeiro estava na presença de um, quanto na presença de dois isolados de *Escovopsis* (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$, Tabela 4). Entretanto, houve exceções à esse padrão: (i) no caso da interação entre os isolados LESF 029 e LESF 365, o crescimento do hospedeiro foi afetado com maior intensidade, quando comparado com seu crescimento apenas na presença de LESF 029 (Student-Newman-Keuls, $P < 0,05$, Tabela 4); (ii) já na interação do isolado LESF 365 com LESF 362, na presença do fungo mutualista, o crescimento do último não foi afetado, e o crescimento foi maior, quando comparado com o do mutualista junto ao isolado LESF 365 (Tabela 4).

Tabela 3. Crescimento micelial (média \pm erro padrão, em cm^2) de isolados do gênero *Escovopsis* na presença do fungo mutualista e na ausência de qualquer outro fungo (controle), no segundo dia de ensaio.

Interações¹	Crescimento (cm^2)²
Controle LESF 029	0,665 \pm 1,92 a
LESF 029 x M	8,349 \pm 1,34 b
LESF 029 x M x LESF 365	3,122 \pm 2,83 a
Controle LESF 029	0,665 \pm 1,92 a
LESF 029 x M	8,349 \pm 1,34 b
LESF 029 x M x LESF 362	4,627 \pm 1,00 b
Controle LESF 362	1,680 \pm 1,57 a
LESF 362 x M	29,734 \pm 0,63b
LESF 362 x M x LESF 029	20,901 \pm 0,85 b
Controle LESF 362	1,680 \pm 1,57a
LESF 362 x M	29,734 \pm 0,63b
LESF 362 x M x LESF 365	24,603 \pm 0,74 b
Controle LESF 365	0,563 \pm 2,12 a
LESF 365 x M	14,113 \pm 1,30 b
LESF 365 x M x LESF 029	9,876 \pm 1,77 b
Controle LESF 365	0,563 \pm 2,12 a
LESF 365 x M	14,113 \pm 1,30 b
LESF 365 x M x LESF 362	16,436 \pm 0,86 b

Fonte: Autor.

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

² Letras distintas representam diferenças significativas segundo o teste de Student-Newman-Keuls.

Foi observado que, no decorrer do tempo, o micélio do fungo mutualista tornou-se quase transparente, quando em contato direto com o micélio dos três isolados de *Escovopsis*. No oitavo dia do bioensaio de competição entre isolados de *Escovopsis* frente ao fungo mutualista, a identificação de qual isolado estava sobre o fungo mutualista foi dificultada, pois os parasitas apresentaram esporulação bem semelhantes. Sendo possível apenas a identificação de qual isolado apresentou o primeiro contato com o hospedeiro.

Tabela 4. Crescimento micelial (média \pm erro padrão, em cm^2) do fungo mutualista, *Leucoagaricus gongylophorus*, na presença e ausência de isolados de *Escovopsis*, no segundo dia de ensaio.

Interações	Crescimento (cm^2)
LESF 029 x M x LESF 365	3,274 \pm 0,10 a
Mutualista x LESF 029	4,163 \pm 0,24 b
Controle Mutualista	5,517 \pm 0,29 c
LESF 029 x M x LESF 362	3,672 \pm 0,15 a
Mutualista x LESF 029	4,163 \pm 0,24 a
Controle Mutualista	5,517 \pm 0,29 b
LESF 362 x M x LESF 029	3,672 \pm 0,15 a
Mutualista x LESF 362	3,719 \pm 0,19 a
Controle Mutualista	5,517 \pm 0,29 b
LESF 362 x M x LESF 365	4,641 \pm 0,27 a
Mutualista x LESF 362	3,719 \pm 0,19 ab
Controle Mutualista	5,517 \pm 0,29 ac
LESF 365 x M x LESF 029	3,274 \pm 0,10 a
Mutualista x LESF 365	3,474 \pm 0,21 a
Controle Mutualista	5,517 \pm 0,29 b
LESF 365 x M x LESF 362	4,640 \pm 0,27 a
Mutualista x LESF 365	3,474 \pm 0,21 b
Controle Mutualista	5,517 \pm 0,29 a

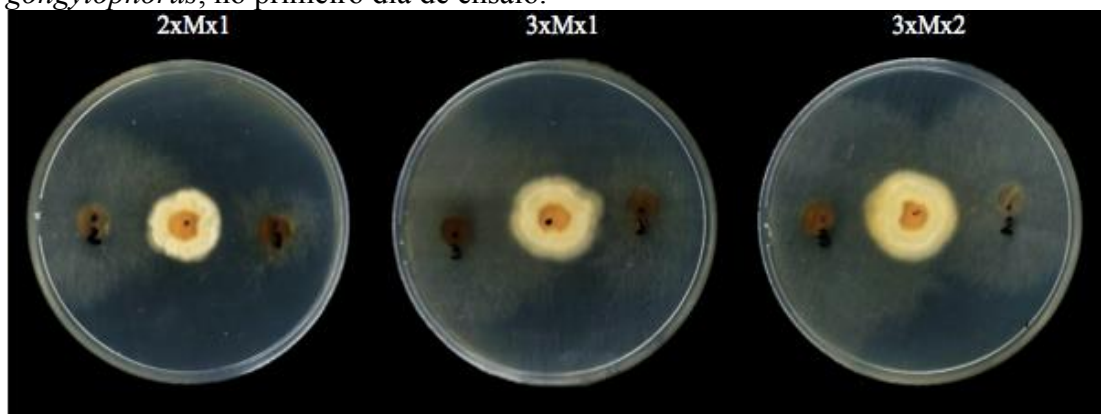
Fonte: Autor.

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

² Letras distintas representam diferenças significativas segundo o teste de Student-Newman-Keuls.

A partir do primeiro dia de ensaio, os três isolados apresentaram contato direto com o fungo mutualista. Porém, esse comportamento foi mais marcante nos isolados LESF 362 e LESF 365, onde o contato foi mais recorrente (Figura 3). O contato com o fungo mutualista ao primeiro dia de ensaio ocorreu em 33,3% das placas para o isolado LESF 029, em 94,4% para o isolado LESF 365 e 100% para o isolado LESF 362.

Figura 3. Contato entre isolados de *Escovopsis* e o fungo mutualista, *Leucoagaricus gongylophorus*, no primeiro dia de ensaio.



Fonte: Autor. 1: *Escovopsis* sp. LESF 029, 2: *Escovopsis* sp. LESF 365, 3: *Escovopsis* sp. LESF 362 e M: *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006).

No início dos bioensaios, foi possível observar os limites do crescimento micelial de cada isolado de *Escovopsis* (Figura 4). Porém, com o passar do tempo, as imagens registradas dos co-cultivos se mostram confusas, sendo difícil diferenciar os limites miceliais dos isolados, quando os mesmos cresceram uns sobre os outros (Figura 4).

Figura 4. Bioensaios de interação entre fungos do gênero *Escovopsis* na ausência e presença do fungo mutualista.



Fonte: Autor. Colunas dos experimentos controles foto registradas no dia anterior a ocupação total da placa. Colunas de confronto foto registradas no dia anterior a ocupação total da placa. Confronto A: Bioensaios de co-cultivo entre isolados de *Escovopsis* na ausência do fungo mutualista. Confronto B: Bioensaios de competição entre isolados de *Escovopsis* frente ao fungo mutualista. Confronto C: Bioensaios de co-cultivo entre isolados de *Escovopsis* e o fungo mutualista.

6 DISCUSSÃO

Os co-cultivos entre os isolados de *Escovopsis*, na ausência do fungo mutualista, indicaram que nenhum isolado teve seu crescimento beneficiado na presença do outro. Pelo contrário, houve inibição do crescimento dos isolados de *Escovopsis*, quando comparado ao controle (*Escovopsis* crescendo separadamente). Quando na presença do fungo mutualista, o crescimento de dois isolados de *Escovopsis* foi maximizado na interação. Com isso, pode-se pressupor que os isolados foram beneficiados pela presença do fungo mutualista, mesmo havendo a presença de outro isolado de *Escovopsis* no meio de cultivo. Entretanto, quando o fungo mutualista foi cultivado na presença de dois isolados de *Escovopsis* simultaneamente, seu crescimento foi semelhante a aquele quando na presença de apenas um isolado do parasita. Com esses resultados é possível, inferir competição entre isolados de *Escovopsis*.

Em relação ao fungo mutualista, os resultados foram condizentes ao esperado. O crescimento micelial de *L. gongylophorus* na presença de *Escovopsis* foi inibido, demonstrando que todos os isolados do parasita apresentaram infectividade para a colonização do hospedeiro. Mesmo não realizando ensaios químicos, sabemos que essa infectividade é mediada pela produção de metabólitos secundários por *Escovopsis* (DHODARY et al., 2018; HEINE et al., 2018). Segundo Heine et al. (2018), há duas principais classes de metabólitos que atuam na infecção de *L. gongylophorus*. A primeira é a dos alcalóides de terpeno-indol, que atuam tanto no fungo mutualista, como nas formigas. Já, a segunda classe atua somente na bactéria (*Pseudonocardia*) responsável pela defesa do fungo mutualista, a qual é afetada pelo composto *epipolythio diketopiperazine* (ETP). Com isso, observa-se que o fungo parasita apresenta diversos mecanismos para sobrepujar as barreiras defensivas do hospedeiro para a obtenção de recursos.

Um resultado importante foi a semelhança do crescimento do fungo mutualista quando cultivado com um ou dois isolados de *Escovopsis*. Pode-se pressupor que houve competição entre os isolados de *Escovopsis*, pois era esperado que o fungo mutualista fosse mais afetado na presença de dois isolados do parasita. A competição entre os isolados permitiu com que o fungo mutualista crescesse igualmente na presença de apenas um isolado. Nesse caso, é possível que os isolados direcionaram mais seus “esforços” para competir entre si do que em obter recursos diretamente de *L. gongylophorus*.

Dois casos curiosos foram observados nos experimentos. No primeiro, o isolado LESF 029 apresentou um crescimento menor na interação com o hospedeiro e com isolado LESF 365, em relação ao seu crescimento somente na presença do fungo mutualista. Pode-se pressupor que o recurso, fungo mutualista, fora mais utilizado pelo isolado LESF 365. Ou ainda, a presença de LESF 365, possa ter afetado negativamente o isolado LESF 029. Entretanto, esse mesmo resultado não foi observado quando os dois isolados foram confrontados sem a presença do fungo mutualista (Tabela 3). Logo, esse pode ser um caso de competição interespecífica, onde o recurso é insuficiente para atender a demanda dos dois micro-organismos. No segundo caso, o crescimento do hospedeiro não foi afetado na interação com os isolados LESF 365 e LESF 362, cultivados na mesma placa. Curiosamente, o crescimento do fungo mutualista foi maior, quando comparado com o hospedeiro somente na presença do isolado LESF 365. Se houve competição, podemos dizer que foi entre os isolados de *Escovopsis*, sem afetar o crescimento do fungo mutualista. Assim, os isolados de *Escovopsis* LESF 365 e LESF 362 apresentaram características de competidores por interferência.

Observamos que o micélio do fungo mutualista se tornou esbranquiçado (ou quase transparente), quando em contato direto com o micélio de *Escovopsis*. Tal observação foi recorrente nos experimentos de co-cultivo realizados por Elizondo-Wallace, Asensio e Pinto-Tomás (2014). Segundo os autores, conforme o parasita cresce sobre o fungo mutualista, o micélio do hospedeiro adquiriu um aspecto “murcho” e “seco”. Os pesquisadores interpretaram essas alterações morfológicas como sendo resultado da ação do parasita; o que possivelmente deve ser o mesmo que ocorreu em nossos experimentos.

Os três isolados de *Escovopsis* apresentaram crescimento micelial significativamente maior nas réplicas de co-cultivo com o fungo mutualista, inclusive em seus controles. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Folgarait et al. (2011), quando confrontaram *E. weberi* frente a *L. gongylophorus*. Tal maximização ocorreu mesmo sem o contato físico entre as hifas dos dois fungos, tanto nos nossos experimentos, quando naqueles realizados por Folgarait et al. (2011). Esses autores relataram que o estímulo do crescimento de *Escovopsis* ocorreu devido à liberação de metabólitos solúveis no meio de cultivo por parte do hospedeiro. Embora é sabido que o fungo mutualista produza compostos solúveis com ação em *Escovopsis*, nenhum estudo identificou esses metabólitos.

Nos bioensaios entre os isolados de *Escovopsis* e o fungo mutualista, evidenciou-se que possa existir competição de recursos entre diferentes isolados do parasita. Portanto, em seu ambiente natural, é provável que haja a inibição do fungo mutualista por mais de um isolado de *Escovopsis*. No estudo de Taerum, Cafaro e Currie (2010), os autores apenas avaliaram as interações entre diferentes isolados de *Escovopsis* e não realizaram experimentos junto ao fungo mutualista. Portanto, não evidenciaram competição entre isolados de *Escovopsis*. Como apresentado pelos autores, foi observado que os isolados cresciam até a ocupação total da placa de Petri. Ao contrário ao estudo de Taerum, Cafaro e Currie (2010), quando os isolados avaliados no presente estudo ocuparam toda a área da placa de Petri, havia sobreposição de um isolado sobre o outro, dificultando a visualização de qual deles se encontrava em vantagem. Futuros trabalhos que desejem avaliar a competição entre isolados de *Escovopsis* devem levar em consideração a problemática de sobreposição dos micélios fúngicos e que dificultam a análise dessas interações.

7 CONSIDERAÇÕES

Os resultados sugerem que diferentes isolados de *Escovopsis* podem competir por recursos. Estudos futuros são necessários para avaliar os mecanismos dessas interações, bem como propor novos métodos *in vitro* que facilitem a visualização dessas interações.

REFERÊNCIAS

- AUGUSTIN, J. O.; GROENEWALD, J. Z.; NASCIMENTO, R. J.; MIZUBUTI, E. S. G.; BARRETO R.W.; ELLIOT, S. L.; EVANS, H. C. Yet more “weeds” in the garden: fungal novelties from nests of leaf-cutting ants. **PLoS One**, São Francisco, v. 8, n. 12, p. e82265, 2013.
- AUGUSTIN, J. O.; SIMÕES, T. G.; DIJKSTERHUIS, J.; ELLIOT, S. L.; EVANS, H. C. Putting the waste out: a proposed mechanism for transmission of the mycoparasite *Escovopsis* between leafcutter ant colonies. **Royal Society Open Science**, Londres, v. 4, n. 5, p.1-16, 2017.
- COONEY, J. M.; LAUREN, D. R.; MENNA, M. E. Impact of Competitive Fungi on Trichothecene Production by *Fusarium graminearum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, n. 1, p.522-526, 2001.
- 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.; STUART, A. E. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, Londres, v. 268, n. 1471, p.1033-1039, 2001.
- CURRIE, C. R. Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. **Oecologia**, Berlim, v. 128, n. 1, p.99-106, 2001.
- CUSTODIO, B. C.; RODRIGUES, A. *Escovopsis kreiselii* specialization to its native hosts in the fungiculture of the lower attine ant *Mycetophylax morschi*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdã, 2018. DOI: 10.1007/s10482-018-1158-x
- DE FINE LICHT, H.; BOOMSMA, J. J.; TUNLID, A. Symbiotic adaptations in the fungal cultivar of leaf-cutting ants. **Nature Communications**, Londres, v. 5, n. 5675, 2014.
- DHODARY, B. et al. Secondary Metabolites from *Escovopsis weberi* and Their Role in Attacking the Garden Fungus of Leaf-Cutting Ants. **Chemistry - A European Journal**, Liverpool, v. 24, n. 17, p.4445-4452, 2018.
- DYTHAM, C. Choosing a test: a key. In: DYTHAM, C. **Choosing and using statistics: a biologist's guide**. Oxford: Wiley-Blackwell, 2011. p. 7-22.
- ELIZONDO - WALLACE, D. E.; ASENSIO, J. G. V.; PINTO-TOMÁS, A. A. Correlation between virulence and genetic structure of *Escovopsis* strains from leaf-cutting ant colonies in Costa Rica. **Microbiology**, Nova Iorque, v. 160, n. 8, p.1727-1736, 2014.
- 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. **Environmental Entomology**, Oxford, v. 40, n. 2, p.342-349, 2011.

GOTELLI, N. J.; ELLISON, A. M. Três estruturas para análises estatísticas: análises paramétricas. In: GOTELLI, N. J.; ELLISON, A. M. **Princípios de Estatística em Ecologia**. Porto Alegre: Artmed, 2011. p. 135-139.

GROVER, J. P. Experimental studies of resource competition. In: _____. **Resource Competition**. Boston: Springer, 1997. p. 48-88.

HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T., RYAN, P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**. 2001.

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

JEŠOVNIK, A.; GONZÁLEZ, V. L.; SCHULTZ, T. R. Phylogenomics and divergence dating of fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae) of the genera *Sericomyrmex* and *Apterostigma*. **PloS One**, São Francisco, v. 11, n. 7, p. e0151059, 2016.

KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal secondary metabolism — from biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v. 3, n. 12, p. 937-947, 2005.

KELLNER, K.; KARDISH, M. R.; SEAL, J. N.; LINKSVAYER, T. A.; MUELLER, U. G. Symbiont-mediated host-parasite dynamics in a fungus-gardening ant. **Microbial Ecology**, Washington, v. 76, n. 2, p. 530–543, 2017.

LEUNG, T. L. F.; POULIN, R. Parasitism, commensalism, and mutualism: exploring the many shades of symbioses. **Vie Et Milieu: Life and Environment**, Paris, v. 2, n. 58, p.107-115, 2008.

LOSADA, L.; AJAYI, O.; FRISVAD, J. C.; YU, J.; NIERMAN, W. C. Effect of competition on the production and activity of secondary metabolites in *Aspergillus* species. **Medical Mycology**, Oxford, v. 47, n. 1, p.S88-S96, 2009.

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

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

MEIRELLES, L. A.; MONTTOYA, Q. V.; SOLOMON, S. E.; RODRIGUES, A. New light on the systematics of fungi associated with attine ant gardens and the description of *Escovopsis kreiselii* sp. nov. **PLoS One**, São Francisco, v. 10, n. 1, e0112067, 2015.

- MUCHOVEJ, J. J.; DELLA LUCIA, T. M. C. *Escovopsis*, a new genus from leaf cutting ant nests to replace *Phialocladus* nomen invalidum. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 37, n. 1, p. 191-195, 1990.
- MUELLER, U. G.; ISHAK, H. D.; BRUSCHI, S. M.; SMITH, C. C.; HERMAN, J. J.; SOLOMON, S. E.; MIKHEYEV, A. S.; RABELING, C.; SCOTT, J. J.; COOPER, M.; RODRIGUES, A.; ORTIZ, A.; BRANDÃO, C. R. F.; LATTKE, J. E.; PAGNOCCA, F. C.; REHNER, S. A.; SCHULTZ, T. R.; VASCONCELOS, H. L.; ADAMS, R. M. M.; BOLLAZZI, M.; CLARK, R. M.; HIMLER, A. G.; LAPOLLA, J. S.; LEAL, I. R.; JOHNSON, R. A.; ROCES, F.; SOSA-CALVO, J.; WIRTH, R.; BACCI, M. JR. Biogeography of mutualistic fungi cultivated by leafcutter ants. **Molecular Ecology**, Hoboken, v. 26, n. 24, p.6921-6937, 2017.
- MUELLER, U. G. The Evolution of Agriculture in Ants. **Science**, Nova Iorque, v. 281, n. 5385, p.2034-2038, 25 set. 1998.
- O'BRIEN, J.; WRIGHT, G. D. An ecological perspective of microbial secondary metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, Nova Iorque, v. 22, n. 4, p.552-558, ago. 2011.
- R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. 2017. <https://www.R-project.org/>
- 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.; MUELLER, U. G.; ISHAK, H. D.; BACCI, M. J.; PAGNOCCA, F. C. Ecology of microfungus 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**, Hoboken, v. 78, n. 2, p. 244-255, 2011.
- RODRIGUES, A.; PASSARINI, M. R.; FERRO, M.; NAGAMOTO, N. S.; FORTI, L. C.; BACCI, M. J.; SETTE, L. D.; PAGNOCCA, F. C. Fungal communities in the garden chamber soils of leaf cutting ants. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 54, n. 11, p. 1186-1196, 2014.
- RUSSELL, J. A.; SANDERS, J. G.; MOREAU, C. S. Hotspots for symbiosis: Function, evolution, and specificity of ant-microbe associations from trunk to tips of the ant phylogeny (Hymenoptera: Formicidae). **Myrmecological News**, Viena, v. 24, [s.n.], p. 43-69, 2017.
- SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, Nova Iorque, v. 7, n. 9, p.671-675, 2012.
- SCHROECKH, V.; SCHERLACH, K.; NÜTZMANN, H. W.; SHELEST, E.; SCHMIDT-HECK, W.; SCHUEMANN, J.; MARTIN, K.; HERTWECK, C.; BRAKHAGE, A. A. Intimate bacterial-fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 106, n. 34, p.14558-14563, 2009.

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

SCOTT, J. J.; BUDSBERG, K. J.; SUEN, G.; WIXON, D. L.; BALSER, T. C.; CURRIE, C. R. Microbial community structure of leaf-cutter ant fungus gardens and refuse dumps. **PLoS One**, Nova Iorque, v. 5, n. 3, p. e9922, 2010.

SEIFERT, K. A.; SAMSON, R. A.; CHAPELA, I. H. *Escovopsis aspergilloides*, a rediscovered hyphomycete from leaf-cutting ant nests. **Mycologia**, Nova Iorque, v. 87, n. 3, p. 407-413, 1995.

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

TAERUM, S. J.; CAFARO, M. J.; CURRIE, C. R. Presence of multiparasite infections within individual colonies of leaf-cutter ants. **Environmental Entomology**, College Park, v. 39, n. 1, p.105-113, 2010.

VARANDA-HAIFIG, S. S.; ALBARICI, T. R.; NUNES, P. H.; HAIFIG, I.; VIERA, P. V.; RODRIGUES, A. Nature of the interactions between hypocrealean fungi and the mutualistic fungus of leaf-cutter ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdã, v. 110, n. 4, p.593-605, 2017.

WICKLOW, D. T. Interference Competition. In: CARROLL, G. C.; WICKLOW, D. T. **The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem**. 2. ed. Nova Iorque: Marcel Dekker, 2005. p. 265-274.

Rio Claro, 14 de dezembro de 2018.

Prof. Dr. André Rodrigues

- Orientador -

Alvaro dos Santos Neto

- Discente -