

**OCORRÊNCIA DE FUNGOS FILAMENTOSOS EM
NINHOS DE *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (HYMENOPTERA:
FORMICIDAE) SUBMETIDOS A TRATAMENTOS COM ISCAS
TÓXICAS**

ANDRÉ RODRIGUES

Orientador: Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista
“Julio de Mesquita Filho”, Campus de Rio
Claro, para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas (Área de Concentração:
Microbiologia Aplicada).**

**Rio Claro
Estado de São Paulo, Brasil
Agosto de 2004**

*Dedico esse trabalho à minha esposa e a todos os meus amigos que ajudaram
na conclusão desse sonho.*

*- "... e conhecereis a verdade e a verdade vos libertará".
Jo. 8:32*

*- "Ó! Quem tiver olhos para ver - um coração para sentir- uma língua para abençoar,
não deixará de se deleitar com a mágica graciosidade da Natureza!"
- Mary Roberts*

AGRADECIMENTOS

Durante todo o período do mestrado, tive o privilégio de aprender muito. Um dos pontos marcantes desse aprendizado foi perceber que o trabalho acadêmico não é construído por uma única mão. Pois bem, gostaria de deixar registrado os meus sinceros agradecimentos aos “alicerces” que constituíram a construção dessa pesquisa:

À Deus.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca, pela oportunidade concedida, confiança e incentivo durante todo o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Ludwig H. Pfenning, da Universidade Federal de Lavras, que me conduziu nos estudos taxonômicos, com os quais não era familiarizado.

Ao Ricardo, Anderson, Mirian e Edinho, pelo auxílio e preocupação que manifestaram durante as minhas visitas no Laboratório de Micologia da UFLA, Lavras, MG.

Ao Prof. Dr. Odair C. Bueno pela ajuda durante as coletas do material e pelas sugestões no decorrer desse projeto.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa Científica – CNPq – pela bolsa de Mestrado concedida e à Fapesp pelo suporte e infra-estrutura que nos foram concedidos anteriormente e que permitiram a execução de parte deste projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Área de Microbiologia Aplicada), na pessoa de seu coordenador Prof. Dr. Jonas Contiero.

Aos meus pais, pelo incentivo e apoio durante todo o mestrado.

À minha esposa, Juliana, pela paciência e ajuda desde minha vinda para Rio Claro.

Aos meus queridos colegas e amigos de São Carlos (Alessandro) e aqueles que conheci aqui em Rio Claro: Marcelo Silva, Fernanda, Daniel, Andréia, Eduardo, Cézár, Geraldinho e Cíntia.

Ao pessoal do C.E.I.S.: Etienne, Carla Carolina, Solange, Marizete, Sofia, Carla, Elissena, Cíntia, Alessandra, Roberta e Ita pelo companheirismo. Gostaria de agradecer especialmente a Aline Silva pelo interesse demonstrado por esse projeto.

À Necis e Olívia que prestaram socorro em vários momentos de urgência.

À Dra. Derlene Silva Attili por deixar a disposição seu acervo pessoal de bibliografias sobre micologia e demais orientações.

Aos funcionários da Biblioteca da Unesp – Rio Claro, pela paciência e disposição que demonstraram durante a elaboração das referências bibliográficas.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1. Simbiose entre as formigas da tribo Attini e seus cultivares.....	5
2.1.1. Aspectos gerais dessa relação.....	5
2.1.2. Sobre as formigas cultivadoras de fungos.....	7
2.1.3. Fungos cultivados pelas formigas da tribo Attini.....	10
2.2. Diversidade microbiana associada à simbiose.....	14
2.2.1. Um terceiro simbionte.....	14
2.2.2. Presença de um parasita.....	16
2.2.3. Outros microrganismos associados aos ninhos.....	19
2.3. Defesas naturais das formigas contra microrganismos estranhos.....	22
2.4. Controle de formigas cortadeiras.....	26
2.4.1. Controle através de iscas tóxicas.....	27
2.4.2. Controle através de fungos entomopatogênicos.....	28
3. OBJETIVOS.....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1. Coleta do material para os tratamentos com iscas tóxicas.....	32
4.2. Tratamentos com iscas tóxicas visando o desequilíbrio dos ninhos.....	33
4.2.1. Ninhos de laboratório.....	33
4.2.2. Ninhos de campo.....	34
4.3. Experimentos com esponja fúngica sem a presença das operárias.....	34
4.4. Isolamento dos fungos.....	35
4.5. Identificação dos fungos.....	35

4.6. Preservação dos isolados	36
4.7. Contaminação dos ninhos por esporos de fungos filamentosos	36
5. RESULTADOS	38
5.1. Tratamentos com iscas tóxicas visando o desequilíbrio dos ninhos de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	38
5.1.1. Ninhos de laboratório tratados com Mirex-S [®]	38
5.1.2. Ninhos de laboratório tratados com iscas a base de Hidrametilnona	46
5.1.3. Ninhos de campo tratados com Mirex-S [®]	50
5.2. Fragmentos de esponja fúngica mantidos sem a presença das operárias.....	52
5.3. Contaminação dos ninhos por esporos de fungos filamentosos	55
6. DISCUSSÃO	58
7. CONCLUSÕES	65
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

RESUMO

Além do fungo simbiote que as formigas cortadeiras cultivam para alimentação, outros microrganismos podem ser encontrados em seus ninhos. Apesar das informações disponíveis recentemente na literatura, ainda pouco se sabe sobre esta microbiota, suas inter-relações e em quais circunstâncias podem interferir na simbiose. Este trabalho teve a intenção de fazer um levantamento das principais espécies de fungos filamentosos que podem ocorrer nos ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* (saúva). Para facilitar o crescimento desses fungos, os ninhos foram submetidos a tratamento com iscas tóxicas, induzindo um desequilíbrio na simbiose. Setenta e seis ninhos de laboratório foram utilizados nos ensaios, dos quais, 40 ninhos tratados com sulfluramida (Mirex-S[®]) e 36 com hidrametilnona, respectivamente; enquanto que 13 ninhos foram tratados *in situ* com Mirex-S[®]. Conforme esperado, vários fungos filamentosos se desenvolveram poucos dias após aos tratamentos. Mais de 65% dos isolados provenientes dessas colônias se encontravam na esponja fúngica, mesmo local onde as formigas cultivam seu parceiro. Nos ninhos de laboratório, os mais frequentes foram *Syncephalastrum racemosum* (54% e 79%) e *Escovopsis weberi* (21% e 15%) quando tratados com Mirex-S[®] e hidrametilnona, respectivamente. *Trichoderma* cf. *harzianum* foi o fungo mais encontrado (38%) nos ninhos de campo. Os fungos em comum entre os tratamentos de campo e laboratório foram: *Acremonium kiliense*, *Aspergillus niger* var. *niger*, *E. weberi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Moniliella suaveolens*, *Trichoderma* sp. e *Trichoderma* cf. *harzianum*. Numa abordagem diferente, fragmentos de esponja fúngica foram removidos de outros 12 ninhos recém-coletados no campo e mantidos sem as operárias, havendo também o desenvolvimento de fungos contaminantes, dentre eles *M. suaveolens* (50%), *Trichoderma* sp. (50%), *A. kiliense* (42%) e *E. weberi* (42%). *S. racemosum* foi isolado somente nos ninhos de laboratório, não sendo encontrado no substrato oferecido às colônias como alimento. Os resultados mostraram que a micota presente nesses ninhos é composta por fungos oportunistas que podem tornar-se uma ameaça, principalmente quando as colônias passam por uma situação desequilíbrio. Algumas linhagens isoladas com maior frequência deveriam ser analisadas quanto ao potencial de agentes complementares no controle desses insetos.

Palavras-chave: formigas cortadeiras, fungos filamentosos, contaminação, estresse, simbiose.

ABSTRACT

Besides the fungus that leaf-cutting ants cultivate for food, a pool of microorganisms can be found inside the nests of these insects. There are evidences that these microorganisms are under the control of the ants, which have several mechanisms to avoid their development. However, when the nests are seriously disturbed this balance is broken and the alien microorganisms can surpass the symbiotic fungus. In this research, we carried out a screening of the filamentous fungi (rather on the symbiotic type) found in association with *Atta sexdens rubropilosa* colonies. Toxic baits were used to kill most of the workers and thus make the development of the fungi easy. Seventy-six laboratory nests were used in all of the assays, from which forty were treated with sulfluramid (Mirex-S[®]) and thirty-six with hydramethylnon, respectively. Additionally, another thirteen nests were treated with Mirex-S[®] in the field. Many different fungi species were isolated from the nests a few days after the beginning of the assays, as expected. More than 65% of the isolates were found in the fungus garden of the laboratory nests. *Syncephalastrum racemosum* (54% and 79%) and *Escovopsis weberi* (21% and 15%) were the prevalent species in the laboratory nests treated with Mirex-S[®] and the hydramethylnon baits, respectively, whereas *Trichoderma* cf. *harzianum* (38%) was the predominant species in the field nests. The species *Acremonium kiliense*, *Aspergillus niger* var. *niger*, *E. weberi*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Moniliella suaveolens*, *Trichoderma* sp. and *Trichoderma* cf. *harzianum* were found in both kinds of nests. In another approach, small pieces of the fungus garden were taken from twelve young colonies and the ants were removed. In this experiment we isolated mostly, *M. suaveolens* (50%), *Trichoderma* sp. (50%), *A. kiliense* (42%) and *E. weberi* (42%). *S. racemosum* was found only in laboratory nests and efforts to isolate it from the material used for nests foraging were unsuccessful. The results show that many of the microorganisms occurring in the nests of these insects are, in fact, opportunistic fungi, which can be a serious threat, especially after an initial unbalance. Some of these strains should be better studied in order to evaluate their potential as a complementary agent for the control of these insects.

Key-words: leaf-cutting ants, filamentous fungi, contamination, stress, symbiosis.

1. INTRODUÇÃO

As relações existentes na natureza entre insetos e fungos despertam o interesse do homem por serem consideradas raras e fascinantes. Cupins, formigas e besouros são as três únicas linhagens de insetos onde o hábito de cultivar fungos e alimentar-se deles está presente. Dentre elas, destaca-se a simbiose que ocorre entre algumas espécies de fungos e as formigas cortadeiras, conhecidas popularmente como saúvas e quenquéns (MUELLER; GERARDO, 2002).

Essa associação existe há mais de 50 milhões de anos e desde a sua descoberta soube-se que a interdependência entre os dois organismos era muito forte, sem que um possa sobreviver sem o outro. De um lado, as formigas mantêm o crescimento do fungo e livra-o de possíveis competidores; por outro, o fungo provê o alimento necessário para as larvas e operárias.

Devido ao hábito de cortar folhas frescas e oferecê-las como substrato para o desenvolvimento de seu fungo, essas formigas, causam sérios prejuízos em áreas de cultivo agrícola e de reflorestamento (HERNÁNDEZ; JAFFÉ, 1995; ZANETTI et al. 2003a).

Recentemente, um terceiro parceiro nessa inter-relação foi descoberto por Currie e colaboradores (1999a), os quais observaram que bactérias do grupo dos actinomicetos são capazes de viver sobre o corpo das formigas. Segundo esses autores, tais microrganismos produzem antibióticos que atuam de maneira específica na inibição do crescimento de *Escovopsis* sp. (Ascomicota: Hypocreales), um fungo parasita presente nesse ambiente.

Anteriormente a tais descobertas, pouca atenção era dada ao estudo da microbiota agregada dessa associação, passando quase que despercebida, mas hoje, questões sobre o real papel dessa comunidade microbiana e de sua participação na simbiose estão aflorando. Assim, além do fungo simbiote, do fungo parasita e do actinomiceto, outros autores enfatizam a incidência de bactérias, leveduras e fungos filamentosos nos formigueiros.

Apesar dos últimos avanços, faltam pesquisas direcionadas para a caracterização das espécies presentes e que sinalizem para o potencial patogênico das mesmas para o formigueiro. Tais estudos podem trazer informações adicionais a respeito dos inimigos naturais dessas pragas, o que poderia ser utilizado para o desenvolvimento de técnicas alternativas de controle, com inegáveis benefícios para a economia dos agricultores, das empresas de reflorestamento e para o meio ambiente.

O presente trabalho traz o resultado de uma série de levantamentos realizados visando a identificação dos fungos filamentosos presentes em ninhos artificiais e naturais de *Atta sexdens rubropilosa*. Esta investigação foi conduzida em um momento crítico na simbiose entre a formiga e o fungo simbiote, ou seja, quando esta foi desestruturada propositalmente pelo uso de inseticidas (estresse).

A partir do desequilíbrio instalado nesse sistema, foi possível estudar os fungos filamentosos aí presentes e também discutir um pouco sobre a razão da sua presença, observando como eles se relacionam com os mecanismos e comportamentos de higiene exercidos pelas operárias dessa cortadeira.

Os experimentos aqui relatados, portanto, visaram contribuir no conhecimento de uma parte da microbiota existente na simbiose. Questões interessantes como aquelas que abordem como se dão as relações entre esses microrganismos dentro das colônias e os efeitos dessas interações para a simbiose, constituem matéria para pesquisas futuras e instigantes.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Simbiose entre as formigas da tribo Attini e seus cultivares

2.1.1. Aspectos gerais dessa relação

A origem da associação entre as formigas e seu fungo simbiote é estimada aproximadamente entre 45-65 milhões de anos e existem várias hipóteses que tentam remontar o início dessa simbiose (MUELLER et al. 2001). Uma delas, dentre as atualmente aceitas, destaca-se por considerar um grupo primitivo de formigas muito aparentado às formigas cultivadoras de fungos; o gênero *Blepharidatta*.

As espécies desse gênero coletam e trazem para o interior dos ninhos, carcaças de artrópodes para alimentar suas crias. As sobras dessas carcaças são primeiramente armazenadas no interior de câmaras e depois depositadas externamente ao redor da abertura do ninho. Foi observado que fungos podem ser encontrados nesses materiais. Os comportamentos de coletar e trazer para os ninhos restos de artrópodes também são encontrados em algumas formigas cultivadoras de fungos primitivas. Alguns autores supõem que a passagem de um estilo de vida predador para outro baseado no uso de fungos como alimento seria um passo evolutivo crucial que resultou no início da simbiose entre formigas e fungos (DINIZ et al. 1998; MUELLER et al. 2001).

A despeito das hipóteses sobre as origens da associação, existem dois modelos gerais que também tentam explicar como se deu essa origem. Em um, chamado de “*consumption first*” traz a visão tradicionalmente aceita pela maioria dos pesquisadores

de que o cultivo dos fungos teve início por necessidade das formigas, sendo o fungo parte da dieta. A maioria das hipóteses, incluindo a mencionada anteriormente, encaixa-se dentro dessa perspectiva.

O outro modelo, denominado “*transmission first*”, propõe que a fungicultura teve início não por necessidade das formigas, mas sim por uma necessidade reprodutiva do fungo, onde este “utiliza” as formigas como agentes dispersores, já que o próprio fungo não teria condições de fazê-lo (MUELLER et al. 2001).

De modo geral, o primeiro adota uma perspectiva “mirmicocêntrica” enquanto que a outra leva em consideração uma visão “micocêntrica” (ver item 2.1.3). Contudo, independentemente de como essa simbiose se originou, fica claro que nos milhares de anos de sua existência, ambos (formiga e fungo) tornaram-se adaptados ao convívio mútuo.

Um dos aspectos envolvidos nesse convívio é a dependência nutricional entre os parceiros, pois as formigas continuamente fornecem suprimento para o desenvolvimento do fungo e este produz na extremidade de suas hifas uma estrutura denominada gongilídeo, semelhante a uma bolsa contendo nutrientes, cujo conjunto é chamado *staphyla* e é oferecido às larvas como única fonte de alimento (WEBER, 1972a).

Para as operárias das formigas cortadeiras, foi proposto que a utilização do fungo como fonte nutricional, corresponde a uma faixa de 4 a 9% da demanda energética requerida, sendo o restante proveniente de sucos vegetais das folhas cortadas pelas operárias (LITTLEDYKE; CHERRETT, 1976; QUILAN; CHERRETT, 1979; BASS; CHERRETT, 1995). No entanto, segundo Bass (1997) as operárias exibem uma flexibilidade na dieta, podendo consumir mais *staphyla* quando o suprimento de folhas é escasso. Nesta situação, as formigas “podam” o fungo simbiote de maneira a estimular uma maior produção de *staphyla*. Em condições naturais, essa capacidade de adaptação nutricional em situações de stress é vantajosa, principalmente quando o suprimento de folhas no ambiente é limitado.

Porém, Silva et al. (2003) demonstraram que para as operárias de *A. sexdens*, os produtos de hidrólise originados da degradação dos polímeros vegetais pelo fungo simbiote, desempenham um papel mais importante na nutrição do que os sucos vegetais, perfazendo cerca de 50% da demanda energética.

Outro aspecto envolve a cooperação fisiológica entre os organismos. As formigas e o fungo evoluíram conjuntamente em um sistema enzimático integrado, de maneira que enzimas secretadas pelo fungo, destinadas a digerir o substrato no qual cresce, são ingeridas pelas formigas (uma das maneiras é através da ingestão do fungo) e concentradas no fluido fecal das operárias (BOYD; MARTIN, 1975). Foi demonstrado que neste fluido fecal podem existir polissacaridases (xilanasas, pectinases, entre outras) produzidas pelas próprias formigas e também produzidas pelo fungo simbiote (SILVA, 2000).

Tais enzimas seriam distribuídas por todo o ninho via fluido fecal acelerando a digestão do substrato e com isso permitindo uma colonização mais rápida deste pelo fungo (MARTIN et al. 1975).

Existe também uma cooperação de higiene no interior dos ninhos. As formigas são responsáveis por manter o ambiente no interior da colônia livre do crescimento de microrganismos invasores (p. ex. bactérias e fungos) e promover o desenvolvimento do fungo simbiote. Isso é alcançado através de diversos mecanismos exercidos pelas operárias e é possível que o próprio fungo simbiote também desempenhe esse papel.

Por fim, ocorre uma cooperação reprodutiva entre organismos. É sabido que as rainhas virgens levam no interior da cavidade infrabucal um pequeno fragmento de fungo da colônia parental quando saem para o vôo nupcial (AUTUORI, 1941). Com esse fragmento, a rainha é capaz de iniciar o desenvolvimento de uma nova colônia. Assim, a reprodução de ambos os organismos é acoplada.

2.1.2. Sobre as formigas cultivadoras de fungos

A tribo Attini (Hymenoptera: Formicidae: subfamília: Myrmicinae) é composta por 13 gêneros compreendendo 202 espécies e 85 variedades (KEMPF, 1972 apud SCHULTZ; MEIER, 1995; BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES, 2001). Esse grupo é localizado estritamente no Novo Mundo e sua distribuição se estende desde 40° de latitude norte até 44° de latitude sul, compreendendo as zonas subtropicais e tropicais (WEBER, 1966). As formigas pertencentes a esse grupo apresentam um hábito comum, que é a capacidade de cultivar e alimentar-se de fungos. Como verdadeiras agricultoras essas formigas cuidam de seu parceiro e por isso são chamadas de formigas jardineiras,

formigas cultivadoras de fungos ou formigas cortadeiras, dependendo de qual aspecto de sua atividade é enfatizado (WEBER, 1982).

Considera-se que a tribo em questão é monofilética (SCHULTZ; MEIER, 1995; WETTERER et al., 1998) e muitas hipóteses sobre a sua história evolutiva foram postuladas, sendo que a maioria delas foram agrupadas e discutidas por Schultz e Meier (1995). Apenas duas serão apresentadas a seguir.

Baseando-se em dados morfológicos, Weber (1972a) dividiu a tribo Attini em dois grandes grupos. O primeiro, representado pelas formigas dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* (que forrageiam folhas frescas e flores), é considerado como o mais derivado dentro dessa tribo, cujas operárias apresentam castas com alto grau de polimorfismo e cujos ninhos podem ser muito grandes, comportando mais de milhões de operárias (Tabela 1). O segundo, composto pelos gêneros considerados mais primitivos, como *Cyphomyrmex*, *Mycetophylax*, *Mycetarotes*, *Mycocepurus*, *Myrmicocrypta*, *Apterostigma*, *Sericomyrmex*, *Mycetosoritis*, *Trachymyrmex* e *Pseudoatta*, dos quais teriam se originado as formigas mais derivadas. Tais gêneros primitivos apresentam castas monomórficas, ninhos menores e densidade de operárias menor quando comparados às formigas derivadas. Ainda, utilizam diferentes tipos de substratos como excrementos e carapaças de insetos, frutos e flores em decomposição para cultivar seu fungo simbiote.

Weber (1972a) e Hölldobler e Wilson (1990) consideram que o gênero *Cyphomyrmex* seria o mais primitivo e, portanto o mais “próximo” do ancestral comum que originou as Attini.

Dados recentes como os obtidos por Wetterer et al. (1998) e Schultz e Meier (1995), utilizando seqüências de DNA mitocondrial e morfologia das larvas, respectivamente, dividiram as Attini também em dois grupos principais (“Attini inferiores” e “Attini superiores”), reunindo junto com *Atta* e *Acromyrmex* os gêneros *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex*. O grupo das Attini superiores seria monofilético enquanto que as “Attini inferiores” formariam um grupo parafilético.

Schultz e Meier (1995) ao contrário de Weber (1972a) e Hölldobler e Wilson (1990) posicionam *Myrmicocrypta* sp. como o gênero mais primitivo e, portanto, mais próximo ao ancestral das Attini. Muitos aspectos da biologia das “Attini inferiores” são

desconhecidos e nesse grupo se encontram informações chaves para o entendimento da origem da fungicultura.

Currie (2002) reuniu várias características ecológicas e dados atuais sobre a filogenia das formigas Attini publicadas por outros autores, apresentando um quadro comparativo entre os gêneros (Tabela 1).

Brandão e Mayhé-Nunes (2001) foram os últimos autores a descreverem um gênero para a tribo Attini (o gênero *Mycetagroicus*). Esses autores consideram que o gênero *Pseudoatta*, por ser um parasita social desprovido de operárias, seja um representante de *Acromyrmex* sp., totalizando portanto 12 gêneros para a tribo e não 13.

As formigas cortadeiras são consideradas pragas nos países da América do Sul, América Central e no sul da América do Norte (FOWLER et al. 1990; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; DELLA LUCIA; FOWLER, 1993), pois atacam florestas, pastagens e principalmente áreas cultivadas, sendo responsáveis, portanto, por um impacto negativo na agricultura, causando sérios prejuízos à economia de certos países, dentre eles, o Brasil (WEBER, 1972a; WILSON, 1976). Por isso, existem mais estudos sobre as formigas cortadeiras em relação às “Attini inferiores”, pois estas, ao contrário das primeiras, não ocasionam problemas para a agricultura (Mueller, 2002).

Estudos realizados em plantios comerciais de pinheiro (*Pinus caribaea*) na Venezuela estimaram que populações de *Atta laevigata* podem reduzir em até 50% o volume de madeira produzido por hectare (HERNÁNDEZ; JAFFÉ, 1995). No Brasil, avaliando as perdas na produção ocasionadas pelas saúvas-mata-pasto (*Atta bisphaerica*) em um canavial, Precetti et al. (1988) calcularam uma perda média de 30% da produção. Tal cálculo foi determinado a partir de uma área bastante pequena, ou seja, 17,5% de um hectare.

Contudo, segundo Fowler et al. (1990), as estimativas calculadas para os danos ocasionados pelas formigas cortadeiras podem estar super ou subestimadas, sendo difícil identificar a verdadeira magnitude dos prejuízos proporcionados por esses insetos.

A espécie de maior difusão e a que mais ocasiona problemas no Brasil é *Atta sexdens*, popularmente conhecida como saúva-limão (DELLA LUCIA; FOWLER; MOREIRA, 1993).

Tabela 1. Características gerais dos gêneros de formigas da tribo Attini. Os gêneros estão organizados segundo a seqüência evolutiva (modificado de Currie (2002), com inclusão dos dados de Brandão e Mayhé-Nunes (2001)). O gênero *Pseudoatta* não está incluído, pois trata-se de um parasita social.

Gêneros (Attini)	Tamanho das Operárias	Grau de polimorfismo das operárias	Tamanho da Colônia	Substrato utilizado no jardim
<i>Attini basais</i>				
<i>Myrmicocrypta</i>	Pequeno	Monomórfico	Pequeno a médio	Carapaças de insetos
<i>Mycocepurus</i>	Pequeno	Monomórfico	Pequeno	Fezes de insetos
<i>Apterostigma</i>	Pequeno a médio	Monomórfico	Pequeno	Fezes de insetos e madeira
<i>Mycetarotes</i>	Pequeno	Monomórfico	Pequeno	Desconhecido
<i>Mycetosoritis</i>	Pequeno	Monomórfico	Pequeno	Matéria vegetal morta
<i>Cyphomyrmex</i>	Pequeno	Monomórfico	Médio	Carapaças e fezes de insetos
<i>Mycetophylax</i>	Pequeno	Monomórfico	Pequeno	Gramíneas mortas
<i>Attini derivadas</i>				
<i>Mycetagroicus</i>	-	Monomórfico	-	Fragmentos de plantas e sementes de gramíneas
<i>Sericomyrmex</i>	Médio	Monomórfico	Médio	Matéria vegetal morta
<i>Trachymyrmex</i>	Médio	Levemente polimórfico	Médio	Matéria vegetal morta
<i>Cortadeiras</i>				
<i>Acromyrmex</i>	Médio a grande	Polimórfico	Grande	Folhas e flores frescas
<i>Atta</i>	Grande	Altamente polimórfico	Muito grande	Folhas e flores frescas

(-) características não encontradas durante os levantamentos bibliográficos.

2.1.3. Fungos cultivados pelas formigas da tribo Attini

O assim chamado “fungo simbiote” é cultivado pelas formigas no interior de câmaras subterrâneas (câmara de fungo) tendo como substrato um amontoado de fragmentos de folhas (ou outros tipos de substratos, no caso das Attini inferiores) fornecidas pelas operárias. Em conjunto com o fungo simbiote, esse amontoado forma uma massa denominada de “jardim de fungos” ou “esponja fúngica” e nas formigas dos

gêneros *Atta* e *Acromyrmex* essas esponjas constituem uma das maiores dentro da tribo Attini, podendo atingir até 12 cm de diâmetro (WEBER, 1972a).

O micólogo alemão Möller (1941)* foi o primeiro a isolar e descrever os fungos cultivados pelas formigas da tribo Attini, principalmente as do gênero *Acromyrmex*, nomeando-os como *Rozites gongylophora* Möller, indicando tratar-se de um fungo pertencente ao filo Basidiomycota. Desde os trabalhos pioneiros de Möeller, outros autores procederam na árdua tarefa de identificar esse fungo.

Kreisel (1972), denominou de *Attamyces bromatificus* o fungo cultivado por *Atta insularis*, devido à formação de estruturas conhecidas como “bromatia” (i.e. gongilídeos) no micélio desse fungo. Erroneamente, aquele autor associou *A. bromatificus* como sendo a fase anamórfica de *R. gongylophora*.

A caracterização taxonômica dos fungos simbiotes é difícil, pois as estruturas de origem sexuada (basidiocarpos ou “corpos de frutificação”), utilizadas para identificação, estão ausentes ou só aparecem raramente. Mueller (2002) reuniu os principais trabalhos que trazem as observações dessas estruturas em ninhos de campo e de laboratório. Os relatos mais recentes documentam a formação de basidiocarpos em um ninho de laboratório de *Atta sexdens rubropilosa* (MUCHOVEJ et al. 1991), em um ninho de *Atta cephalotes* (FISHER et al. 1994a,b) e em um ninho de campo de *Acromyrmex hispidus fallax* (PAGNOCCA et al. 2001). Em cada caso o fungo recebeu uma denominação diferente, a saber: *Leucoagaricus weberi* no primeiro e *Leucoagaricus gongylophorus* nos dois últimos. No caso do fungo de *Acromyrmex hispidus fallax*, Pagnocca et al. (2001) demonstraram através de análise por RAPD do DNA genômico, a similaridade existente entre o micélio cultivado no jardim das operárias e o corpo de frutificação formado. Para o fungo cultivado pelas formigas cortadeiras (*Atta* sp. e *Acromyrmex* sp.), o nome atualmente aceito é *L. gongylophorus* (SINGER, 1986).

Hervey et al. (1977) ainda relata a formação de basidiocarpos em meio de cultura das Attini inferiores, como por exemplo, *Apterostigma* sp., *Myrmicocripta* sp. e *Cyphomyrmex* sp.

Mueller (2002) aponta para um detalhe interessante: até o presente momento, os corpos de frutificação dos fungos cultivados por *Atta* sp. e *Acromyrmex* sp. só foram observados em ninhos de laboratório ou ninhos de campo, ao passo que os relatos sobre

* O original intitulado “*Die Pilzgerten Einiger Suedamerikanischer Ameisen*” foi publicado em alemão em 1893. Neste estudo foi utilizada uma tradução publicada em 1941. Ver referências bibliográficas para maiores detalhes.

a formação de basidiocarpos dos fungos cultivados pelas Attini inferiores só mencionam que estes foram produzidos em meio de cultivo no laboratório, não sendo observados em ninhos.

Apesar da dificuldade encontrada na caracterização do fungo simbiote através dos métodos clássicos de taxonomia, estudos recentes utilizando análise filogenética de caracteres moleculares revelaram que a maioria dos fungos pertence aos gêneros *Leucocoprinus* e *Leucoagaricus*, incluídos na tribo Leucocoprineae (Basidiomycota: Agaricales: Lepiotaceae) que agrupa vários fungos saprófitos especialistas em decompor serrapilheira e que são abundantes no Neotrópico (CHAPELA et al. 1994; HINKLE et al. 1994; MUELLER et al. 1998). Contudo, as espécies de formigas do gênero *Apterostigma* cultivam fungos pertencentes à família Tricholomataceae (CHAPELA et al. 1994; MUELLER et al. 1998), muito aparentados aos fungos do gênero *Gerronema* (MONCALVO et al. 2000 apud CURRIE, 2002), conhecidos como decompositores de madeira (CURRIE, 2001a; CURRIE, 2002).

As análises filogenéticas não somente auxiliaram no posicionamento taxonômico dos fungos simbiotes, mas também revelaram outros pontos interessantes da história evolutiva do mutualismo formiga-fungo. O fato das formigas cultivarem outros fungos simbiotes que não pertencem à família Lepiotaceae é considerado, dentro do processo da evolução, uma aquisição para novos cultivares, pois parece que o caractere ancestral de cultivar fungos, somente pertencentes à família Lepiotaceae, foi retido na maioria das formigas da tribo, inclusive nas Attini mais derivadas.

Mueller et al. (1998) realizaram um enorme levantamento de fungos de vida livre e de fungos simbiotes, principalmente os cultivados pelas Attini inferiores. Esses autores observaram que dois cultivares apresentavam quase 100% de similaridade com duas espécies de fungos lepiotáceos de vida livre. Essa evidência, mais uma vez, levou Mueller e seus colaboradores a concluírem que se trata de uma nova aquisição de cultivares por parte das formigas.

Além das novas aquisições de cultivares pelas formigas ao longo do processo evolutivo, outro fato interessante parece ter ocorrido. Dentro das Attini inferiores, a mesma espécie de formiga pode cultivar diferentes linhagens de fungos, e a mesma linhagem de fungo pode ser compartilhada por duas espécies de formigas diferentes, revelando um processo de transferência lateral de cultivares entre as formigas

(MUELLER et al. 1998). Um exemplo seria: parte das Attini do gênero *Cyphomyrmex* cultiva seu fungo simbiote num estágio leveduriforme e não micelial como ocorrem nos outros representantes da tribo. Os cultivares desse grupo restrito de *Cyphomyrmex* formam um clado monofilético (Mueller et al. 1996, 1998) e dentro desse grupo a mesma linhagem de fungo leveduriforme pode ser compartilhada por espécies diferentes de *Cyphomyrmex*.

Green et al. (2002) demonstraram que as trocas de cultivares podem ocorrer entre espécies simpátricas de *Cyphomyrmex costatus* e *Cyphomyrmex* sp. nov. Um dos fatores relacionados com essas mudanças seria a pressão seletiva que alguns parasitas exercem para a colônia, comprometendo sua viabilidade (ADAMS et al 2000). Todas essas trocas e novas aquisições explicam porque as filogenias da formiga e do fungo simbiote são topologicamente incongruentes, pelo menos nos gêneros primitivos das Attini (Mueller et al. 1998).

O mesmo não parece acontecer entre as filogenias das Attini superiores e seus respectivos fungos simbiotes, pois Chapela et al. (1994) afirmam que ambas as filogenias são congruentes. Todavia, Bot et al. (2001a) apontaram para diferenças genéticas entre os fungos cultivados por *Acromyrmex octospinosus* e *Acromyrmex equinator*. Os autores descobriram que diferentes linhagens de fungos simbiotes podiam ser cultivadas por essas duas espécies, mas observaram também que linhagens muito semelhantes de fungo simbiote podiam ser compartilhadas entre *A. octospinosus* e *A. equinator*. Assim, Bot et al. (2001a) concluíram que dentro das espécies estudadas de formigas cortadeiras parece ter ocorrido um processo de transferência lateral de cultivares.

As evidências apresentadas acima conduziram os pesquisadores a concluir que: (i) os fungos dessas formigas não são propagados estritamente na forma assexuada (“clones assexuados”) e que alguns deles não seriam clones da linhagem inicial que deu origem à simbiose; (ii) as formigas e seus cultivares não tiveram uma coevolução em paralelo, pelo contrário, a evolução conjunta desses dois organismos foi marcada por várias descontinuidades.

A simbiose entre formiga-fungo sempre foi estudada na perspectiva dos benefícios que as formigas tiram de seu papel ativo nessa relação. Mueller (2002) denomina essa linha de pensamento como a “perspectiva mirmicocêntrica”; ao passo que, com as

recentes descobertas sobre a história evolutiva dos fungos simbiotes, o fungo também desenvolve um papel ativo na associação, ao contrário do que tradicionalmente se pensava. A essa perspectiva Mueller (2002) denomina de “perspectiva micocêntrica” de encarar a simbiose.

2.2. Diversidade microbiana associada à simbiose

2.2.1. Um terceiro simbiote

Durante muitos anos, alguns pesquisadores (p. ex. WEBER, 1972a) consideraram que a camada de coloração branca que recobre parte do corpo das operárias seria uma cera epicuticular produzida pelas mesmas. No entanto, Currie e seus colegas (1999a) verificaram que não se tratava de cera e sim de uma bactéria filamentosa do grupo dos actinomicetos que vive sobre a cutícula desses insetos.

No início, esse microrganismo foi considerado um actinomiceto do gênero *Streptomyces* (CURRIE et al. 1999a), mas, após análises de filogenética molecular, este passou a ser agrupado juntamente com os actinomicetos da família Pseudonocardiaceae (CURRIE et al. 2003b).

Na cutícula, o local de crescimento do actinomiceto parece ser gênero-específico: em *Myrmicocrypta* sp. e *Apterostigma* sp. (Attini inferiores) este se encontra sob as patas dianteiras; em *Trachymyrmex* sp. e *Acromyrmex* sp. (Attini derivadas) geralmente pode ser observado nas placas laterocervicais da propleura (CURRIE et al. 1999a; CURRIE, 2001). O actinomiceto se encontra em todos os gêneros da tribo Attini estudados por Currie et al. (1999b), revelando uma distribuição ampla dentro do grupo e também pode ser transferido tanto verticalmente (CURRIE et al. 1999a) quanto horizontalmente (POULSEN et al. 2003a).

A bactéria filamentosa é considerada como um terceiro mutualista dentro da associação formiga-fungo simbiote (CURRIE et al. 1999a; POULSEN et al. 2003b), sendo ainda difícil traçar caminhos de como se originou essa associação (CURRIE, 2002).

Pelo fato desta bactéria filamentosa pertencer a um grupo de microrganismos que são reconhecidamente produtores de substâncias antibióticas, acredita-se que o

actinomiceto estaria desempenhando uma função de higiene e proteção dos ninhos, através da produção de antibióticos (CURRIE et al. 1999a).

Testes *in vitro* demonstraram que o actinomiceto é capaz de inibir *Escovopsis* sp. um fungo parasita desses ninhos, mas que não atua sobre nenhum outro microrganismo testado, incluindo os potencialmente danosos para as formigas, como *Metarhizium anisopliae* (CURRIE et al. 1999a).

Foi demonstrado por Currie et al. (2003c) que os actinomicetos são capazes de proteger os ninhos das formigas cortadeiras *in vivo*. Subcolônias de *Acromyrmex octospinosus* foram tratadas com suspensão de esporos de *Escovopsis* sp. Todas continham operárias máximas das quais foi removida a cobertura de bactéria de suas cutículas. Verificou-se que as subcolônias das quais haviam se retirado a cobertura de bactéria apresentaram um grande impacto na saúde de seus jardins de fungos quando comparadas às subcolônias controle (as quais foram tratadas com suspensão de esporo e que continham operárias com cobertura de bactéria).

A bactéria filamentosa parece preencher dois fatores adicionais para as formigas: estimula o crescimento do fungo simbiote (observação que carece de estudos mais aprofundados) e atua como uma barreira para que fungos entomopatogênicos não ataquem as formigas (CURRIE et al. 1999a). Apesar desses benefícios, as formigas são obrigadas a arcarem com os custos de carregar essa bactéria. Poulsen et al. (2003a) deixaram claro que existe um déficit de 10-20% nas taxas metabólicas das formigas que possuem o actinomiceto simbiote em suas cutículas. As vantagens dessa associação para o actinomiceto seriam: aumento da área de dispersão vinculado ao vôo nupcial das rainhas e um microhabitat único de baixa competição (BOURSAUX-EUDE; GROSS, 2000).

Ainda não está claro qual é exatamente a fonte nutricional que essas bactérias utilizam para seu desenvolvimento, mas é sabido que as formigas são capazes de regular seu crescimento, aumentando a população frente às situações de contaminação por patógenos (CURRIE et al. 2003c). A glândula metapleurial é uma possível candidata para atuar nesse controle, ao menos nos estágios finais do crescimento do actinomiceto, o que ocorre após 25-30 dias do início do seu desenvolvimento (POULSEN et al. 2003b).

Schultz (1999) estabeleceu um paralelo interessante entre as formigas Attini e o homem. Para este autor, as formigas utilizam as bactérias filamentosas como um sistema de defesa há milhares de anos contra o fungo parasita, que aparentemente, ainda não desenvolveu resistência enquanto que o homem utiliza antibióticos a menos de sessenta anos e já existem vários microrganismos resistentes a essas drogas. Portanto, Schultz (1999) chama a atenção de que há muito a ser aprendido sobre os caminhos e mecanismos que conduziram a evolução desses insetos, com possíveis implicações benéficas para o homem.

2.2.2. Presença de um parasita

Desde o estudo original de Möller (1941) difundiu-se a idéia que as formigas cultivadoras de fungos seriam capazes de manter seu parceiro em condições axênicas, ou seja, culturas contendo apenas uma espécie de microrganismo (WEBER, 1955). Contudo, os ninhos desses insetos são hospedeiros de, pelo menos, um parasita especializado.

Considerado um fungo filamentoso pertencente ao gênero *Escovopsis* (Ascomicota: Hypocreales: Hypocreaceae), este somente foi encontrado associado a ninhos das formigas Attini (CURRIE et al. 1999b; CURRIE et al. 2003a).

Möller (1941) foi o primeiro a registrar a ocorrência desse fungo. Em seu trabalho, ele elaborou desenhos detalhados das duas espécies descritas atualmente, mas equivocadamente relacionou *Escovopsis* sp. como sendo a fase anamórfica do fungo cultivado por *Acromyrmex disciger*. Stahel e Geijskes (1941) e Weber (1979) também relataram a presença desse fungo em ninhos de *Atta sexdens* e de várias outras Attini mantidas no laboratório, respectivamente.

Em outro momento, Kreisel (1972) observando ninhos de *Atta insularis* em Cuba, encontrou um dos fungos citado por Möller e assim denominou-o como *Phialocladus zsoldii*. Posteriormente, *P. zsoldii* foi observado em ninhos de *Atta* sp. localizados no México (ROMERO et al. 1987).

Muchovej e Della Lucia (1990) alegaram que a identificação proposta por Kreisel (1972) era inválida e renomearam o fungo para *Escovopsis weberi* em homenagem a Neal A. Weber, veemente estudioso das formigas Attini.

Até o momento estão descritas apenas duas espécies desse fungo: *Escovopsis weberi* (MUCHOVEJ; DELLA LUCIA, 1990) isolado de um ninho artificial de *Atta* sp. e *Escovopsis aspergilloides* isolado de um ninho de *Trachymyrmex ruthae* (SEIFERT et al. 1995). Currie (2001b) acredita que existam novas espécies a serem descritas.

O *E. aspergilloides* diferencia-se de *E. weberi* pelas suas vesículas globosas, conídios estreitos e horizontais, sendo os conídios de *E. weberi* subglobosos e suas vesículas cilíndricas a clavadas. As características das colônias também diferem, sendo que o crescimento de *E. aspergilloides* é mais lento que *E. weberi* em vários meios de cultura em laboratório (SEIFERT et al. 1995) e o último apresenta micélio branco a princípio, mas torna-se pardo com a idade (MUCHOVEJ; DELLA LUCIA, 1990).

Os fungos do gênero *Escovopsis* sp. são considerados patógenos virulentos dos jardins de fungos das Attini. Algumas evidências suportam essa hipótese:

- (i). Ocorrência freqüente nos ninhos, onde 26% do total de isolados de fungos filamentosos não mutualísticos obtidos por Currie (1999b) correspondiam a *Escovopsis* sp.
- (ii). São encontrados praticamente em toda a filogenia das formigas Attini e estão espalhados dentro de uma vasta área geográfica (CURRIE et al. 1999b), podendo ser isolados das esponjas fúngicas e do lixo, neste último sendo abundante (BOT et al. 2001b).
- (iii). Não somente ocorrem nos ninhos sob forma de esporos, mas parecem crescer na matriz da esponja fúngica (CURRIE, 2001b), formando infecções persistentes (CURRIE et al. 1999b).
- (iv). Com essas infecções persistentes, *Escovopsis* sp. ocasionam um impacto significativo na saúde e sobrevivência dos ninhos, diminuindo a taxa de crescimento, esta traduzida na redução da biomassa tanto de formigas como do fungo simbiote (CURRIE, 2001a).

(v). *Escovopsis* sp. pode devastar ninhos que estão sem o controle das operárias em um período de 12-24 horas e em alguns casos, pode devastar ninhos que ainda estejam sob influência das operárias (CURRIE et al. 1999b).

(vi). A filogenia das formigas correlaciona paralelamente com a filogenia de *Escovopsis* sp. nos níveis mais primitivos, sugerindo uma história co-evolutiva antiga entre esses dois organismos (CURRIE et al. 2003a).

(vii). Todos os postulados de Koch foram preenchidos para o patógeno (CURRIE, 2001b).

(viii). Foi verificado que em ninhos infectados com *Escovopsis* sp. as colônias apresentam uma mobilização coletiva proporcionando uma resposta rápida e diferenciada a ameaça de infecção por esse patógeno, quando comparada com aquela usualmente encontrada em ninhos não infectados pelo fungo (HART et al. 2002).

O modo de transmissão desse fungo parece ser estritamente horizontal (CURRIE et al. 1999b; CURRIE, 2001a) e a falta de congruência entre a filogenia da formiga e de *Escovopsis* sp., nos níveis mais recentes, pode corresponder a algumas trocas de hospedeiros durante sua história evolutiva, semelhante ao que ocorre com o fungo simbiote (MUELLER et al. 1998) e possivelmente para o actinomiceto (POULSEN et al. 2003a).

Currie et al. (1999a) observaram um aumento no predomínio de *Escovopsis* sp. nos jardins das Attini superiores quando comparados com os jardins das outras Attini. Em colônias das Attini inferiores, *Escovopsis* sp. representava um pouco menos de 30% dos contaminantes isolados enquanto que representava mais de 70% dos contaminantes encontrados nas Attini superiores. Em adição, Currie et al. (1999b) observaram um decréscimo na frequência de “contaminantes gerais” das Attini inferiores para as superiores.

Esses fatos encontram suporte com a observação de que *Escovopsis* sp. parece ser o único fungo capaz de recobrir os jardins de fungos das Attini superiores, mas é um dentre outros que consegue fazê-lo nos jardins das Attini inferiores. Assim, Currie et al.

(1999b) especulam que a aparente evolução no aumento da virulência desse fungo frente às formigas mais derivadas é resultante do fato dessas estarem cultivando por milhares de anos clones assexuados do fungo simbiote. Com certeza, essa hipótese não encontra mais respaldo em vista das descobertas sobre transferência lateral de cultivares nas Attini superiores (BOT et al. 2001a).

Com relação aos mecanismos de patogenicidade, Currie (2001b) especula que *Escovopsis* sp. pode competir com o fungo simbiote pelo substrato presente nos ninhos, embora, acredita-se que o parasita retira seus nutrientes do próprio fungo simbiote das formigas, atuando como um micoparasita. Foi comprovado que *Escovopsis* sp. possui enzimas com atividade quitinolítica frente aos constituintes da parede celular de *Rhizoctonia solani*, um fungo basideomiceto (INGLIS; KAWCHUK 2002). Apesar dessas duas possibilidades, nada está confirmado sobre seu real mecanismo de patogenicidade.

Currie et al. (2003a) supõem que *Escovopsis* sp. seria um parasita de fungos basidiomicetos de vida livre que invadiu a simbiose juntamente com os eventos de domesticação de novos cultivares a partir de fungos de vida livre (MUELLER et al. 1998). Mas ainda faltam estudos sobre a história evolutiva desse fungo que desvendem um pouco mais sobre a sua origem.

Por fim, com a descoberta de que os ninhos das Attini servem de hospedeiros para fungos do gênero *Escovopsis* e que estes podem crescer em seu interior é prova suficiente para refutar a hipótese de que os fungos simbiontes das Attini são mantidos em culturas puras (axênicas) (WEBER, 1955).

2.2.3 Outros microrganismos associados aos ninhos

O substrato em que cresce o fungo simbiote é favorável para o desenvolvimento de outros microorganismos (WEBER, 1966; PAGNOCCA, 1997) e alguns estudos, de fato, demonstraram que existe uma microbiota presente nos ninhos das formigas cultivadoras de fungos, sendo composta por bactérias, fungos e leveduras.

Tauk e Serzedello (1975) e Kyian et al. (1969) apontaram para a ocorrência de bactérias em jardins das formigas cortadeiras *Atta laevigata* e *Atta capiguara*, respectivamente. Por outro lado, a presença de leveduras nos jardins foi verificada em

Atta cephalotes, *Acromyrmex octospinosus* (CRAVEN et al. 1970) e em *Atta sexdens rubropilosa* (PAGNOCCA et al. 1996; CARRREIRO et al. 1997). Nesta última, pelo menos duas novas espécies de levedura foram isoladas de seus ninhos, *Cryptococcus haglerorum* (MIDDELHOVEN et al. 2003) e *Sympodiomyces attinorum* (CARREIRO et al. in press).

Foi demonstrado que esses microrganismos (bactérias e leveduras) encontrados nos formigueiros possuem características bioquímicas importantes que, de alguma forma, desempenham uma função nas colônias. Bacci et al. (1995) demonstraram que bactérias encontradas nos ninhos de *Atta sexdens* são capazes de degradar biopolímeros, como o amido e a celobiose e Carreiro (2000) observou que essa mesma espécie de formiga abriga, em seus jardins, leveduras que também degradam polímeros vegetais.

Esses autores sugerem que esses microrganismos poderiam auxiliar o fungo simbiote no ataque enzimático do material vegetal, assim colaborando para a associação. Ainda com respeito às leveduras, foi verificado que pode haver competição entre elas por este nicho, pois muitas das linhagens são “killer”, isto é, produzem compostos que inibem o desenvolvimento de outras linhagens sensíveis. Esse modo de interação conduz à competição com outras espécies, levando à predominância de umas em relação à outras (CARREIRO et al. 2002).

Num dos raros estudos que abordaram a ocorrência de fungos filamentosos (que não o fungo simbiote), Fisher et al. (1996) trabalhando com *Atta cephalotes*, levantaram várias espécies de fungos dentro do jardim de fungo. Os principais gêneros e espécies encontrados foram: *Aspergillus niger*, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium herbarum*, *Cladosporium oxysporum*, *Epicoccum nigrum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium solani*, *Gliomastix murorum*, *Glomerella cingulata*, *Phoma nebulosa*, *Phomopsis* sp., *Phyllostictia* sp., *Trichoderma ghaesembillae*, *Trichoderma hamatum* e *Trichoderma longibrachiatum*. Muitos desses fungos foram provenientes do substrato que era oferecido para as formigas e outros estavam presentes também na própria cutícula desses insetos.

Luciano et al. (1995) isolaram principalmente, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Nigrospora* sp. desenvolvendo-se no jardim de fungos de uma colônia artificial de *Acromyrmex heyeri*.

Acreditava-se que esses fungos eram contaminantes cujos esporos eram carregados pelo ar e encontravam na esponja um ambiente favorável. No entanto, muitos desses “contaminantes” realmente pertencem aos ninhos. Möeller (1941) relatou a ocorrência de *Mucor* sp., *Rhizopus* sp. e *Aspergillus* sp. nos jardins de *Acromyrmex* sp. que estavam sem operárias. Nas mesmas condições, Stahel e Geijskes (1941) e Kreisel (1972) relatam a presença de outros fungos além de *Escovopsis* sp., sendo que o último também observou *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp., *Cunninghamella* sp. e *Trichoderma* sp. Também Weber (1955) relatou que quando as formigas foram retiradas dos jardins de fungos, estes foram recobertos pelo crescimento de vários fungos filamentosos indesejáveis após um período de 15 dias.

Bass e Cherrett (1994) estudando a importância do papel exercido pelas operárias na manutenção dos jardins de fungos, encontraram *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. e *Mucor* sp. em fragmentos de jardins de fungos isolados das operárias de *Atta sexdens*. Ortiz et al. (1999), também estudando fragmentos de esponja isolados das formigas (*Atta cephalotes*), encontraram em tais fragmentos os fungos *Rhizopus* sp., *Fusarium* sp. e *Trichoderma lignorum*.

Observações desse tipo envolvendo ninhos em condições naturais são escassas. Spegazzini (1921) encontrou ascocarpos (i.e. estrutura de reprodução sexuada dos ascomicetos) de *Xilaria micrura* em ninhos de *Acromyrmex lundii* na Argentina. Fungos desse gênero são capazes de formar os ascocarpos em jardins de *Atta sexdens* (PINHATI-SILVA et al. 2002; observação pessoal).

Fungos entomopatogênicos, como *Metarhizium anisopliae*, foram observados na natureza infectando rainhas de *A. sexdens* (ALVES & SOSA GÓMEZ 1983), rainhas mortas de *A. cephalotes* (LÓPEZ, et al. 1999) e operárias de *A. colombica* (HUGHES et al. 2004).

A princípio, todos esses fungos não estariam presentes nos ninhos na forma micelial, mas, somente na forma de conídios. É possível que, havendo desequilíbrio dos ninhos, alguns se tornem oportunistas, como é o caso anteriormente abordado a respeito da importância do gênero *Escovopsis* para as formigas (CURRIE et al. 1999b).

Um estudo recente abordou um grupo de microrganismos que vivem no interior das formigas cortadeiras *Acromyrmex* sp. (BORM et al. 2002). Baseado em sequências de fragmentos do gene que codifica para a subunidade menor do RNA ribossômico, os

autores encontraram grupos de microrganismos próximos ao fungo simbiote e até mesmo com a bactéria simbiote *Wolbachia* sp., além de *Rhizoctonia solani*, *Cordyceps* sp. e *Escherichia coli.*, todos advindos do interior das operárias. Estudos posteriores deverão focar a importância desses microrganismos para a simbiose.

2.3. Defesas naturais das formigas contra microrganismos estranhos

Como mencionado, para garantir um bom desenvolvimento do fungo simbiote, este deve ser mantido livre de microrganismos invasores que possam ser eventuais competidores. As formigas desenvolveram uma série de mecanismos e comportamentos que envolvem a proteção de seus cultivares (OI; PEREIRA, 1993). Os avanços no conhecimento desses mecanismos estão mais voltados para as formigas cortadeiras do que para as outras formigas da tribo. Assim, a principal estratégia utilizada pelas formigas cortadeiras, segundo Weber (1972a), é promover condições ótimas para o crescimento do fungo simbiote.

Weber (1972b) descreveu as etapas de preparação do substrato vegetal antes de ser incorporado no ninho: primeiramente as folhas são cortadas em pedaços menores e posteriormente, saliva e gotículas de um líquido proveniente do intestino posterior (reto) das operárias são adicionadas ao material. Segundo esse autor, essas são etapas comportamentais e bioquímicas vitais para a manutenção do fungo e promotoras de seu crescimento (WEBER, 1966; QUINLAN; CHERRETT, 1977).

Quinlan e Cherrett (1977) demonstraram que as operárias de *Acromyrmex octospinosus* possuem um comportamento de “lamber” as folhas e isso contribui significativamente para o desenvolvimento de seu parceiro, já que parte das ceras epicuticulares das folhas e os microrganismos nela presentes estariam sendo removidos durante a execução dessa atividade (QUINLAN; CHERRETT, 1978b). Tal comportamento está relacionado com uma estrutura denominada cavidade infrabucal que atua como um filtro para impedir a entrada de partículas sólidas, incluindo os esporos de fungos coletados durante a limpeza das folhas, do ninho e do próprio corpo das operárias. O material retido é posteriormente regurgitado sob a forma de um “pellet” (QUINLAN; CHERRETT, 1978b).

Os pellets são reunidos em pilhas, sendo que Little et al. (2003) observaram que um grupo diverso de formigas cultivadoras de fungos são capazes de construir tais amontoados. Aparentemente, as pilhas de pellets auxiliariam na defesa do jardim contra microrganismos indesejáveis, no caso das formigas cortadeiras. Para as outras Attini, como *Cyphomyrmex costatus*, talvez sirvam como uma fonte alternativa de substrato para o cultivo de seu fungo simbiote (operárias dessa espécie foram observadas implantando o fungo simbiote nas pilhas).

Após serem preparadas, as folhas são dispostas nas primeiras camadas da esponja fúngica, onde outras operárias implantam grandes quantidades do fungo simbiote.

Currie (2001), entretanto, argumenta que não existem resultados empíricos suficientes para acreditar que as atividades que proporcionam condições ótimas para o crescimento do fungo inibam o desenvolvimento de microrganismos invasores nesse ambiente. Esse autor acredita que, dentre as atividades descritas acima, a mais significativa seria a grande biomassa de fungo simbiote que as formigas inoculam no substrato recém-coletado, eliminando assim, a competição com outros agentes.

Outras estratégias de proteção são utilizadas pelas operárias, pois as folhas que passam pelo processo de limpeza ainda não são inteiramente destituídas de microrganismos (WEBER, 1957; QUINLAN & CHERRETT, 1977). Por exemplo, Currie e Stuart (2001) verificaram que em ninhos de *Atta colombica* intencionalmente contaminados por fungos filamentosos, tais como *Escovopsis* sp. e *Trichoderma* sp., as operárias realizaram dois comportamentos principais de remoção física desses patógenos: em um deles os esporos presentes no jardim de fungo são removidos pelas operárias com a boca (processo denominado “grooming”), enquanto que o outro consiste na remoção anormal (excessiva) de material vegetal recém-colocado no jardim com o fungo simbiote (denominado “weeding”). Este último comportamento também foi observado por Weber (1957).

Segundo Currie (2002), parece que os meios encontrados pelas formigas para controlar a microbiota associada aos seus ninhos podem ser agrupados em dois conjuntos: um relacionado com as defesas frente aos contaminantes inespecíficos, aos quais as formigas são constantemente expostas e o outro, envolvendo mecanismos de defesa contra microrganismos especializados.

No primeiro caso, temos o controle dos microrganismos através de compostos com ação antibiótica produzidos pelas próprias formigas (WEBER, 1958; NORTH et al. 1997). Diversos autores relacionam o controle dos microrganismos no interior dos ninhos com as secreções produzidas pelas glândulas mandibulares e metatorácicas (ou metapleurais) das operárias.

Essas substâncias agem contra bactérias (MASCHWITZ et al., 1970; BROUGH, 1983; NASCIMENTO et al. 1996), fungos filamentosos (SIHANONTH et al. 1973; BEATTIE, et al. 1985; BEATTIE, et al. 1986), na germinação de esporos de fungos (NASCIMENTO et al. 1996; MARSARO-JÚNIOR et al. 2001) e até mesmo contra o próprio fungo cultivado pelas formigas (BOT et al, 2002). Essa última constatação necessita de maiores investigações.

Maschwitz et al. (1970) e Schildknecht e Koob (1970) identificaram os ácidos fenilacético e 3-indolacético, provenientes das secreções das glândulas metapleurais de *Atta sexdens* como antimicrobianos. Nascimento et al. (1996) observaram que as secreções das glândulas metapleurais de *A. sexdens* e *A. cephalotes* continham esses mesmos compostos mais o ácido hidroxidecanóico e as secreções de *Acromyrmex octospinosus* continham somente ácido indolacético e ácido hidroxidecanóico. Schildknecht e Koob (1971) chamaram esse último de mirmicacina e observaram uma ação na inibição da germinação de esporos de *Alternaria tennis* e *Botrytis cinerea*.

Em um trabalho mais recente, Ortius-Lechner et al. (2000) caracterizaram aproximadamente vinte compostos majoritários das secreções das glândulas metapleurais de *Acromyrmex octospinosus*. É possível que, além da ação direta, esses compostos atuem também acidificando o substrato, dificultando a multiplicação de muitos desses microrganismos. Tal observação já havia sido feita por Papa e Papa (1982), os quais testaram extratos de ninhos de *Acromyrmex octospinosus* incluídos em meios de cultura frente a uma variedade de bactérias Gram positivas e Gram negativas e descobriram que em pH igual a cinco houve total inibição dos microrganismos, atribuindo portanto, à acidificação do substrato, o controle das bactérias nos ninhos.

Currie (2001b) apontou que faltavam resultados empíricos *in vivo* que realmente provassem que as glândulas metapleurais e mandibulares possuem uma função de higiene nos ninhos. Diehl e Junqueira (2001) não encontraram efeito fungicida para as secreções metapleurais sobre *Beauveria bassiana* quando formigas são inoculadas com

esse fungo. Por outro lado, Poulsen et al. (2002b) demonstrou experimentalmente que operárias infectadas com *M. anisopliae* e que tiveram as glândulas metapleurais fechadas sofreram uma taxa de letalidade maior quando comparado com a testemunha. Apesar de auxiliar no controle de microrganismos nos ninhos, é atribuído que a produção da secreção metapleural ocasiona um custo adicional de até 20% nas taxas metabólicas das formigas (POULSEN et al. 2002b).

As formigas também lidam de maneira especial com o lixo produzido pela colônia, pois este contém microrganismos que foram retirados do jardim de fungos (CURRIE; STUART, 2001). Assim, o lixo pode se constituir em uma fonte de re-infecção para a colônia se não houver um manejo adequado. A importância dessa tarefa foi observada por Hart e Ratnieks (2002). Os autores verificaram que 11,2% das operárias de *Atta colombica* que estão envolvidas com atividades fora da colônia, desempenham tarefas especificamente relacionadas com o lixo (por exemplo: “transporte de lixo” e “trabalhos na pilha de lixo”) e o restante das operárias eram as forrageadoras.

Quanto ao segundo mecanismo de defesa (específico), tem-se a associação com a bactéria filamentosa, cuja principal função, é a produção de substâncias para a supressão do crescimento de *Escovopsis* sp. (CURRIE et al. 1999a; SCHULTZ, 1999). Ainda, quando colônias de *Atta colombica* são contaminadas artificialmente com esse patógeno, observa-se uma resposta comportamental da colônia como um todo na tentativa de eliminar esse fungo invasor do ninho (HART et al. 2002).

Poulsen et al. (2002a) demonstraram que operárias máximas de *Acromyrmex octospinosus* e *Acromyrmex equinator* possuem uma grande quantidade da bactéria em suas cutículas; encontraram, ainda, que essas operárias localizam-se principalmente nas camadas inferiores da esponja fúngica, mesmo local onde a incidência de *Escovopsis* sp. é maior, sugerindo que o controle das infecções por esse fungo fossem realizadas por essa casta de operária.

Todos esses cuidados com a higiene dos ninhos é justificável, pois sendo as formigas cortadeiras insetos sociais, não é difícil imaginar os problemas para as colônias em caso de ocorrer uma infecção generalizada. Assim, viver em grupo traz alguns custos, porém os benefícios advindos desse tipo de vida, para as formigas cortadeiras, são maiores (HUGHES et al. 2002). Portanto, as formigas exercem um papel fundamental na contínua proteção de seu fungo mutualístico (WEBER, 1957;

BASS; CHERRETT, 1994), executando uma série de ações que levam ao estabelecimento de um ambiente propício para o desenvolvimento de seu parceiro (QUINLAN; CHERRETT, 1977) e saúde da colônia. Aliás, é preciso enfatizar que o *Leucoagaricus gongylophorus* é, reconhecidamente um mal competidor, conforme verificado por Quinlan e Cherrett (1978a) e outros autores.

2.4. Controle das formigas cortadeiras

Devido ao impacto que as formigas cortadeiras ocasionam nos agroecossistemas, tornou-se necessária a utilização de métodos que controlem a ação desses insetos. Della Lucia e Vilela (1993) reuniram as principais técnicas de uso corrente no combate dessas formigas. De acordo com esses autores, as mais empregadas encaixam-se nas seguintes categorias: controle mecânico; controle biológico e cultural; uso de plantas, tóxicas ou atrativas; feromônios e por fim, produtos químicos.

Os produtos naturais presentes em várias espécies vegetais estão sendo testados, pois alguns apresentam ação repelente para as formigas e outros ação fungicida contra o fungo simbiote, como é o caso do gergelim (*Sesamum indicum*) que apresenta substâncias derivadas do metabolismo secundário com atividade sobre o fungo simbiote (PAGNOCCA et al., 1990). Outras plantas com efeitos semelhantes são: fava branca (*Canavalia ensiformis*), mamona (*Ricinus communis*) e batata doce (*Ipomoea batatas*).

Alguns dos compostos obtidos destas e de outras espécies vegetais necessitam de estudos adicionais que abordem sua aplicação e eficiência em condições naturais para se determinar a viabilidade ou não do uso dessas substâncias como agentes controladores desses insetos (VIEIRA et al. 1997; GODOY, 2003).

O controle mecânico (retirada do ninho através de escavação e aração) é eficiente apenas quando os ninhos de *Atta* sp. apresentam quatro meses de idade e estejam localizados em áreas de pequena extensão. No entanto, considerando áreas extensas, como as de cultivo e plantios de reflorestamento, é desejável o emprego de métodos mais abrangentes.

Dentro dessa perspectiva, os produtos químicos são escolhidos como de interesse e tais inseticidas podem ser aplicados nos saúveiros sob diversas formulações: gases

liquefeitos, líquidos termonebulizáveis e nebulizáveis, pós e iscas granuladas. Estas últimas são preferidas pela alta eficiência, fácil manuseio, rapidez de ação e custo não elevado (DELLA LUCIA; VILELA, 1993; BOARETTO; FORTI, 1997).

2.4.1. Controle através de iscas tóxicas

A isca tóxica apresenta dois componentes: o inseticida, que é o princípio ativo da isca e um substrato atrativo que pode ser a polpa cítrica, milho moído, farinha de trigo, entre outros. Segundo Forti et al. (1998), o inseticida deve preencher algumas exigências para que seja formulado em iscas tóxicas: (i) ser letal em baixa concentração e ao mesmo tempo não matar as formigas rapidamente quando em alta concentração; (ii) ser um inseticida de ingestão, com ação lenta; (iii) não ser repelente; (iv) ser facilmente difundido por trofalaxia para a maioria das operárias e (v) ser degradado rapidamente, com baixa toxicidade para os vertebrados e não causar muitos prejuízos para o ambiente.

Devido principalmente aos danos ambientais decorrentes de seu uso (meia vida no solo é de 12 anos), as iscas granuladas à base de dodecacloro (Mirex[®]), um organoclorado utilizado no Brasil durante muitos anos, teve sua produção proibida em 1992 com a descoberta de um inseticida substituto. Este pertence ao grupo químico das sulfonas fluoralfáticas, denominado de sulfluramida (N-etil perfluoroctano sulfonamida), primeiramente estudado no combate das formigas lava-pés (*Solenopsis invicta*) nos E.U.A. (FORTI et al. 1998).

Esse composto, quando presente no organismo, é transformado no metabólito perfluoroctano sulfonamida (DESFA) que bloqueia o fluxo de elétrons da cadeia respiratória, nas mitocôndrias, interrompendo a síntese de ATP. Desse modo, as operárias intoxicadas apresentam movimentos lentos e agressividade diminuída. Além disso, a contaminação por sulfluramida é dada pela ingestão e trofalaxia entre as operárias e após quatro dias da aplicação, os ninhos não apresentam corte de folhas, muitas operárias estão mortas e a cultura de fungo torna-se desorganizada. Outro fator importante, a sulfluramida possui um período de meia vida no solo de 90 a 180 dias, inferior ao do dodecacloro (JACOB, 2002).

As iscas contendo sulfluramida e formuladas com o atrativo a base de polpa cítrica foram bem aceitas para várias espécies de formigas cortadeiras incluindo, *Atta laevigata*, *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e *A. sexdens rubropilosa* (DELLA LUCIA et al. 1992).

Assim, atualmente a maioria das iscas comercializadas no controle das formigas cortadeiras é à base de sulfluramida (concentração de 0,3%) e existem várias marcas de iscas granuladas disponíveis no mercado: p.ex. Dinagro-S[®], Attamex-S[®], Pikapau-S[®] e Mirex-S[®], todas com o mesmo teor de ingrediente ativo e com o mesmo atrativo, ou seja, polpa cítrica (FORTI et al. 1998).

A eficiência das iscas a base de sulfluramida no combate a várias espécies de saúvas e quenquéns está concentrada em uma faixa de 90 a 100% de mortalidade. Dentre as espécies susceptíveis pode-se citar: *A. sexdens rubropilosa* (ZANUNCIO et al. 1997; ZANETTI et al. 2003a), *A. laevigata* (ZANUNCIO et al. 1992), *Atta texana* (CAMERON, 1990), *Acromyrmex subterraneus molestans* (ZANUNCIO et al. 1996; ZANETTI et al. 2003b), *Acromyrmex heyeri* (LINK et al. 1997) e *Acromyrmex ambiguus* (LOECK; GUSMÃO 1998).

Apesar da descoberta da sulfluramida, a busca e o desenvolvimento de novos princípios ativos continuam, resultando em compostos com alguma atividade sobre as formigas cortadeiras: p.ex. diflubenzuron, fenoxicarbe, avermectina B₁, fipronil, etc. (JACOB, 2002).

Ainda em fase de testes, o produto hidrametilnona (grupo químico das amidinohidrazonas) possui modo de ação semelhante ao da sulfluramida e mostrou-se ativo em *Atta texana* com uma eficiência de 80% e 100%, quando formulado em iscas (CAMERON, 1990) e também é promissor no controle de *Atta* sp. (MENDONÇA et al. 1987). Contudo, poucos estudos foram realizados com esse princípio ativo.

2.4.2. Controle através de fungos entomopatogênicos

Em alternativa ao uso das substâncias químicas, tem-se o controle por meio de inimigos naturais das formigas cortadeiras. Testes foram realizados com nematóides, ácaros e fungos entomopatogênicos encontrados na natureza associados a ninhos das cortadeiras (DELLA LUCIA; MOREIRA; OLIVEIRA, 1993).

Embora o conhecimento a respeito de tais inimigos seja pequeno, os estudos têm se concentrado mais nos fungos entomopatogênicos. No laboratório e no campo, os fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, comumente utilizados no controle de várias pragas agrícolas, como a cigarrinha da folha da cana-de-açúcar e de pastagens, sinalizaram para o potencial patogênico que exercem nas operárias de *Atta sexdens rubropilosa* (ALVES; SOSA GOMES, 1983), *Atta cephalotes* (LÓPEZ et al. 1999), *Atta sexdens piriventris* e *Acromyrmex* sp. (DIEHL-FLEIG, 1987; DIEHL-FLEIG et al. 1988; SILVA; DIEHL-FLEIG, 1988; DIEHL-FLEIG et al. 1992; DIEHL-FLEIG et al. 1993). Silva et al. (1993) obtiveram uma eficiência de 76% no controle de *Acromyrmex* sp. em áreas de reflorestamento de eucalipto utilizando o fungo *Beauveria bassiana*.

Os sintomas que os fungos entomopatogênicos causam nas colônias das formigas cortadeiras incluem: aumento na mortalidade de formigas, declínio da atividade de forrageamento e na saúde dos jardins de fungos, levando indiretamente a colônia à morte (JACCOUD et al. 1999).

Apesar dos testes com fungos entomopatogênicos apresentarem níveis de eficiência satisfatórios, sempre esbarram na maneira como as formigas lidam com os agentes estranhos quando da aplicação a colônias grandes em condições naturais, muitas vezes desencorajando a montagem de um programa de controle biológico para essas pragas (KERMARREC et al. 1986; MACHADO et al. 1988; DIEHL-FLEIG; LUCCHESI, 1991).

Para contornar esse impasse, tentativas de formular os esporos desses fungos em iscas tóxicas com diferentes atrativos foram realizadas, permitindo assim que os esporos não sejam reconhecidos pelos mecanismos de defesa das formigas (DIEHL-FLEIG; SILVA, 1992; SPECHT et al. 1994). O resultado desse tipo de controle é efetivo, porém requer um tempo prolongado (cerca de 60 dias) para que ocorra a inatividade total da colônia (LÓPEZ; ORDUZ, 2003).

Silva e Diehl-Fleig (1988) apontaram que, para um controle utilizando fungos entomopatogênicos, é necessária a seleção de isolados mais específicos ao hospedeiro e já foi observado que, dentro da população desses fungos, é possível encontrar grande variabilidade genética entre os indivíduos que eventualmente permite uma adaptação a certos hospedeiros em relação a outros (LÓPEZ et al. 1999; HUGHES et al. 2004).

Além dos fungos que atacam as formigas, outros foram estudados em relação ao antagonismo que exercem frente aos fungos simbiotes. Ortiz e Orduz (2000) verificaram *in vitro* que algumas cepas de *Trichoderma lignorum*, encontrado comumente no solo, inibem satisfatoriamente o crescimento micelial do simbiote de *Atta cephalotes*. Essa é uma área de pesquisa promissora, pois pouco é conhecido sobre os inimigos naturais do protegido fungo simbiote das formigas.

Pelo exposto, observa-se que um dos caminhos para o desenvolvimento de programas que visem o controle por agentes biológicos é a busca por novos inimigos naturais, sendo de fundamental importância encontrar aqueles que possuam capacidade de transpor as barreiras de defesa que as formigas apresentam, para assegurar um combate mais efetivo.

Tendo em vista que os relatos sobre os fungos filamentosos associados com os ninhos das formigas cortadeiras são escassos e pontuais (exceção ao trabalho de Fischer et al. (1996)), e considerando que a composição da micota presente nesse ambiente ainda não foi totalmente explorada, o presente trabalho propôs pesquisar quais seriam os fungos que podem ser encontrados nos ninhos da formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa*. Assim os objetivos deste trabalho foram:

3. OBJETIVOS

- ✓ Isolamento e identificação de fungos filamentosos em ninhos artificiais e em ninhos de campo de *Atta sexdens rubropilosa* submetidos a tratamento com iscas tóxicas.
- ✓ Isolamento e identificação dos fungos filamentosos em fragmentos de esponja fúngica retirados de ninhos de *Atta sexdens rubropilosa*.
- ✓ Verificar os efeitos em ninhos artificiais de *Atta sexdens rubropilosa* quando estes são contaminados com esporos de alguns fungos comumente encontrados nesse ambiente.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta do material para os tratamentos com iscas tóxicas

Noventa e seis colônias iniciais (com idade máxima de cinco meses) da espécie *Atta sexdens*, foram coletados nos meses de março e abril de 2002 e 2003, no município de Corumbataí, SP (S 22° 17' 22'' e W 47° 39' 23'') e trazidos para o laboratório do Centro de Estudos de Insetos Sociais (C.E.I.S.) - I.B. - UNESP, Rio Claro, SP. Nesta fase de desenvolvimento, os ninhos apresentam uma única câmara de fungo de aproximadamente 10 a 15 cm de diâmetro e está localizada a poucos centímetros da superfície, facilitando sua escavação (AUTUORI, 1941).

Os ninhos foram escavados de modo a minimizar o contato com partículas do solo e a desestruturação das esponjas, evitando-se que a terra se depositasse sobre as mesmas. Os ninhos foram acomodados em recipientes de plástico transparente, recebendo água, alimentação e outros cuidados. Os recipientes obedecem a um padrão que temos utilizado com sucesso nos laboratórios do C.E.I.S., os quais permitem a observação do seu interior e garante boa aeração e circulação das operárias (Figura 1). A alimentação constituída de flocos de aveia e folhas de *Eucalyptus* sp. foi fornecida até a estabilização dos ninhos, o que levou de cinco a seis meses. Após esse período os experimentos foram iniciados.

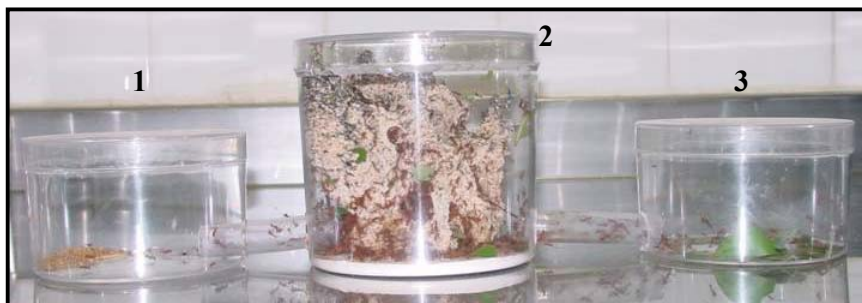


Figura 1. Aspecto geral de um ninho artificial de *Atta sexdens rubropilosa* utilizado nos tratamentos no laboratório. 1= Câmara de lixo, 2= Câmara com esponja fúngica, 3= Câmara de “alimentação”.

Colônias iniciais presentes no mesmo local (com características semelhantes aos ninhos descritos acima) foram experimentalmente tratadas com iscas tóxicas *in situ* (ver item 4.2.2) e, após o período de experimento, foram escavadas e tiveram suas esponjas fúngicas coletadas com espátula estéril. As esponjas foram armazenadas em recipientes estéreis e conduzidas ao laboratório para isolamento dos fungos.

4.2. Tratamentos com iscas tóxicas visando o desequilíbrio dos ninhos

4.2.1. Ninhos de laboratório

Após a estabilização dos ninhos no laboratório, os mesmos foram separados aleatoriamente em quatro lotes. Um grupo de dez ninhos continuou sendo alimentado com folhas de *Eucalyptus* sp. e flocos de aveia (controle I). O segundo grupo, constituído de outros dez ninhos, recebeu iscas granuladas sem o princípio ativo (controle II), ou seja, contendo apenas o atrativo à base de polpa cítrica. O terceiro grupo, composto de 40 ninhos, recebeu tratamento com iscas granuladas a base de sulfluramida 0,3% (Mirex-S[®]) e para o último grupo, composto de 36 ninhos, foram oferecidas iscas a base de hidrametilona (formuladas no C.E.I.S., compostas por: 90% de polpa cítrica, 10% de óleo e 0,5-2% de hidrametilona. Toso os ingredientes foram misturados e processados em uma peletizadora. As iscas formadas foram resfriadas e armazenadas em ambiente seco até o início dos experimentos).

Nos ninhos do controle II e nos ninhos tratados com sulfluramida e hidrametilona foram colocadas de três a cinco gramas de iscas em um pequeno recipiente disposto na câmara de alimentação. O período de experimento desses dois tratamentos teve início com a aplicação das iscas e terminou com a morte das operárias ou quando o ninho apresentou o desenvolvimento de fungos filamentosos.

4.2.2. Ninhos de campo

Cada ninho foi identificado com estaca de madeira e recebeu cerca de dez gramas de iscas a base de sulfluramida 0,3% (Mirex-S[®]), depositadas próximo a entrada dos formigueiros (olheiros). Como logo após a primeira aplicação (data: 4/04/03), onde foram tratados 16 ninhos, ocorreu chuva intensa com perda de quase todo o material, foi necessária uma segunda aplicação (data: 16/04/03), quando foram tratados outros 18 ninhos. Decorridos 12 dias da primeira aplicação e seis da segunda, os ninhos foram escavados seguindo os procedimentos mencionados no item 4.1.

4.3. Experimentos com esponja fúngica sem a presença das operárias

Em março de 2003, adicionalmente, foram coletadas 12 colônias iniciais (seguindo os mesmos procedimentos do item 4.1.) de *Atta sexdens rubropilosa* na mesma fazenda. Para dez desses ninhos, foram retirados das respectivas esponjas fúngicas, seis fragmentos com aproximadamente 0,3g completamente livres de formigas e cada um foi disposto em tampas de plástico no interior de placas de Petri ($\varnothing = 150$ mm), forradas com papel de filtro. O procedimento com os dois ninhos restantes foi semelhante, porém sem a retirada das operárias, constituindo assim, o grupo controle.

Cada sistema foi suprido diariamente com água destilada estéril, porém não foram oferecidas folhas para as formigas. O período de duração do experimento compreendeu 12 dias, durante o qual se procedeu ao isolamento dos fungos que se desenvolveram nos fragmentos que estavam sem as formigas.

4.4. Isolamento dos fungos

Os ninhos de laboratório, o material coletado no campo (pós-tratamento com as iscas tóxicas) e os fragmentos de esponja mantidos livres das operárias foram observados macroscopicamente, com auxílio de microscópio estereoscópico, com o intuito de verificar a ocorrência de fungos oportunistas. Quando detectado o desenvolvimento desses microrganismos, foi realizado o isolamento direto transferindo esporos dos fungos para o meio ágar malte 2% (BIOBRAS) adicionado de cloranfenicol (SIGMA) a $150 \mu\text{g.L}^{-1}$, para inibir o desenvolvimento de bactérias (MALLOCH, 1981; GAMS, et al. 1998).

Os microrganismos foram incubados a $25 \pm 1^\circ \text{C}$ de três a sete dias e quando necessário foi realizado o re-isolamento. Após o crescimento, as culturas foram purificadas utilizando o mesmo meio de cultivo sem a adição de cloranfenicol. Os isolados assim obtidos foram codificados e estocados para a etapa seguinte, ou seja, as identificações.

4.5. Identificação dos fungos

As identificações realizadas neste estudo seguiram os critérios clássicos descritos na literatura (DOMSCH et al. 1993; HAWKSWORTH et al. 1995; ALEXOPOULOS et al, 1996; BARNETT; HUNTER, 1998; SAMSON, 2000) que levam em conta características morfológicas (tanto macro e microscópicas) e características ecológicas (habitat freqüentemente encontrado).

Para as observações microscópicas, utilizou-se água glicerinada (40%) ou o corante azul de algodão (azul de anilina) como líquidos de montagem.

No caso dos gêneros mais comuns, foram utilizados os métodos de identificação segundo Klich e Pitt (1988) para espécies de *Aspergillus*, o método de Nelson et al. (1983) para espécies de *Fusarium* e o método de Pitt (1988) para espécies de *Penicillium*.

Para outros gêneros foram consultadas as seguintes chaves de identificação:

- *Arthrobotrys* sp. (van OORSCHOT, 1985);

- *Chrysosporium* sp. (van OORSCHOT, 1980);
- *Cladosporium* sp. e demais dematiáceos (ELLIS, 1971, 1976);
- *Cunninghamella* sp. (SAMSON, 1969);
- *Trichoderma* sp. (RIFAI, 1965);
- *Mariannea* sp. e *Paecilomyces* sp. (SAMSON, 1974)
- *Metarhizium* sp. (GAMS; ROZSYPAL, 1973; TULLOCH, 1976; BRIDGE et al. 1993);
- *Moniliella* sp. (De HOOG, 1979);
- *Mucor* sp. (SCHIPPER, 1978);
- *Rhizopus* sp. (SCHIPPER, 1984);
- *Syncephalastrum racemosum* (MISRA, 1975; SCHIPPER; STALPERS, 1983);
- demais gêneros encontrados nessa pesquisa (DOMSCH et al. 1993; BARNETT; HUNTER, 1998; SAMSON, 2000).

4.6. Preservação dos isolados

Todos os isolados estão sendo mantidos em tubos com ágar inclinado na geladeira à ($\pm 5^{\circ}\text{C}$). Os meios de cultivo utilizados são aqueles sugeridos por Gams e colaboradores (1998) para grupos de fungos específicos e neste trabalho utilizamos SNA (Synthetic Nutrient Agar) para espécies de *Fusarium*; OA (Oatmeal Agar) para espécies de *Trichoderma* e *Metarhizium*; CMA (Corn meal Agar) para espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* e meio ágar malte 2% para os demais fungos.

Os isolados também estão sendo mantidos pelo método de Castellani (1967) apud Smith e Onions (1983).

4.7. Contaminação dos ninhos por esporos de fungos filamentosos

Nessa parte do trabalho foram utilizadas mais 20 colônias iniciais mantidas no laboratório (coletadas na Fazenda Corumbataí no início de março de 2004). As colônias foram aleatoriamente separadas em cinco grupos, totalizando quatro réplicas em cada. Cada grupo recebeu 0,45 mL de uma das seguintes suspensões: (i) solução 0,05% de Tween 80 (controle); (ii) suspensão de esporos *Escovopsis weberi* (isolado A086a), (iii)

suspensão de esporos de *Syncephalastrum racemosum* (isolado H23b); (iv) suspensão de esporos de *Trichoderma* cf. *harzianum* (isolado D8a) e (v) suspensão de esporos de *Fusarium solani*. (isolado A104).

Os fungos foram cultivados em ágar extrato de malte (MEA) a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante sete dias no escuro. As suspensões eram constituídas por esporos dos fungos em Tween 80 0,05% e foram padronizadas em câmara de Neubauer para aproximadamente 10^6 esporos/mL.

As suspensões foram borrifadas na parte superior da esponja fúngica (esponja nova). Em diferentes tempos (0, 43, 120, 168 e 334 horas) dez fragmentos, com cerca de 0,3 cm, foram removidos da esponja fúngica e semeados em MEA com cloranfenicol a $150 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Após um período de incubação de quatro dias a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, os fragmentos foram checados para ausência ou presença de crescimento dos fungos inoculados. Havendo ocorrência de crescimento de fungos nos fragmentos, estes foram identificados para confirmar se realmente era um dos fungos inoculados.

O resultado desse experimento é dado como a proporção de fungos inoculados recuperados nos isolamentos dos fragmentos de esponja nova ao longo do tempo (figura 14). Para efeitos comparativos entre os isolados utilizou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis aplicado a variável do tipo binomial, com auxílio do software Minitab (2000).

5. RESULTADOS

5.1. Tratamentos com iscas tóxicas visando o desequilíbrio dos ninhos de *Atta sexdens rubropilosa*

5.1.1. Ninhos de laboratório tratados com Mirex-S®

Os ninhos pertencentes ao primeiro grupo (controle I) para os quais foram oferecidas folhas de *Eucalyptus* sp. não apresentaram sinais de alteração em sua atividade, tendo havido contínuo corte das folhas e manutenção do fungo simbiote pelas operárias. O grupo (controle II) para o qual foram oferecidas iscas sem o princípio ativo, apresentou pequena redução na atividade das operárias, mas não sofreu alterações expressivas ou que pudessem ocasionar a sua morte ou o aparecimento de qualquer fungo oportunista.

Todos os ninhos (n= 40) morreram após serem tratados com as iscas tóxicas contendo 0,3% de sulfluramida, sendo que em doze deles não foi observado macroscopicamente o crescimento de fungo contaminante em qualquer parte do ninho. Nos vinte e oito ninhos restantes ocorreu o crescimento de fungos contaminantes na esponja e/ou na área destinada ao material descartado pelas formigas (lixo). Nesses

ninhos também foi verificado maior umidade, visível sob a forma de água de condensação nas tampas e nas paredes dos compartimentos de plástico. Tal fato foi observado principalmente nos compartimentos onde estavam dispostas as esponjas fúngicas.

Dentre os três compartimentos do ninho artificial (lixo, esponja fúngica e área de alimentação), observou-se que o recipiente o qual continha a esponja fúngica apresentou maior ocorrência de fungos filamentosos (66%) enquanto que no lixo foi observado cerca de 20% dos fungos (Figura 2).

Foram isoladas 74 linhagens de fungos, compreendendo 17 espécies distribuídas em 13 gêneros e um isolado que apresentou micélio estéril. A maioria dos isolados pertence ao grupo atualmente conhecido como fungos mitosporicos (ex-Deuteromicetos), sendo que outros pertencem a ordem Mucorales (Filo Zygomycota) (HAWKSWORTH et al., 1995).

Os fungos com maior frequência de ocorrência foram *Syncephalastrum racemosum* (Zygomycota: Mucorales) (54%), seguido de *Escovopsis weberi* (21%) e *Fusarium solani* (Ascomycota: Hypocreales) (18%) (Figura 7), sendo que os dois primeiros foram encontrados somente na esponja fúngica e o último foi encontrado tanto na esponja quanto no lixo. *S. racemosum* e *E. weberi* foram capazes de recobrir totalmente a esponja fúngica em apenas quatro dias após o início do tratamento (Figuras 3 e 4).

Em proporção menor, outros fungos puderam ser observados. Alguns desses cresceram isoladamente bem como na presença de outros e, portanto, para um mesmo ninho, geralmente mais de um fungo filamentoso foi observado (Tabela 2 e 3).

Apenas o ninho N08 apresentou maior diversidade de fungos. Foram encontrados *Cladosporium cladosporioides*, *Cunninghamella elegans*, *Fusarium equiseti*, *Penicillium janthinellum* e *S. racemosum* (Tabelas 2 e 3).

Em oito ninhos também ocorreu o desenvolvimento de fungos contaminantes nos fragmentos da isca depositados sobre a esponja fúngica (Figura 2), fato não observado nos ninhos utilizados como controle II (iscas sem princípio ativo). Os fungos que se desenvolveram nas iscas foram: *Penicillium citrinum* (50%), seguido de *Aspergillus flavus* (30%), *P. janthinellum* (10%) e *Trichothecium roseum* (10%) (Tabela 3 e Figura 5).

De maneira geral, os fungos encontrados no lixo também estavam presentes no jardim, com exceção de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium verticillioides*, mas nem todos os fungos que ocorreram na esponja puderam ser observados no lixo (Tabelas 2 e 3). Interessante notar que alguns desses fungos filamentosos do lixo estavam crescendo sobre as operárias mortas, como por exemplo, *Trichoderma cf. harzianum* (ninho D15), *Trichothecium roseum* (ninho D10), *Fusarium oxysporum* (ninho D11) e *Aspergillus flavus* (ninho D12) (Figura 6).

Considerando um único ninho, o mesmo fungo pôde ser observado em diferentes locais, como o *F. solani* (ninho 2B) e o *Trichoderma cf. harzianum* (ninho D13) encontrados na esponja e no lixo simultaneamente, *A. flavus* e *P. citrinum* presentes tanto no lixo quanto nas iscas do ninho D12, enquanto que no ninho D5, *P. citrinum* desenvolveu-se nas iscas e no jardim de fungos.

Dentre todos os ninhos, o N07 foi o único que apresentou fungos somente no lixo.

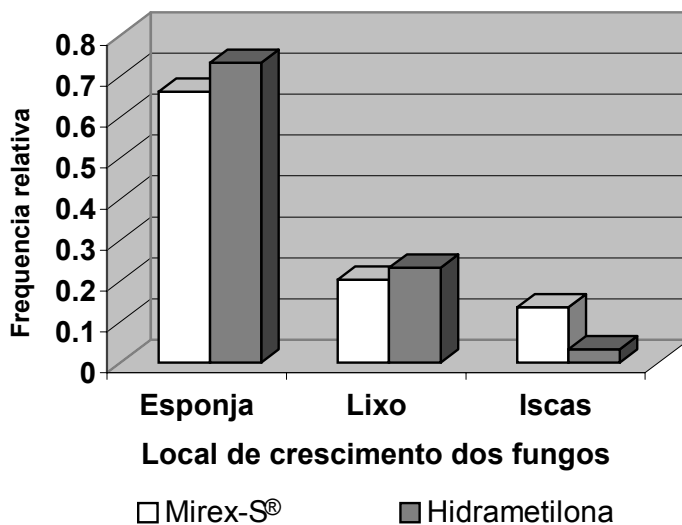


Figura 2. Local de ocorrência dos isolados de fungos filamentosos nos ninhos artificiais de *Atta sexdens rubropilosa* tratados com iscas tóxicas (Mirex-S® e isca à base de hidrametilona).



Figura 3. (a) Ninho de artificial de *Atta sexdens rubropilosa* após aplicação da isca Mirex-S[®], notar micélio de *Syncephalastrum racemosum* recobrando a esponja fúngica; (b) Estrutura reprodutiva (esporângio) do mesmo fungo (50x); (c) Esporângios, detalhe (400x).

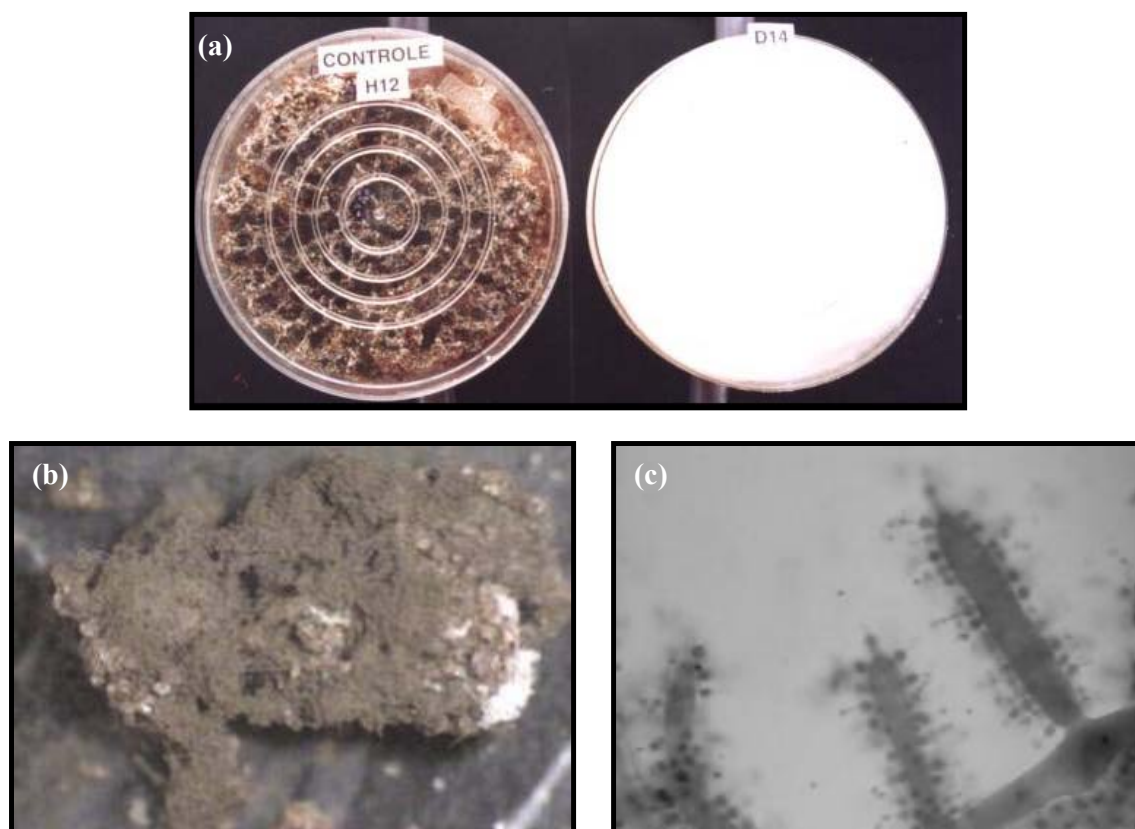


Figura 4. (a) Ninho artificial de *Atta sexdens rubropilosa*, esquerda: controle (tratado com iscas sem princípio ativo), direita: ninho totalmente recoberto por micélio de *Escovopsis weberi* após 4 dias do tratamento com Mirex-S[®]; (b) Fragmento de esponja fúngica recoberto por esporulação marrom do mesmo fungo; (c) Conidióforos de *E. weberi* (1000x).

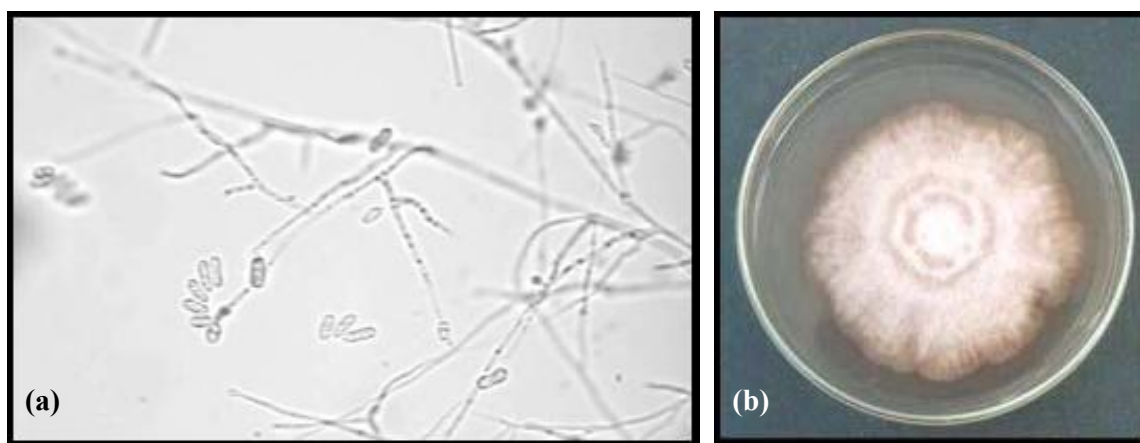


Figura 5. *Trichothecium roseum*, fungo encontrado nos fragmentos da isca Mirex-S[®] ofereidas à ninhos artificiais de *Atta sexdens rubropilosa*. (a) Conidióforo e esporos (400x); (b) aspecto da colônia em meio de extrato de malte (MEA) à 25°C.

Tabela 3. Ocorrência de fungos filamentosos em ninhos artificiais (**lixo e iscas**) de *Atta sexdens rubropilosa* submetidos a tratamentos com a isca tóxica (Mirex-S[®])

Fungos Isolados	LIXO							ISCAS								
	Ninhos							Ninhos								
	2B	N 07	D 08	D 10	D 11	D 12	D 13	D 15	4B	N 08	D 01	D 02	D 04	D 05	D 12	D 13
<i>Acremonium kiliense</i>	+		+		+											
<i>Aspergillus flavus</i>							+		+						+	+
<i>Cunninghamella elegans</i>		+														
<i>Fusarium oxysporum</i>					+											
<i>Fusarium solani</i>	+															
<i>Fusarium verticillioides</i>		+														
<i>Penicillium citrinum</i>						+					+	+	+	+	+	
<i>Penicillium janthinellum</i>		+							+							
<i>Penicillium (Furcatum) sp.</i>								+								
<i>Trichoderma cf. harzianum</i>				+				+	+							
<i>Trichothecium roseum</i>				+							+					



Figura 6. Operária morta de *Atta sexdens rubropilosa* depositada no lixo do ninho de laboratório D12 tratado com isca tóxica (Mirex-S[®]). Notar conidióforos amarelos de *Aspergillus flavus* emergindo do corpo da operária (32x).

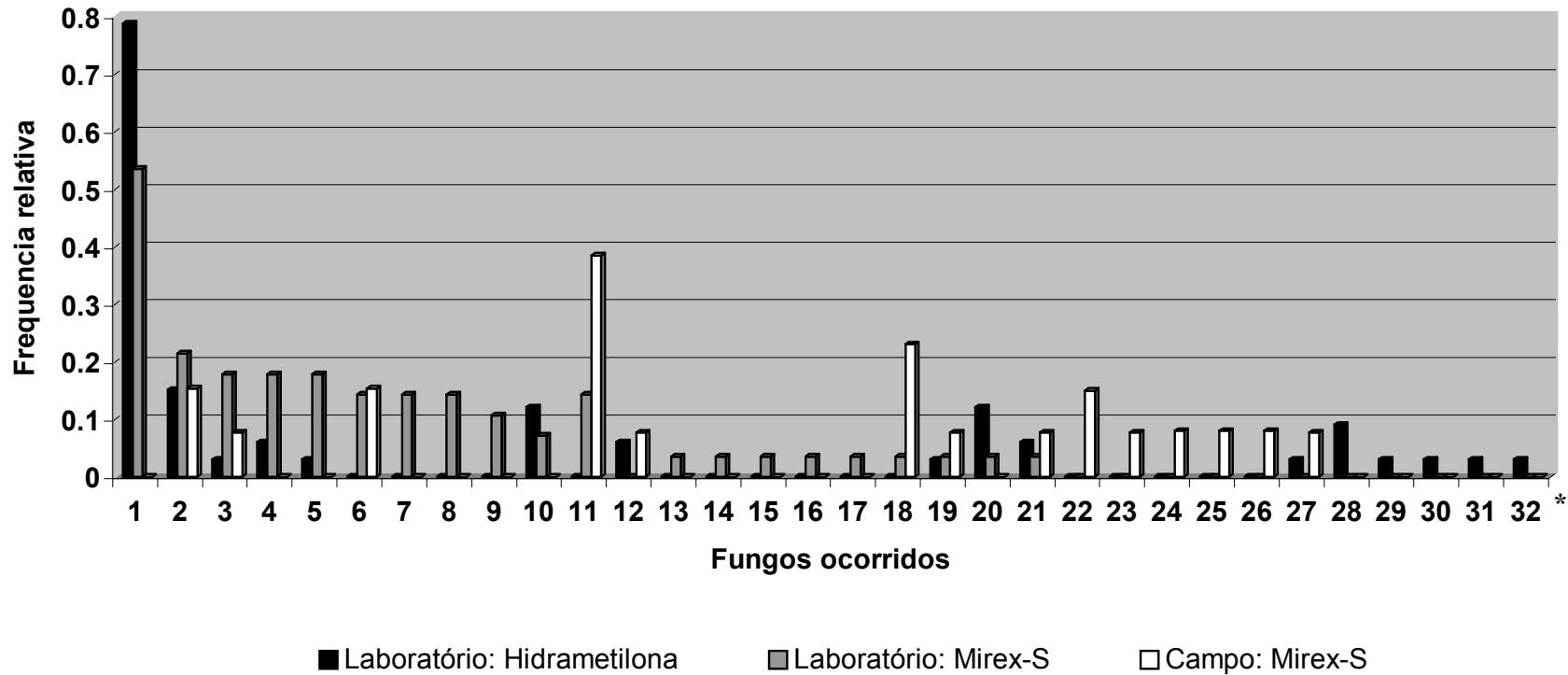


Figura 7. Frequência de ocorrência dos fungos filamentosos encontrados nos ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* tratados com iscas granuladas (Mirex-S[®]) no campo (n=13) e no laboratório (n=28) e com iscas granuladas (à base de hidrametilona) no laboratório (n=33).

* **Espécies de fungos:** 1= *Syncephalastrum racemosum*, 2= *Escovopsis weberi*, 3= *Fusarium solani*, 4= *Penicillium citrinum*, 5= *Aspergillus flavus*, 6= *Acremonium kiliense*, 7= *Trichothecium roseum*, 8= *Cunninghamella elegans*, 9= *Penicillium janthinellum*, 10= *Piptocephalis* sp., 11= *Trichoderma* cf. *harzianum*, 12= *Trichoderma* sp., 13= *Arthrobotrys cladodes*, 14= *Cladosporium cladosporioides*, 15= *Fusarium equiseti*, 16= *Fusarium verticillioides*, 17= micelia sterilia, 18= *Fusarium oxysporum*, 19= *Moniliella suaveolens*, 20= *Penicillium (Furcatum)* sp., 21= *Acremonium strictum*, 22= *Mucor hiemalis*, 23= *Cunninghamella equinulata*, 24= *Mariannea elegans* var. *punicea*, 25= *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*, 26= *Mucor microsporus*, 27= *Aspegillus niger* var. *niger*, 28= *Scopulariopsis acremonium*, 29= *Metarhizium flavoviride*, 30= *Aspergillus unguis*, 31= *Aspergillus versicolor*; 32 = *Aspergillus parasiticus*. Ver Tabelas 2, 3, 4 e 5 para maiores detalhes.

5.1.2. Ninhos de laboratório tratados com iscas à base de hidrametilnona

De modo semelhante ao observado para o tratamento anterior, os ninhos que permaneceram com alimentação controlada e os ninhos para os quais foram oferecidas iscas sem o princípio ativo não apresentaram quaisquer sinais de desenvolvimento de fungos filamentosos durante o experimento.

De todos os ninhos tratados (n= 36) com a isca granulada à base de hidrametilnona, 35 deles morreram após a aplicação da isca. Dentre os ninhos mortos, foi confirmado o desenvolvimento macroscópico de fungos filamentosos em 34 deles, sendo possível realizar o isolamento de fungos de 33 ninhos. Ocorreu também grande umidade nos compartimentos da esponja fúngica dessas colônias.

Foi possível recuperar um total de 60 linhagens de fungos, distribuídas em 11 gêneros e 13 espécies. Os fungos obtidos neste tratamento também pertencem ao grupo dos fungos mitospóricos, com exceção de *Piptocephalis* sp. e *S. racemosum* que são representantes da ordem Mucorales (Filo Zygomycota) (HAWKSWORTH et al., 1995). Novamente, o local onde houve maior ocorrência de fungos filamentosos foi a esponja fúngica (72%), seguido do lixo (25%) e dos fragmentos das iscas (3%) (Figura 2).

Os fungos mais frequentes foram: *S. racemosum* (79%) e *E. weberi* (15%), sendo que o primeiro desenvolveu-se preferencialmente no jardim de fungos, mas também apareceu no lixo; enquanto que o segundo somente foi observado na esponja fúngica. *Penicillium (Furcatum)* sp., *Piptocephalis* sp., bem como outros fungos, foram isolados em proporções menores (Figuras 7 e 8).

Vários foram os ninhos que apresentaram fungos filamentosos somente no jardim, mas o ninho H11 apresentou fungos nos fragmentos das iscas granuladas e no lixo. Por outro lado, a colônia H22 foi a única na qual foi observado fungo somente no lixo e o microrganismo em questão era o *Scopulariopsis acremonium* (Ascomycota) (Tabelas 4 e 5).

Considerando uma mesma colônia, *S. acremonium* foi isolado tanto da esponja quanto do lixo do ninho H17 e *S. racemosum* foi isolado da esponja e do lixo dos ninhos H21 e H23 (Tabela 4 e 5).

Dos fungos observados no lixo, *Acremonium strictum* (ninho H4), *Acremonium kiliense* (ninho H5) e *Aspergillus parasiticus* (ninho H39) estavam crescendo sobre o corpo das operárias mortas.

Dentre os fungos observados nos tratamentos com hidrametilona e Mirex-S[®], nove deles foram comum aos dois tratamentos, sendo eles: *S. racemosum*, *E. weberi*, *F. solani*, *A. flavus*, *Piptocephalis* sp., *P. citrinum*, *Penicillium (Furcatum)* sp., *A. strictum* e *M. suaveolens* (Figura 7).

O fungo mais freqüente nos dois tratamentos foi *S. racemosum*, sendo isolado apenas da esponja fúngica dos ninhos tratados com Mirex-S[®], todavia, foi isolado na esponja e no lixo dos ninhos tratados com hidrametilona.

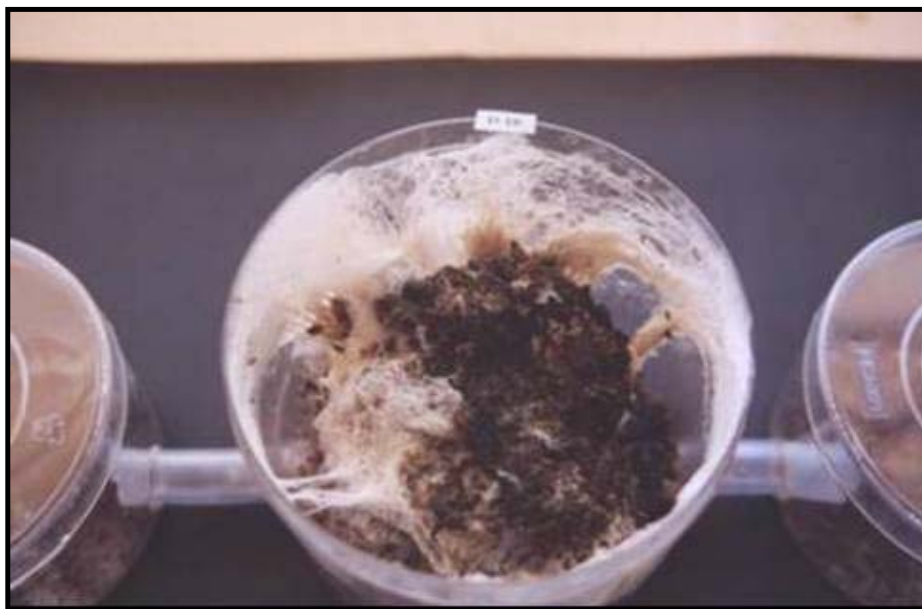


Figura 8. Ninho artificial de *Atta sexdens rubropilosa* apresentando o fungo filamentosso *Moniliella suaveolens*, após 4 dias da aplicação de iscas tóxicas à base de hidrametilona.

Tabela 4. Ocorrência de fungos filamentosos em ninhos artificiais (**lixo e iscas**) de *Atta sexdens rubropilosa* submetidos a tratamentos com isca à base de hidrametilona

Fungos Isolados	LIXO										ISCAS	
	Ninhos										Ninho	
	H 01	H 04	H 05	H 11	H 16	H 17	H 21	H 22	H 23	H 29	H 39	H 11
<i>Acremonium strictum</i>		+										
<i>Aspergillus niger</i> var. <i>niger</i>				+								
<i>Aspergillus unguis</i>			+									
<i>Aspergillus versicolor</i>			+									
<i>Aspergillus parasiticus</i>											+	
<i>Penicillium (Furcatum)</i> sp.		+										+
<i>Penicillium citrinum</i>							+					
<i>Scopulariopsis acremonium</i>					+	+		+				
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	+						+		+			+
<i>Trichoderma</i> sp.										+		

5.1.3. Ninhos de campo tratados com Mirex-S®

Após 12 dias da primeira aplicação, apenas cinco dos 16 ninhos submetidos ao tratamento com Mirex-S® estavam inativos. No restante, observou-se atividade das operárias na entrada e nas proximidades dos ninhos. Além disso, verificamos que as iscas aplicadas nesses ninhos não foram carregadas pelas formigas devido às fortes chuvas que caíram imediatamente após a aplicação (c.f. item 4.2.2).

Dos cinco ninhos mortos, dois continham fungos contaminantes na esponja fúngica (Figura 9). Nos demais a esponja fúngica não foi localizada ou não puderam ser recuperadas em condições de serem examinadas no laboratório. No outro lote foram encontrados 17 ninhos mortos (n= 18), após seis dias da aplicação. Em 13 desses ninhos a presença de fungos contaminantes sobre o jardim de fungos foi constatada e nos quatro ninhos restantes não foram encontradas as esponjas fúngicas durante a escavação.

Do total de 15 ninhos que apresentaram fungos (dois ninhos da primeira coleta e 13 ninhos da segunda) em 13 deles foi possível realizar os isolamentos dos contaminantes. Os 23 fungos isolados estavam distribuídos em 10 gêneros e 13 espécies sendo que a maioria pertence ao grupo dos fungos mitospóricos e o restante ao filo Zygomycota (Tabela 6).

Os isolados de *Trichoderma cf. harzianum* foram os de maior ocorrência (38%) seguido pelos fungos pertencentes ao gênero *F. oxysporum* (23%), enquanto que *E. weberi* ocorreu em apenas dois ninhos (Figura 7). Em sete ninhos houve o desenvolvimento de mais de um fungo enquanto que nos outros seis, apenas uma espécie foi registrada, entre elas estava *A. strictum* (Figura 10).

De um modo geral, comparando-se isoladamente os tratamentos com hidrametilona no laboratório com o tratamento no campo, alguns fungos ocorreram em comum: *E. weberi*, *F. solani*, *Trichoderma sp.*, *A. strictum*, *Aspergillus niger* var. *niger* e *M. suaveolens*. Nos tratamentos com sulfloramida tanto no laboratório quanto no campo, os fungos em comum foram: *E. weberi*, *F. solani*, *A. kiliense*, *A. strictum*, *Trichoderma cf. harzianum*, *F. oxysporum* e *M. suaveolens*.

Analisando conjuntamente os dois tratamentos no laboratório e o tratamento no campo, nota-se que apenas três isolados apareceram nas três situações: *E. weberi*, *F. solani* e *M. suaveolens* (Figura 7).

Tabela 6. Ocorrência de fungos filamentosos em ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* tratados com isca tóxica (Mirex-S®) *in situ*

Fungos Isolados	Ninhos de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>													
	2	3	1B	2B	5B	6B	7B	9B	13B	16B	17B	19B	20B	
<i>Acremonium kiliense</i>		+			+									
<i>Acremonium strictum</i>			+											
<i>Aspergillus niger</i> var. <i>niger</i>				+										
<i>Cunninghamella equinulata</i>							+							
<i>Escovopsis weberi</i>						+			+					
<i>Fusarium solani</i>	+													
<i>Fusarium oxysporum</i>						+					+	+		
<i>Mariannea elegans</i> var. <i>punicea</i>														+
<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>						+								
<i>Moniliella suaveolens</i>											+			
<i>Mucor hiemalis</i>				+										+
<i>Mucor microsporus</i>								+						
<i>Trichoderma</i> cf. <i>harzianum</i>	+	+					+			+	+			
<i>Trichoderma</i> sp.						+								



Figura 9. Fungo em ninho de *Atta sexdens rubropilosa*, após 12 dias de tratamento com iscas tóxicas no campo. Notar micélio de *Trichoderma* cf. *harzianum* recobrendo a esponja fúngica (seta). Rainha viva no momento da coleta.

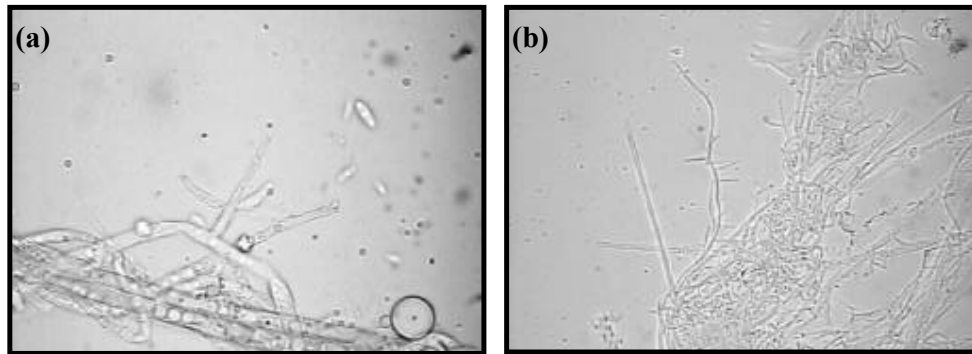


Figura 10. Conidióforos ramificados de *Acremonium strictum*. (a) 1000x; (b) 400x.

5.2. Fragmentos de esponja fúngica mantidos sem a presença das operárias

Na presença das operárias, os fragmentos da esponja fúngica permaneceram saudáveis, sem quaisquer mudanças em seu aspecto, mesmo após 12 dias de experimento (Figura 11a). Por outro lado, nos fragmentos mantidos sem as formigas ocorreu o desenvolvimento de vários fungos filamentosos, alguns dos quais apareceram já no segundo dia de experimento (Figura 11).

Em alguns casos mais de um fungo filamentoso estava compartilhando o mesmo fragmento. Os ninhos que tiveram o maior número de fungos foram: ninho 03 (*A. kiliense*, *Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer*, *Trichoderma* cf. *harzianum* e *Trichoderma* sp.), ninho 08 (*A. kiliense*, *Chrysosporium sulfureum*, *E. weberi* e *M. suaveolens*) e ninho 09 (*C. cladosporioides*, *M. suaveolens*, *Trichoderma* sp. e um fungo com micélio estéril) (Tabela 7).

De todo o experimento, *M. suaveolens* (50%), *Trichoderma* sp. (50%), *A. kiliense* (42%) e *E. weberi* (42%) foram os isolados de maior ocorrência (Figura 12). *M. suaveolens* formou estruturas conspícuas que facilitaram sua identificação (Figuras 11b e 13).

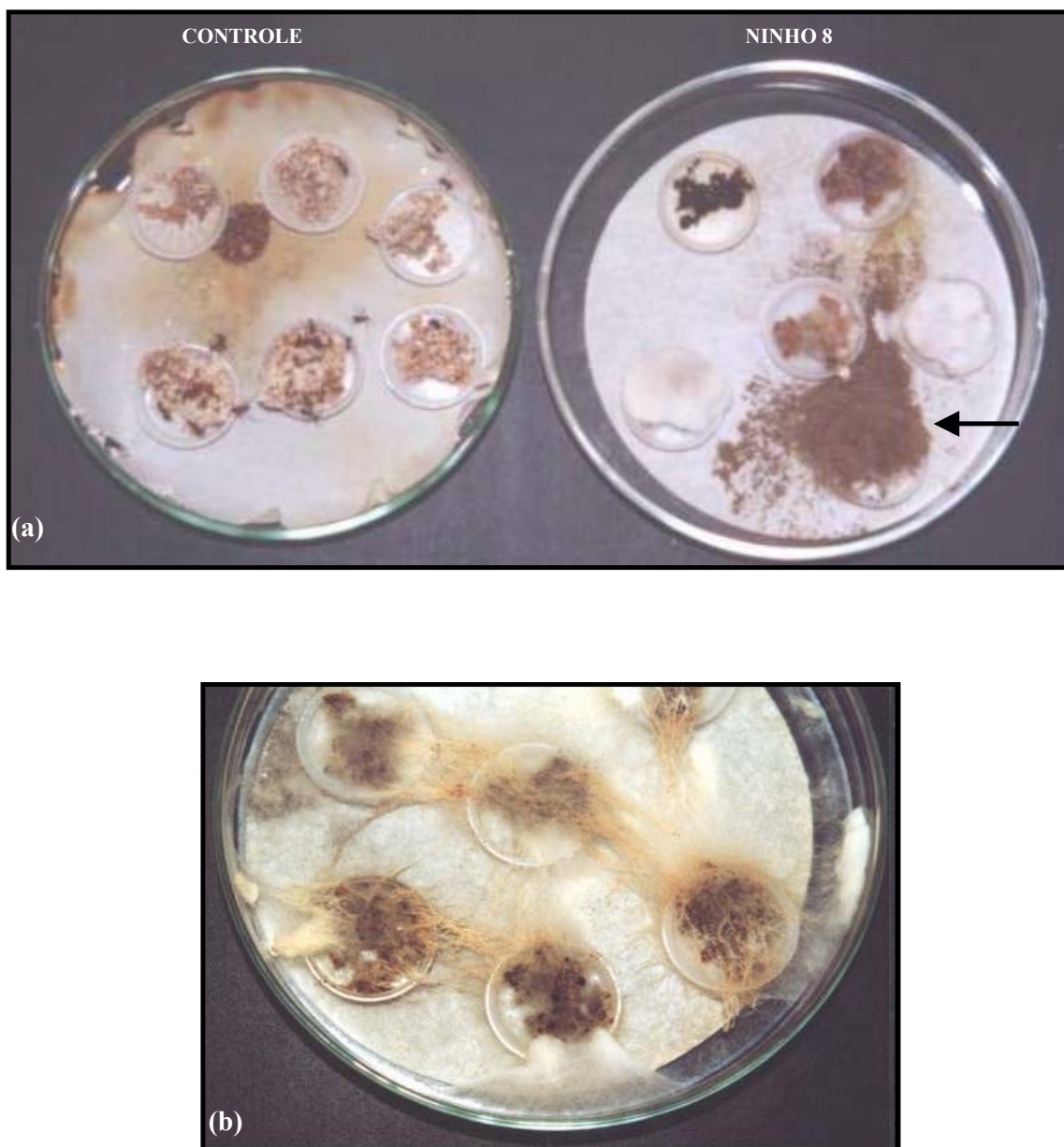


Figura 11. Fragmentos de esponja fúngica retirados de colônias iniciais de *Atta sexdens rubropilosa*. (a) *esquerda*: fragmentos mantidos com operárias (controle); *direita*: fragmentos mantidos 12 dias sem operárias, notar esporulação de *Escovopsis weberi* formada (seta). (b) Fragmentos de esponja fúngica, sem operárias, apresentando micélio do fungo *Moniliella suaveolens*.

Tabela 7. Fungos filamentosos recuperados de fragmentos de esponja fúngica na ausência das operárias de *Atta sexdens rubropilosa*.

Fungos Isolados	Ninhos											
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
<i>Acremonium kiliense</i>			+	+		+		+				+
<i>Acremonium strictum</i>					+							
<i>Chrysosporium sulfureum</i>								+				
<i>Cladosporium cladosporioides</i>									+			
<i>Clonostachys rosea</i>												+
<i>Escovopsis weberi</i>	+	+		+				+				+
<i>Moniliella suaveolens</i>	+			+			+	+	+			+
<i>Rhizopus stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>			+									
<i>Trichoderma</i> cf. <i>harzianum</i>			+			+						
<i>Trichoderma</i> sp.	+	+	+		+					+	+	
MS								+		+		

MS- micelia sterilia

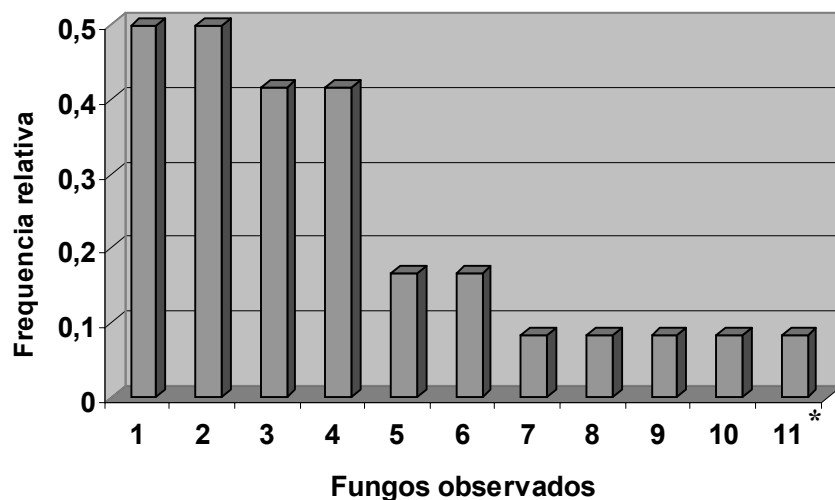


Figura 12. Frequência de ocorrência dos fungos filamentosos encontrados em fragmentos de esponja fúngica removidos de ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* e mantidos livres das operárias (n=12)

* **Espécies de fungos:** 1= *Moniliella suaveolens*, 2= *Trichoderma* sp., 3= *Acremonium kiliense*, 4= *Escovopsis weberi*, 5= *Trichoderma* cf. *harzianum*, 6= MS (micelia sterilia), 7= *Acremonium strictum*, 8= *Chrysosporium sulfureum*, 9= *Cladosporium cladosporioides*, 10= *Clonostachys rosea* e 11= *Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer*.

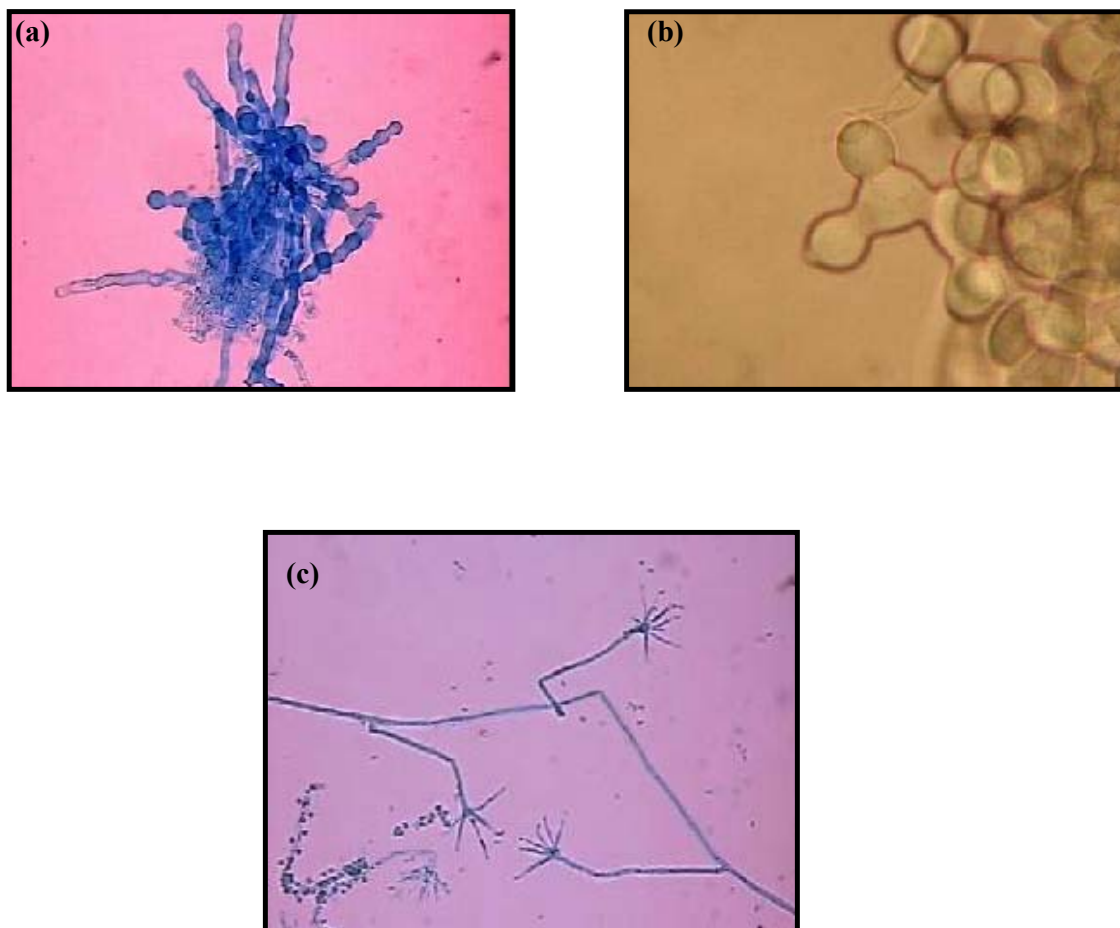


Figura 13. (a) *Moniliella suaveolens*, esporos formados em cadeia (200x, coloração azul de anilina); (b) detalhe da formação dos esporos (1000x); (c) estruturas aberrantes formadas no micélio aéreo (200x, coloração azul de anilina).

5.3. Contaminação dos ninhos por esporos de fungos filamentosos

Nesta parte do estudo o intuito era verificar se uma infecção proposital por esporos de fungos filamentosos poderia ocasionar um desequilíbrio no interior das colônias artificiais de *Atta sexdens rubropilosa*.

Após induzir a contaminação dos ninhos com alguns dos isolados obtidos nesta pesquisa, pôde-se observar que todos os isolados foram eliminados do jardim de fungos, em diferentes períodos de tempo, provocando alterações temporárias nos mesmos.

Durante todo o experimento, o tratamento controle apresentou o crescimento do fungo simbiote a uma taxa superior a 90%, portanto, exibindo um baixo índice de contaminação durante os tempos analisados. No tempo inicial (T=0), *S. racemosum*, *F. solani* e *Trichoderma cf. harzianum*, foram reisolados dos jardins de cada um dos tratamentos em uma proporção acima de 80%. Por outro lado, *E. weberi* diferiu significativamente dos demais (H= 46,87, g.l.= 4, p= 0), pois foi recuperado em 50% dos fragmentos de esponja nova (Figura 14).

Nos tempos subseqüentes a proporção das cepas recuperadas da esponja nova diminuiu drasticamente, principalmente para *F. solani* e *Trichoderma cf. harzianum* que após 43 horas foi reduzida para 10%. Por outro lado, a taxa de re-isolamento de *S. racemosum* caiu mais lentamente, atingindo aproximadamente 50% após 120 horas de tratamento (H= 53,98, g.l.= 3, p= 0).

Com 14 horas de experimento, notou-se que as operárias de *A. sexdens rubropilosa* das colônias que receberam tratamento com esporos de *S. racemosum* estavam engajadas em uma atividade interessante: elas cortavam e carregavam para o lixo pequenos pedaços de esponja nova. Isolamentos realizados a partir desses fragmentos revelaram a presença maciça de *S. racemosum*. A duração desse comportamento, no entanto, não foi prolongada, pois foi encerrado antes de completar 43 horas de experimento.

A porcentagem de recuperação de *S. racemosum* somente alcançou níveis semelhantes aos de *F. solani* e *Trichoderma cf. harzianum* no tempo igual a 168 horas (H= 2,00 g.l.= 3, p= 0,36) e posteriormente (T= 334 horas) todos eles não puderam ser mais reisolados da esponja.

Apesar do decréscimo de *E. weberi* durante os intervalos de tempo analisados, essa diminuição pode ser considerada mais lenta quando comparada com os outros isolados. *E. weberi* foi o único fungo que pôde ser recuperado ao término do experimento, embora esse resultado não tenha sido significativo (H= 6,04, g.l.= 3, p= 0,11) em relação aos outros três isolados inoculados, pois foi encontrado apenas em um fragmento.

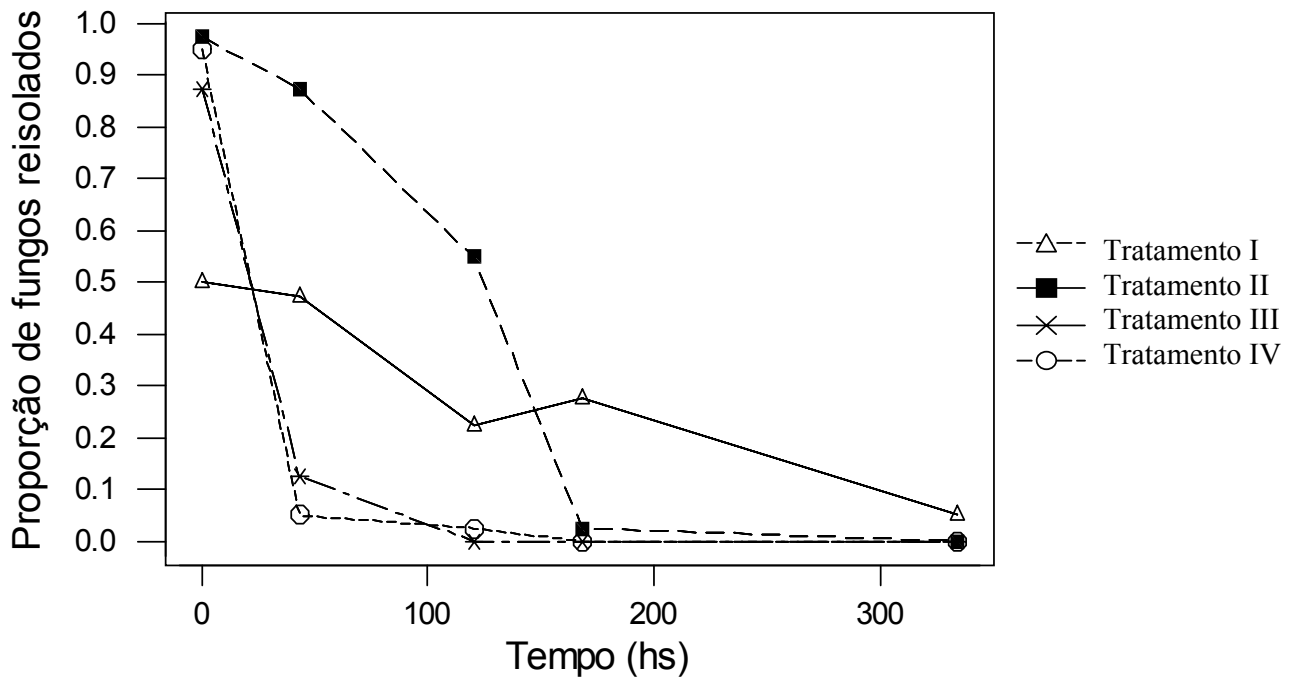


Figura 14. Proporção de fungos recuperados em relação ao tempo (horas) nos fragmentos de esponja fúngica provenientes de colônias artificiais de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas a diferentes tratamentos. Trat. I: suspensão de esporos de *Escovopsis weberi*; Trat. II: suspensão de esporos de *Syncephalastrum racemosum*; Trat. III: suspensão de esporos de *Trichoderma cf. harzianum* e Trat. IV: suspensão de esporos de *Fusarium solani*.

6. DISCUSSÃO

Nos insetos sociais, condições de estresse podem alterar substancialmente as relações entre os indivíduos da sociedade, acarretando diversas consequências. Tais efeitos são ainda mais notáveis quando esses insetos vivem em associação íntima com outro organismo, como por exemplo, o mutualismo entre as formigas cortadeiras e seu fungo simbiote.

Levando-se em consideração a microbiota aliada às colônias das formigas cortadeiras e os resultados obtidos nesta pesquisa, ficou evidente que o equilíbrio existente nessa simbiose pode ser afetado e quando isso ocorre, microrganismos presentes nos ninhos podem se desenvolver de maneira incontrolável. Neste estudo, o desequilíbrio foi alcançado em duas situações diferentes: uma utilizou iscas tóxicas, tanto na condição de campo quanto em laboratório, e na outra, as operárias foram removidas da esponja fúngica de colônias recém-coletadas no campo.

Com a morte contínua de operárias nos ninhos tratados com os inseticidas, houve um enfraquecimento nas atividades de proteção desempenhadas pelas formigas e um aumento visível da umidade no interior dos ninhos, fatores que contribuem para o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis e dentre eles encontram-se os fungos filamentosos.

Aproximadamente metade das espécies de fungos filamentosos isolados foi comum aos dois tratamentos aplicados nos ninhos de laboratório, o que era esperado, pois todos os ninhos foram coletados no mesmo local, na mesma época e mantidos artificialmente sob condições semelhantes.

A alta incidência de *Syncephalastrum racemosum* na esponja revela certa preferência por esse local, apesar de outros autores e o presente estudo terem encontrado esse fungo também no lixo (Fisher et al. 1996).

Alguns dos fungos da ordem Mucorales (Filo Zygomycota) da qual *S. racemosum* faz parte, são saprófitos comumente conhecidos como “fungos do açúcar” (sugar-free fungi), pois possuem um aparato enzimático característico, capaz de utilizar açúcares de estrutura simples como fonte de energia e com isso crescerem e colonizarem o ambiente de forma rápida (seriam os pioneiros na escala da sucessão) (ALEXOPOULOS et al., 1996; TRUFEM, 1998).

Talvez *S. racemosum* prefira a esponja fúngica ao lixo, pelo fato dela conter açúcares de cadeia simples e outros oligossacarídeos facilmente assimiláveis encontrados nesse local, conforme demonstrado por Siqueira et al. (1998) e Silva et al. (2003).

Considerando ainda os tratamentos realizados no laboratório, a maioria dos fungos isolados foi encontrada na esponja, porém, a maior parte das espécies registradas neste local também foi encontrada na câmara de lixo, sugerindo que tais microrganismos sejam removidos da esponja e descartados no lixo, devido aos comportamentos de higiene das operárias. Outros fungos foram observados somente no lixo e um resultado semelhante foi obtido por Craven et al. (1970) e Fisher et al. (1996), que relataram diferentes espécies de leveduras e fungos filamentosos, respectivamente, no lixo, as quais não estavam presentes no jardim de fungos. Esses autores não levantaram hipóteses para os resultados obtidos, muito embora seja possível que esses fungos estivessem presentes no jardim, mas não conseguiram se desenvolver devido a sobreposição de outros microrganismos que aí estavam e que cresceram mais rápido, no momento do isolamento. Por outro lado, é possível que tais fungos foram mais facilmente removidos do jardim em relação aos outros, os quais as operárias poderiam ter um pouco de dificuldade para retirá-los da esponja.

Bot et al. (2001b) consideram o lixo potencialmente danoso para as formigas cortadeiras e seu parceiro, pois pode constituir em um meio de re-infecção e dispersão de doenças na colônia devido a presença de microrganismos patogênicos. De fato, o lixo de *A. sexdens rubropilosa* abriga vários fungos indesejáveis.

A predominância de *Trichoderma cf. harzianum* nos ninhos de campo e de *S. racemosum* nos ninhos de laboratório pode ser explicada pelo fato destes últimos estarem sendo mantidos por um longo período com alimentação controlada (no mínimo cinco meses). Fisher et al. (1996) alimentaram por três meses, com folhas de *Quercus ilex*, e por mais três meses subsequentes, com folhas de *Rosa* sp. um mesmo ninho de *Atta cephalotes* em laboratório e isolaram os fungos presentes na esponja ao final de cada período de alimentação. Foi constatada uma diferença na composição e na quantidade de fungos isolados após a troca da alimentação, mostrando a influência da mesma na composição da microbiota. Além disso, é sabido que o material vegetal continuamente adicionado pelas formigas no topo da esponja fúngica, leva de cinco a seis semanas para chegar à base e daí ser eventualmente descartado no lixo (WEBER, 1972a). Assim, entre a coleta dos ninhos no campo e o início dos experimentos houve tempo suficiente para que os fungos pré-existentes fossem gradativamente substituídos. Por conseqüência, esses argumentos também se aplicam ao fato de poucas espécies em comum serem encontradas entre os dois tratamentos.

Contudo, nesse ambiente, os três fungos (*Escovopsis weberi*, *Fusarium solani* e *Moniliella suaveolens*) encontrados em comum em todos os tratamentos sugerem que alguns microrganismos podem resistir as mudanças de alimentação e até mesmo o contato com inseticidas tóxicos.

Surpreendente e ao mesmo tempo um pouco confuso é discutir sobre a origem de *S. racemosum* nos ninhos laboratório. Este não foi encontrado em ninhos de campo tratado com inseticida e nem em ninhos recém-coletados, como os utilizados no experimento de retirada das formigas. Análises adicionais, incluindo tentativas de isolamentos das folhas de *Eucalyptus* sp. e dos flocos de aveia utilizados para manutenção dos ninhos e também de fragmentos de esponja fúngica de ninhos iniciais saudáveis, não revelaram a ocorrência desse fungo e portanto não foi possível estabelecer a sua origem.

E. weberi, conforme o esperado, também foi isolado dos ninhos. Porém, uma diferença foi notada quanto a este aspecto. Assim, nos ninhos tratados com quaisquer dos inseticidas, seja no campo, seja no laboratório, a proporção observada foi inferior à encontrada por Currie et al. (1999a) e Currie (2001a) os quais isolaram *Escovopsis* sp. em mais de 40% dos ninhos saudáveis de *Atta* sp. coletados na região do Canal do Panamá. Currie et al. (1999a) também encontraram uma proporção muito baixa de

infecção por esse fungo em colônias recém-fundadas e Currie (2001b) também observou que a incidência de *Escovopsis* sp. em colônias de campo é maior quando o ninho está estabelecido com idade entre 1 e 2 anos. Portanto, é possível supor que as colônias utilizadas nos tratamentos com as iscas tóxicas ainda não estivessem contaminadas com *Escovopsis* sp. no estágio de desenvolvimento em que foram coletadas. Entretanto, a frequência de nossos isolamentos foi semelhante aos de Currie et al. (1999a), quando, em ninhos idênticos, as operárias foram privadas do contato com a esponja fúngica. Teria algum componente da isca influenciado nesses resultados, de modo a diminuir o isolamento de *Escovopsis* sp. ? Mais estudos seriam necessários para verificar tal efeito. Essas mesmas considerações também podem ser estendidas para os fungos *A. kiliense* e *M. suaveolens*.

Dessa maneira, *M. suaveolens* foi a espécie mais isolada nos ensaios onde se fez a retirada das operárias e também foi encontrada nos ninhos tratados com as iscas, porém, nesses casos, sua ocorrência foi baixa. Este fato é interessante, pois *M. suaveolens*, não é comum nesses habitats. Este fungo parece ter uma distribuição mais restrita, pois prefere ambientes com baixa atividade de água e também com altos teores de gorduras, como por exemplo, produtos derivados do leite (De HOOG, 1979; De HOOG; GUÉHO, 1984; SAMSON et al., 1995). Nada se sabe sobre a atividade desse microrganismo em ninhos de formigas cultivadoras de fungos, mas Möller (1941) proveu algumas ilustrações e descrições de um fungo, muito semelhante a *M. suaveolens*, que considerou ser uma das fases assexuadas do fungo simbiote. Naquela época, os conceitos sobre teleomorfos e anamorfos não eram consolidados e Möller (1941) acabou descrevendo um contaminante dos ninhos como sendo uma das fases do ciclo de vida do fungo simbiote. Mais pesquisas são necessárias para elucidar se esse fungo realmente possui ou não alguma relação com as formigas.

Com relação aos fragmentos de esponja fúngica mantidos na ausência das operárias, a literatura aponta que os fungos invasores somente se desenvolvem nesses fragmentos após um período de sete a 14 dias, contudo, o presente trabalho relata que esses microrganismos foram capazes de se desenvolverem em um tempo mais curto (dois dias). O experimento realizado utilizou um tipo de “câmara úmida” o que propicia uma alta umidade, essencial para o crescimento dos fungos, por outro lado, outros autores não utilizaram a “câmara úmida”, colocando os fragmentos de esponja fúngica em

recipientes com pouca umidade. Esse experimento revela mais uma vez, o verdadeiro cuidado que as operárias possuem com seus jardins de fungos, pois o controle (presença de operárias) não apresentou o desenvolvimento de fungos durante todo o experimento.

Metarhizium anisopliae var. *anisopliae* foi isolado da esponja fúngica apenas uma vez a partir de um ninho de campo. Embora esse microrganismo tenha se mostrado patogênico para operárias de *Atta sexdens* (ALVES; SOSA GÓMEZ 1983; DIEHL-FLEIG et al. 1988) *in vitro*, o mesmo parece não ocorrer em situações naturais, pois apesar do ninho encontrar-se em processo de degeneração, as operárias remanescentes não demonstravam sinais explícitos de infecção; fato semelhante foi observado por Hughes et al. (2004). Em uma busca por entomopatógenos das formigas cortadeiras no Panamá, esses autores verificaram que em amostras de solo de regiões próximas as colônias continham uma abundância de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, com o qual as operárias das formigas cortadeiras entravam em contato, mas que raramente tornavam-se infectadas. Atribuíram esse fato às defesas individuais e coletivas que as formigas possuem para protegê-las de infecções. Por outro lado, López e Orduz (2003) obtiveram 100% de mortalidade das colônias de *Atta cephalotes* tratadas com iscas contendo esporos de *M. anisopliae*, revelando que em condições naturais esse fungo pode atacar as formigas cortadeiras.

Outra espécie de *Metarhizium* foi observada: *M. flavoviride*, considerada também um entomopatógeno, principalmente para larvas de curculionídeos (GAMS; ROZSYPAL, 1973) que estava crescendo sobre o jardim de um ninho artificial que recebeu aplicação de hidrametilona.

Os fungos encontrados sobre as operárias mortas localizadas no lixo são, basicamente, saprófitos ou patógenos ocasionais, como por exemplo, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, capazes de infectar operárias de *Atta texana* e de *Atta mexicana*, respectivamente (LOFGREN et al. 1975; CARRIÓN et al. 1996). O conhecimento sobre a interação entre esses fungos e as formigas cortadeiras ainda é escasso, de maneira que testes de patogenicidade e pesquisas que procurem determinar a frequência com que podem infectar seus hospedeiros são necessárias.

Acremonium sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Syncephalastrum* sp. e *Trichoderma* sp. são gêneros corriqueiramente encontrados em amostras de solo, bem como *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e outros. Muitos desses fungos foram também

encontrados em ninhos de *Acromyrmex* sp., *A. cephalotes* e *A. sexdens* por vários pesquisadores (MÖLLER, 1941; BASS; CHERRETT, 1994; LUCIANO et al., 1995; FISHER et al., 1996; ORTIZ et al., 1999). Assim, é provável que as formigas entrem em contato com tais fungos e os carreguem para o interior dos formigueiros em sua cutícula e no material vegetal recém-cortado (DIEHL-FLEIG; VALIM-LABRES, 1993; FISHER et al. 1996; CURRIE, 2002). O próprio ambiente onde as câmaras de fungos são construídas também é um fator de risco para o formigueiro, pois é provável que exista uma maior chance desses fungos invasores residentes no solo de contaminarem a colônia.

A própria isca também pode atuar como um vetor de esporos, como observado para *Penicillium citrinum*, isolado de fragmentos de iscas incorporados no jardim de fungos (Tabela 3). Nesse caso, *P. citrinum* se desenvolveu nas iscas e acabou passando para a esponja fúngica. Adicionalmente, organismos associados aos ninhos de formigas cortadeiras, como ácaros e outros artrópodes também auxiliam na transmissão horizontal de esporos (DELLA LUCIA et al., 1993). Por conseguinte, existem muitas portas de entrada para os fungos filamentosos adentrarem nas colônias das formigas cortadeiras.

Uma vez no interior da colônia, alguns desses fungos podem afetar os indivíduos aí presentes (JACCOUD et al. 1999) e no caso das formigas cortadeiras, existe um alvo adicional, a cultura do fungo simbiote. Esta pode ser contaminada por fungos estranhos, sendo necessárias algumas ações por parte da colônia para a retirada ou inibição do crescimento desses invasores passivos.

Assim, para romper com a ordem da colônia e conseqüentemente desestruturá-la, é necessário que os patógenos microbianos contornem os mecanismos de defesa das formigas, de maneira que permaneçam no ninho e ocasionem uma infecção, como é o caso de *Escovopsis* sp. (SCHMID-HEMPEL, 1998; CURRIE; STUART, 2001).

Nossos resultados mostraram que alguns fungos podem atuar como verdadeiros oportunistas e em situações de estresse podem crescer e dominar o microambiente dos ninhos. É importante ressaltar que o estresse deve ser suficiente o bastante para que haja um enfraquecimento das barreiras de defesa impostas pelas formigas, pois, caso contrário os oportunistas continuaram sendo mantidos na forma latente. Por ventura, seria *Escovopsis* sp. o único organismo que conseguiu driblar as barreiras e penetrar na

fortaleza desses insetos sociais ? Na luta pela sobrevivência, nada impede que algum outro microrganismo possa agir de forma semelhante, porém isso não ficou evidente nos nossos resultados com os fungos filamentosos. Currie (2001a) acredita que outros organismos de origem microbiana, ainda desconhecidos, façam parte da associação formiga-fungo e podem atuar como parasitas.

A contaminação proposital dos jardins era uma tentativa de estabelecer se alguns dos fungos isolados teriam um papel especial na simbiose, mas os isolados testados foram removidos das esponjas, pelas operárias, com maior ou menor rapidez, não sendo possível saber sobre a real função desses organismos para associação.

É possível que alguns desses microrganismos possam ser empregados como coadjuvantes em métodos de controle desses insetos, aproveitando a natureza oportunista desses nesse ambiente. Talvez uma contaminação prévia dos ninhos no campo alguns dias antes da aplicação das iscas tóxicas, pudesse maximizar os efeitos destas, com a conseqüente redução da quantidade a ser empregada do princípio ativo. Essa associação químico-microbiológica deveria ser testada. Em caso de sucesso, os benefícios financeiros e ao meio ambiente serão bem-vindos.

7. CONCLUSÕES

- ✓ A aplicação de iscas tóxicas provocou um desequilíbrio na simbiose entre as formigas e o fungo simbiote e como consequência, os ninhos foram colonizados por vários fungos filamentosos diferentes.
- ✓ Grande parte dos fungos isolados nesta pesquisa é encontrada normalmente no ambiente próximo aos ninhos e no substrato vegetal cortado pelas operárias, como por exemplo, *Acremonium kiliense* e *Trichoderma cf. harzianum*.
- ✓ Por se desenvolverem em ninhos sob pressão, esses fungos oportunistas podem ser competidores potenciais do fungo simbiote.
- ✓ Os fungos oportunistas, aparentemente, possuem uma preferência pela esponja fúngica, possivelmente porque aí existam condições favoráveis de crescimento quando comparado com o lixo.
- ✓ As iscas tóxicas utilizadas para o controle dessas formigas também podem ser consideradas vetores de esporos de fungos para o interior dos ninhos.
- ✓ Os fungos isolados com maior frequência, inclusive o *Escovopsis* sp., quando introduzidos nos ninhos na forma exclusiva de suspensão de esporos, não foram capazes de desestabilizar esses ninhos de forma drástica.

- ✓ Pela ação deletéria e rápida, alguns desses fungos talvez possam ser empregados como auxiliares no controle desses insetos em associação com outros métodos, porém esta metodologia terá que ser desenvolvida.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ADAMS, R. M. M.; MUELLER, U. R.; HOLLOWAY, A. K.; GREEN, A. M.; NAROZNIAK, J. Garden sharing and garden stealing in fungus-growing ants. **Naturwissenschaften**, New York, v. 87, n. 11, p. 491-493, 2000.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4th ed. New York: John Wiley & Sons, 1996. 880p.

ALVES, S. B.; SOSA GOMEZ, D. R. Virulência do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. para duas castas de *Atta sexdens rubropilosa* (Forel., 1908). **Poliagro**, Bandeirantes, v. 5, n. 1, p. 1-9, 1983.

AUTUORI, M. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp. – Hymenoptera – Formicidae) I- Evolução do saueiro (*Atta sexdens rubropilosa*, Forel, 1908). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 12, [S.n.], p. 197-228, 1941.

BACCI, M. Jr.; RIBEIRO, S. B.; CASAROTTO, M. E. F.; PAGNOCCA, F. C. Biopolymer-degrading bactéria from nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 28, n. 1, p. 79-82, 1995.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. E. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4th ed. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1998. 218 p.

BASS, M.; CHERRETT, J. M. The role of leaf-cutting ant workers (Hymenoptera: Formicidae) in fungus garden maintenance. **Ecological Entomology**, Oxford, v. 19, n. 3, p. 215-220, 1994.

* Segundo ABNT-NBR 6023:2002

BASS, M.; CHERRETT, J. M. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 1-6, 1995.

BASS, M. The effects of leaf deprivation on leaf-cutting ants and their mutualistic fungus. **Ecological Entomology**, Oxford, v. 22, n. 4, p. 384-389, 1997.

BEATTIE, A. J.; TURNBULL C.; HOUGH T.; JOBSON S.; KNOX R. B. The vulnerability of pollen and fungal spores to ant secretions: Evidence and some evolutionary implications. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 72, n. 4, p. 606-614, 1985.

BEATTIE, A. J.; TURNBULL C.L.; HOUGH T.; KNOX R. B. Antibiotic production: A possible function for the metapleural glands of ants (Hymenoptera: Formicidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham v. 79, n. 3, p. 448-450, 1986.

BOARETTO, M. A. C.; FORTI, L. C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. **Série Técnica IPEF**, Piracicaba, v. 50, n. 11, p. 31-46, 1997.

BORM, S.; BILLEN, J.; BOOMSMA, J. J. The diversity of microorganisms associated with *Acromyrmex* leafcutter ants. **BMC Evolutionary Biology**, Great Britain, v. 2, n. 9, maio, 2002. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2148/2/9>>. Acesso em: 28 maio 2004.

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

BOT, A. N. M.; CURRIE, C. R.; HART, A. G.; BOOMSMA, J. J. Waste management in leaf-cutting ants. **Ethology, Ecology & Evolution**, Florence, v. 13, n. 3, p. 225-237, 2001b.

BOT, A. N. M.; ORTIUS-LECHNER, O.; FINSTER, K.; MAILE, R.; BOOMSMA, J. J. Variable sensitivity of fungi and bacteria to compounds produced by the metapleural glands of leaf-cutting ants. **Insectes Sociaux**, Paris, v. 49, n. 4, p. 363-370, 2002.

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**, Langford Lane, v. 21, n. 5, p. 1815-1820, 1975.

BOURSAURX-EUDE, C.; GROSS, R. New insights into symbiotic associations between ants and bacteria. **Research in Microbiology**, Paris, v. 151, n. 7, p. 513-519, 2000.

BRANDÃO, C. R. F.; MAYHÉ-NUNES, A. J. A new fungus-growing ant genus, *Mycetagroicus* gen. n., with the description of three new species and comments on the monophyly of the Attini (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, Chico, v. 38, n. 3B, p. 639-665, 2002.

BRIDGE, P. D.; WILLIAMS, M. A. J.; PRIOR, C.; PATERSON, R. R. M. Morphological, biochemical and molecular characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 139, n. 6, p. 1163-1169, 1993.

BROUGH, E. J. The antimicrobial activity of the mandibular gland secretion of a formicine ant, *Calomyrmex* sp. (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 42, n. 3, p. 306-311, 1983.

CAMERON, R. S. Potential baits for control of the Texas leaf-cutting ant, *Atta texana* (Hymenoptera: Formicidae). In: VANDEER MEER, R. K.; JAFFE, K.; CEDENO, A. (ed.) **Applied Myrmecology: A world perspective**. Boulder, San Francisco & Oxford: Westview Press, 1990. p. 628-637.

CARREIRO, S. C. et al. Yeasts associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 71, n. 3, p. 243-248, 1997.

CARREIRO, S. C. Pesquisa do fator Killer e análise da degradação de polissacarídeos vegetais por leveduras associadas aos ninhos de *Atta sexdens*. 2000. 153 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2000.

CARREIRO, S. C. et al. Occurrence of Killer yeasts in leaf-cutting ant nests. **Folia Microbiologica**, Praha, v. 47, n. 3, p. 259-262, 2002.

CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI, M. Jr.; LACHANCE, MARC-ANDRÉ; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; RUIVO, C. C. C.; ROSA, C. A. *Sympodiomyces attinorum* sp. nov., a yeast species associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. (in press).

CARRIÓN, G.; QUIROZ L.; VALENZUELA, J. Hongos entomopatógenos de las hormigas arrieras *Atta mexicana* en México. **Revista Mexicana de Micología**, México, v. 12, p. 41-48, 1996.

CHAPELA, I. H. et al. Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. **Science**, Washington, v. 266, n. 5191, p. 1691-1694, 1994.

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

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, 1999a.

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

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

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

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

CURRIE, C. R. Ants, agriculture and antibiotics: A quadripartite symbiosis. In: SECKBACH, J. (ed.) **Symbiosis: mechanisms and model systems**. Dordrecht, Boston & London: Kluwer Academic Publisher, 2002. 796p.

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

CURRIE, C. R.; SCOTT, J. A.; SUMMERBELL, R. C.; MALLOCH, D. Corrigendum: Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, London, v. 423, n. 6938, p. 461, 2003b.

CURRIE, C. R.; BOT, A. N. M.; BOOMSMA, J. J. Experimental evidence of a tripartite mutualism: bacteria protect ant fungus gardens from specialized parasites. **Oikos**, Copenhagen, v. 101, n. 1, p. 91-102, 2003c.

DELLA LUCIA, T. M. C.; CAMERON, R. S.; VILELA, E. F.; BENTO, J. M. S. Aceitação de iscas granuladas com sulfluramida. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 16, n. 2, p. 218-223, 1992.

DELLA LUCIA, T. M. C.; FOWLER, H. G. As formigas cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. **As formigas cortadeiras**. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 1993. p. 1-3.

DELLA LUCIA, T. M. C.; FOWLER, H. G.; MOREIRA, D. D. O. Espécies de formigas cortadeiras no Brasil. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (org.) **As formigas cortadeiras**. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 1993. p. 26-31.

DELLA LUCIA, T. M. C.; MOREIRA, D. D. O.; OLIVEIRA, M. A. Inimigos naturais e organismos associados aos ninhos. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (org.) **As formigas cortadeiras**. Viçosa: Editora folha de Viçosa, 1993. p. 131-150.

DELLA LUCIA, T. M. C.; VILELA, E. F. Métodos atuais de controle e perspectivas. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (org.) **As formigas cortadeiras**. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 1993. p. 163-190.

De HOOG, G. S. Taxonomic review of *Moniliella*, *Trichosporonoides* and *Hyalodendron*. **Studies in Mycology**, Baarn, n. 19, p. 1-37, 1979.

De HOOG, G. S.; GUÉHO, E. Deoxyribonucleic acid base composition and taxonomy of *Moniliella* and allied genera. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 50, n. 2, p. 135-141, 1984.

DIEHL-FLEIG, E. Controle biológico por fungos entomopatogênicos. In: PACHECO, P.; BERTI-FILHO, E. (eds.) **Formigas cortadeiras e o seu controle**. Piracicaba: IPEFC/GTFC, 1987. 152p.

DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M. E.; PACHECO, M. R. M. Testes de patogenicidade dos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em *Atta sexdens piriventris* (Santschi, 1919) em diferentes temperaturas. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 40, n. 11, p. 1103-1105, 1988.

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

DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M. E. Development of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. in culture containing *Hovenia dulcis* extract. **Acta Biologica Leopoldensia**, São Leopoldo, v. 14, n. 2, p. 15-22, 1992.

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

DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M. E.; SPECHT, A.; VALIM-LABRES, M. E. Efficiency of *Beauveria bassiana* for *Acromyrmex* spp. control (Hymenoptera: Formicidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 22, n. 2, p. 281-285, 1993.

DIEHL-FLEIG, E.; VALIM-LABRES, M. E. Fungi isolated from leaf-cutting ants *Atta sexdens piriventris* and *Acromyrmex heyeri* (Hymenoptera: Formicidae): *Mucor* spp. effects on *Beauveria bassiana* entomopathogen. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 45, n. 2, p. 142-144, 1993.

DIEHL-FLEIG, E.; VALIM-LABRES, M. E. Fungi isolated from leaf-cutting ant *Atta sexdens piriventris* and *Acromyrmex heyeri* (Hymenoptera: Formicidae): *Mucor* ssp. Effects on *Beauveria bassiana* entomopathogen. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.45, n. 2, p. 142-144, 1993.

DIEHL, E.; JUNQUEIRA, L. K. Seasonal variations of metapleural secretion in the leaf-cutting ant *Atta sexdens piriventris* Santschi (Myrmicinae: Attini), and lack of fungicide effect on *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 4, p. 517-522, 2001.

DINIZ, J. L. M.; BRANDÃO, C. R.; YAMAMOTO, C. I. Biology of *Blepharidatta* ants, the sister group of the Attini: a possible origin of fungus-ant symbiosis. **Naturwissenschaften**, New York, v. 85, n. 6, p. 270-274, 1998.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press, 1980. 2v.

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

ELLIS, M. B. **More Dematiaceous Hyphomycetes**. Kew: Commonwealth Micological Institute, 1976. 507 p.

FISHER, P. J.; STRADLING, D. J.; PEGLER, D. N. *Leucoagaricus* basidiomata from a live nest of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 98, n. 8, p. 884-888, 1994a.

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

FISHER, P. J. et al. Microfungi in the fungus gardens of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*: a preliminary study. **Mycological Research**, Cambridge, v. 100, n. 5, p. 541-546, 1996.

FORTI, L. C.; NAGAMOTO, N. S.; PRETTO, D. R. Controle de formigas cortadeiras com isca granulada. In: SIMPÓSIO SOBRE FORMIGAS CORTADEIRAS DOS PAÍSES DO MERCOSUL, 1998, Piracicaba, Anais do simpósio sobre formigas cortadeiras dos países do mercosul, Piracicaba: FEALQ, 1998, p. 113-132.

FOWLER, H. G. et al. Major ant problems of South America. In: VANDEER MEER, R. K.; JAFFE, K.; CEDENO, A. (ed.) **Applied Myrmecology: A world perspective**. Boulder, San Francisco & Oxford: Westview Press, 1990. p. 3-14.

GAMS, W. et al. **CBS-Course of Mycology**. 4th ed., Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1998. 165 p.

GAMS, W.; ROZSYPAL, J. *Metharizium flavoviride* n. sp. isolated from insects and from soil. **Acta Botanica Neerlandica**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 518-521, 1973.

GODOY, M. F. P. Atividade de extratos vegetais e seus derivados sobre o crescimento do fungo simbionte de *Atta sexdens* L. e outros microrganismos. 2003. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2003.

GREEN, A. M.; MUELLER, U. G.; ADAMS, R. M. M. Extensive exchange of fungal cultivars between sympatric species of fungus-growing ants. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 191-195, 2002.

HART, A. G.; BOT, A. N. M.; BROWN, M. J. F. A colony-level response to disease control in leaf-cutting ant. **Naturwissenschaften**, New York, v. 89, n. 6, p. 275-277, 2002.

HART, A. G.; RATNIEKS, F. L. W. Waste management in the leaf-cutting ant *Atta colombica*. **Behavioral Ecology**, Cary, v. 13, n. 2, p. 224-231, 2002.

HAWKSWORTH, D. L. et al. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi**. 8th ed. Wallingford: CAB International, 1995. 616 p.

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

HERVEY, A.; ROGERSON, C. T.; LEONG, I. Studies on fungi cultivated by ants. **Brittonia**, Bronx, v. 29, n. 2, 266-236, 1977.

HINKLE, G.; WETTERER, J. K.; SCHULTZ, T. R.; SOGIN, M. L. Phylogeny of the attine ant fungi based on analysis of small subunit ribosomal RNA gene sequences. **Science**, Washinton, v. 266, n. 5191, p. 1695-1697, 1994.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants**. Cambridge: The Belknap Press, Harvard University Press, 1990. 737 p.

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

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

INGLIS, G. D.; KAWCHUK, L. M. Comparative degradation of oomycete, ascomycete, and basidiomycete cell walls by mycoparasitic and biocontrol fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, n. 1, p. 60-70, 2002.

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

JACOB, L. Seleção de ingredientes ativos para o controle de formigas urbanas. 2002. 146 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2002.

KERMARREC, A.; FEBVAY, G.; DECHARME, M. Protection of leaf-cutting ants from biohazards: Is there a future for microbiological control? In: LOFGREN, C.; VANDER MEER, R. K. (ed.) **Fire ants leaf-cutting ants biology and management**. Boulder: Westview Press, 1986. p.339-356.

KIYAN, C.; CORSO, C. R.; PAGANO, S. N.; TAUKE, S. M.; ANGELIS, D. F.; SERZEDELLO, A. Isolamento de microorganismos de ninhos de formigas cortadeiras. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 564, 1969.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs**. North Ryde: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, 1988. 116 p.

KREISEL, H. Pilze aus pilzgärten von *Atta insularis* in Kuba. **Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie**, Berlin, v. 12, n. 8, p. 643-654, 1972.

LINK, D. Eficácia de sulfloramida-isca granulada, no combate à formiga vermelha de monte, *Acromyrmex heyeri*. In: INTERNATIONAL PEST ANT SYMPOSIUM, 6.; ENCONTRO DE MIRMECOLOGIA, 13., 1997, Ilhéus, Anais do VI International Pest Ant Symposium & XIII Encontro de Mirmecologia, Ilhéus: UESC, 1997. p. 153.

LITTLEDYKE, M.; CHERRETT, J. M. Direct ingestion of plant sap from cut leaves by the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Formicidae, Attini). **Bulletin of Entomological Research**, Oxon, v. 66, n. 2, p. 205-217, 1976.

LITTLE, A. E. F.; MURAKAMI, T.; MUELLER, U. G.; CURRIE, C. R. The infrabuccal pellet piles of fungus-growing ants. **Naturwissenschaften**, New York, v. 90, n. 12, p. 558-562, 2003.

LOECK, A. E.; GUSMÃO, L. G. Controle de *Acromyrmex heyeri* Forel, 1899 e *Acromyrmex ambiguus* Emery, 1887 (Hymenoptera: Formicidae) com fluramim na localidade de Pelotas, RS. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 4, n. 1, p. 59-63, 1998.

LOFGREN, C. S.; BANKS, W. A.; GLANCEY, B. M. Biology and control of imported fire ants. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 20, p. 1-30, 1975.

LÓPEZ, E.; ROMERO, M.; ORTIZ, A.; ORDUZ, S. Primer registro de *Metarhizium anisopliae* infectando reinas de *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae) en Colombia. **Revista Colombiana de Entomología**, Santafe De Bogota, v. 25, nos. 1-2, p. 49-56, 1999.

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

LUCIANO, H. M.; DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M. E. Organismos associados a uma colônia de *Acromyrmex heyeri* (Hymenoptera: Formicidae) mantida em laboratório. **Acta Biologica Leopoldensia**, São Leopoldo, v. 17, n. 2, p. 47-56, 1995.

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

MALLOCH, D. **Moulds: Their isolation, cultivation and identification**. Toronto: University of Toronto Press, 1981. 97p.

MARSARO, A. L. Jr.; DELLA LUCIA, T. M. C.; BARBOSA, L. C. A.; MAFIA, L. A.; MORANDI, M. A. B. Efeito de secreções da glândula mandibular de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) sobre a germinação de conídios de *Botrytis cinerea* Pres. Fr. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 403-406, 2001.

MARTIN, M. M. BOYD, N. D.; GIESELMANN, M. J.; SILVER, R. G. Activity of faecal fluid of a leaf-cutting ant toward plant cell wall polysaccharides. **Journal of Insect Physiology**, Langford Lane, v.21, n. 12, p. 1887-1892, 1975.

MASHWITZ, U.; KOOB, K.; SCHILDKNECHT, H. Ein beitrage zur funktion der metathoracaldrüse der ameisen. **Journal of Insect Physiology**, Langford Lane, v. 16, n. 2, p. 387-404, 1970.

MENDONÇA, N. T.; NETO, A. M.; MENDONÇA, R. S. Biologia e testes experimentais com novos formicidas para o controle de formigas dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*. In: PACHECO, P.; BERTI-FILHO, E. (eds.) **Formigas cortadeiras e o seu controle**. Piracicaba: IPEFC/GTFC, 1987. 152p.

MIDDELHOVEN, W. J.; FONSECA, A.; CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C. *Cryptococcus haglerorum*, sp. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast isolated from nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 83, n. 2, p. 167-174, 2003.

MINITAB STATISTICAL SOFTWARE: MINITAB Release 13.20. State College: Minitab Inc., 2000.

MISRA, P. C. A new species of *Syncephalastrum*. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 3, n. 1, p. 51-54, 1975.

MÖLLER, A. **As hortas de fungo de algumas formigas sul-americanas**. Trad. de A. P. Viégas e E. M. Zink. Rio de Janeiro: [s. n.], 1941. 120 p. Tradução de: Die Pilzgaerten Einiger Suedamerikanischer Ameisen. Publicado na Revista de Entomologia, supl. n. 1.

MUCHOVEJ, J. J.; DELLA LUCIA, T. M. C. *Escovopsis*, a new genus from leaf cutting ant nests to replace *Phialocladus* nomem invalidum. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 37, p. 191-195, 1990.

MUCHOVEJ, J. J.; DELLA LUCIA, T. M. C.; MUCHOVEJ, R. M. C. *Leucoagaricus weberi* sp. nov. from a live nest of leaf-cutting ants. **Mycological Research**, Cambridge, v. 95, n. 11, p. 1308-1311, 1991.

MUELLER, U. G.; LIPARI, S. E.; MILGROOM, M. G. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) fingerprinting of symbiotic fungi cultured by the fungus-growing ant *Cyphomyrmex minutus*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 119-122, 1996.

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

MUELLER, U. G. et al. The origin of the attine ant-fungus mutualism. **The Quaterly Review of Biology**, Chicago, v. 76, n. 2, p.169-197, 2001.

MUELLER, U. G. Ant versus fungus versus mutualism: ant-cultivar conflict and the deconstruction of the attine ant-fungus symbiosis. **American Naturalist**, Chicago, v. 160, suppl., p. S67-98, 2002.

MUELLER, U. G.; GERARDO, N. Fungus-farming insects: Multiple origins and diverse evolutionary histories. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 24, p. 15247-15249, 2002.

NASCIMENTO, R. R.; SCHOETERS, E.; MORGAN, E. D.; BILLEN, J. STRADLING, D. J. Chemistry of metapleural gland secretions of three attine ants, *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta cephalotes*, and *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 22, n. 5, p. 987-1000, 1996.

NELSON, P. E., TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. O. ***Fusarium species: an illustrated manual for identification***. University Park: Pennsylvania State University Press, 1983. 193 p.

NORTH, R. D.; JACKSON, C. W.; HOWSE, P. E. Evolutionary aspects of ant-fungus interactions in leaf-cutting ants. **Trends in Ecology & Evolution**, Langford Lane, v. 12, n. 10, p. 386-389, 1997.

OI, D. H.; PEREIRA, R. M. Ant behavior and microbial pathogens (Hymenoptera: Formicidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v.76, n. 1, p. 63-74, 1993.

ORTIUS-LECHNER, D. et al. The metapleural gland secretion of the leafcutter ant *Acromyrmex octospinosus*: new compounds and their functional significance. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 26, n. 7, p. 1667-1683, 2000.

ORTIZ, A.; MADRIGAL, A.; ORDUZ, S. Evaluación del comportamiento de las hormigas *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae) frente a la contaminación del jardín del hongo con *Trichoderma lignorum*. **Revista Colombiana de Entomología**, Santa Fe De Bogota, v. 25, nos 3-4, p. 169-177, 1999.

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

PAGNOCCA, F. C.; SILVA, O. A.; HEBLING-BERALDO, M. J.; BUENO, O. C.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. Toxicity of sesame extracts to the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. **Bulletin of Entomological Research**, Oxon, v. 80, n. 3, p. 349-352, 1990.

PAGNOCCA, F. C. et al. Microbiological changes in the nests of leaf-cutting ants fed on sesame leaves. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 120, n. 5, p. 317-320, 1996.

PAGNOCCA, F. C. Microbiota associada aos ninhos de formigas cortadeiras. In: INTERNATIONAL PEST ANT SYMPOSIUM, 6.; ENCONTRO DE MIRMECOLOGIA, 13., 1997, Ilhéus, Anais do VI International Pest Ant Symposium & XIII Encontro de Mirmecologia, Ilhéus: UESC, 1997. p. 24-26.

PAGNOCCA, F. C. et al. RAPD analysis of the sexual state and sterile mycelium of the fungus cultivated by the leaf-cutting ant *Acromyrmex hispidus fallax*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, n. 2, p. 173-176, 2001.

PAPA, P. J.; PAPA, F. Inhibition des bactéries dans les nids d'*Acromyrmex octospinosus* Reich. **Bulletin De La Société De Pathologie Exotique**, Paris, v. 75, n. 4, p. 415-425, 1982.

PINHATI-SILVA, A. C. O.; BACCI, M. Jr.; MARTINS, V.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A. Molecular systematic study of *Xylaria* sp. isolated from ant nest. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 31, 2002, Caxambu, Programa e Resumos da XXXI Reunião Anual. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular 2002, 257 p.

POULSEN, M.; BOT, A. N. M.; CURRIE, C. R.; BOOMSMA, J. J. Mutualistic bacteria and a possible trade-off between alternative defence mechanisms in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. **Insectes Sociaux**, Paris, v. 49, n. 1, p. 15-19, 2002a.

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 leaf-cutting ants. **Behavioral Ecology & Sociobiology**, New York, v. 52, n. 2, p. 151-157, 2002b.

POULSEN, M.; BOT, A. N. M.; CURRIE, C. R.; NIELSEN, M. G.; BOOMSMA, J. J. Within-colony transmission and the cost of a mutualistic bacterium in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. **Functional Ecology**, Oxford, v. 17, n. 2, p. 260-269, 2003a.

POULSEN, M.; BOT, A. N. M.; BOOMSMA, J. J. The effect of metapleural gland secretion on the growth of a mutualistic bacterium on the cuticle of leaf-cutting ants. **Naturwissenschaften**, New York, v. 90, n. 9, p. 406-409, 2003b.

PRECETTI, A. A. C. M. et al. Perdas de produção em cana-deaçúcar, causadas pela saúva-mata-pasto, *Atta bisphaerica*. Parte I. **Boletim Técnico Cooperucar**, São Paulo, v. 42, p. 25-30, 1988.

PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species.** 2nd ed. North Ryde: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, 1988. 184 p.

QUINLAN, R. J.; CHERRETT, J. M. The role of substrate preparation in the symbiosis between the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) and its food fungus. **Ecological Entomology**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 161-170, 1977.

QUINLAN, R. J.; CHERRETT, J. M. Aspects of the symbiosis of the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) and its food fungus. **Ecological Entomology**, Oxford, v. 3, n. 3, p. 221-230, 1978a.

QUINLAN, R. J.; CHERRETT, J. M. Studies on the role of the infrabuccal pocket of the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hym., Formicidae). **Insectes Sociaux**, Paris, v. 25, n. 3, p. 237-245, 1978b.

QUINLAN, R. J.; CHERRETT, J. M. The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.). **Ecological Entomology**, Oxford, v. 4, n. 2, p. 151-160, 1979.

RIFAI, M. A. A revision of the genus *Trichoderma*. **Mycological Papers**, Great Britain, n. 116, p. 1-56, 1965.

ROMERO, D.; CHACÓN, S.; GUZMÁN, G. Estudio y aislamiento del hongo que cultivan las hormigas arrieras del genero *Atta* en Mexico. **Revista Mexicana de Micologia**, México, v. 3, p. 231-248, 1987.

SAMSON, R. A. Revision of the genus *Cunninghamella* (Fungi, Mucorales). **Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie Van Wetenschappen Series C-Biological and Medical Sciences**, Amsterdam, v. 72, n. 3, p. 322-335, 1969.

SAMSON, R. A. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. **Studies in Mycology**, Baarn, n. 6, p. 1-119, 1974.

SAMSON, R. A. et al. **Introduction to food-airborne fungi.** 6th ed., Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000. 389 p.

SCHILDKNECHT, H.; KOOB, K. Plant bioregulators in the metathoracic glands of myrmicine ants. **Angewandte Chemie-International Edition**, Berlin, v. 9, n. 2, p. 173, 1970.

SCHILDKNECHT, H.; KOOB, K. Myrmicacin, the first insect herbicide. **Angewandte Chemie-International Edition**, Berlin, v. 10, n. 2, p. 124-125, 1971.

SCHIPPER, M. A. A. On certain species of *Mucor* with a key to all accepted species. **Studies in Mycology**, Baarn n. 17, p. 1-53, 1978.

SCHIPPER, M. A. A.; STALPERS, J. A. Spore ornamentation and species concept in *Syncephalastrum*. **Persoonia**, Leiden, v. 12, n. 1, p. 81-85, 1983.

SCHIPPER, M. A. A. A revision of the genus *Rhizopus*. I. The *Rhizopus stolonifer*-group and *Rhizopus oryzae*. **Studies in Mycology**, Baarn, n. 25, p. 1-34, 1984.

SCHMID-HEMPEL, P. **Parasites in social insects**. New Jersey: Princeton University Press, 1998. 409 p.

SCHULTZ, T. R.; Ants, plants and antibiotics. **Nature**, London, v. 398, n. 6730, p. 747-748, 1999.

SCHULTZ, T. R.; MEIER, R. A phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. **Systematic Entomology**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 337-370, 1995.

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

SIHANONTH, P.; MICHAELS, G. E.; DIX, M. W. Selective inhibition of fungi in the attine ant fungus gardens. In: ANNUAL MEETING AMERICAN SOCIETY OF MICROBIOLOGY, 1973, [S.L.], Abstracts of Annual Meeting American Society of Microbiology, [S.L.], 1973. p.139.

SILVA, A. Participação do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* na produção de enzimas intestinais da formiga *Atta sexdens*. 2000. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2000.

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

SILVA, M. E.; DIEHL-FLEIG, E. Avaliação de diferentes linhagens de fungos entomopatogênicos para controle da formiga *Atta sexdens piriventris* (Santschi, 1919) (Hymenoptera: Formicidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 17, n. 2, p. 263-269, 1988.

SILVA, G. E.; MACHADO, V.; DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M. E.; SPECHT, A. Potencial de *Beauveria bassiana* como agente de controle das formigas cortadeiras em áreas de reflorestamento. **Acta Biologica Leopoldensia**, São Leopoldo, v. 15, n. 1, p. 87-94, 1993.

SINGER, R. **The Agaricales in modern taxonomy**. 4th ed. Koeltz Scientific Books: Germany, 1986. 981 p.

SIQUEIRA, C. G. et al. Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 12, p. 4820-4822, 1998.

SMITH, S.; ONIONS, A. H. S. **The preservation and maintenance of living fungi**. Slough: Commonwealth Mycological Institute, 1983.

SPECHT, A.; DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M. E. Atratividade de iscas de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. a formigas do gênero *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). **Anais da sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 99-104, 1994.

SPEGAZZINI, C. Descripción de hongos mirmecófilos. **Revista del Museo de La Plata**, La Plata, v. 26, p. 166-174, 1921.

STAHEL, G.; GEIJSKES, D. C. Weitere untersuchungen über nestbau und gartenpilz von *Atta cephalotes* L. und *Atta sexdens* L. (Hym. Formicidae). **Revista de Entomologia**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 1-2, p. 243-269, 1941.

TAUK, S. M.; SERZEDELLO, A. Isolation of bacteria living in gardens of *Atta laevigata*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 2, p. 295-300, 1975.

TRUFEM, S. F. B. Taxonomia de zigomicetos. In: BONONI, V. L. R. (org.) **Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas**. São Paulo: Instituto de Botânica, 1998. 181 p.

TULLOCH, M. The genus *Metarhizium*. **Transections of British Mycological Society**, v. 66, n. 3, p. 407-411, 1976.

VAN OORSCHOT, C. A. N. A revision of *Chrysosporium* and allied genera. **Studies in Mycology**, Baarn, n. 20, p. 1-88, 1980.

VAN OORSCHOT, C. A. N. Taxonomy of the *Dactylaria* complex, V. A review of *Athrobotrys* and allied genera. **Studies in Mycology**, Baarn, n. 26, p. 61-96, 1985.

VIEIRA, P. C. et al. da A utilização de plantas inseticidas no controle das saúvas. In: INTERNATIONAL PEST ANT SYMPOSIUM, 6.; ENCONTRO DE MIRMECOLOGIA, 13., 1997, Ilhéus, Anais do VI International Pest Ant Symposium & XIII Encontro de Mirmecologia, Ilhéus: UESC, 1997. p. 121-123.

WEBER, N. A. Pure cultures of fungi produced by ants. **Science**, Washington, v. 121, n. 3134, p. 109, 1955.

WEBER, N. A. Weeding as a factor in fungus culture by ants. **Anatomical Record**, New York, v. 28, n. 3, p. 638-639, 1957.

WEBER, N. A. Evolution in fungus-growing ants. **Proceeding Tenth International Congress of Entomology**, [S.L.], v. 2, p. 459-473, 1958.

WEBER, N. A. Fungus-growing ants. **Science**, Washington, v. 153, n. 3763, p. 587-604, 1966.

WEBER, N. A. Fungus culturing by ants. In: BATRA, L. R. **Insect-fungus symbiosis, mutualism and comensalism**. New York: John Willey & Sons, 1979. p. 77-116.

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

WEBER, N. A. The Attines. The fungus-culturing ants. **American Scientist**, New Haven, v. 60, n. 4, p. 448-456, 1972b.

WEBER, N. A. Fungus Ants. In: HERMANN, H. R. **Social Insects**. New York: Academic Press, v.4, 1982. p. 225-363.

WETTERER, J. K.; SCHULTZ, T. R.; MEIER, R. Phylogeny of fungus-growing ants (Tribe Attini) based on mtDNA sequence and morphology. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 9, n. 1, p. 42-47, 1998.

WILSON, E. O. **The insect societies**. 4th ed. Cambridge: Belknap Press, 1976. 548 p.

ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J. C.; SOUZA-SILVA, A.; ABREU, L. G. Eficiência de isca formicida aplicada sobre o monte de terra solta de ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 27, n.3, p. 407-410, 2003a.

ZANETTI, R.; ZANUNCIO, J. C.; MAYHÉ-NUNES, A. J.; MEDEIROS, A. G. B.; SOUZA-SILVA, A. Combate sistemático de formigas-cortadeiras com iscas granuladas, em eucaliptais com cultivo mínimo. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 27, n. 3, p. 387-392, 2003b.

ZANUNCIO, J. C.; COUTO, L.; SANTOS, G. P.; ZANUNCIO, T. V. Eficiência da isca granulada Mirex-S, à base de sulfluramid, no controle da formiga cortadeira *Atta laevigata* (F. Smith, 1858) (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 16, n.3, p. 357-361, 1992.

ZANUNCIO, J. C.; LARANJEIRO, A. J.; DeSOUZA, O. Controle de *Acromyrmex subterraneus molestans* Santschi (Hymenoptera: Formicidae) com sulfluramida. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 25, n. 3, p. 383-388, 1996.

ZANUNCIO, J. C.; SANTOS, G. P.; FIRME, D. L.; ZANUNCIO, T. V. Uso da isca granulada com sulfluramida 0,3% no controle de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae). **Revista Cerne**, Lavras, v. 3, n. 1, p. 161-169 1997.