
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARIANA DE OLIVEIRA BARCOTO

PATOGENICIDADE DE *SYNCEPHALASTRUM RACEMOSUM*
NOS JARDINS DE FORMIGAS CORTADEIRAS



Rio Claro
2015

MARIANA DE OLIVEIRA BARCOTO

PATOGENICIDADE DE *SYNCEPHALASTRUM RACEMOSUM* NOS
JARDINS DE FORMIGAS CORTADEIRAS

Orientador: Prof. Dr. André Rodrigues

Co-orientador: Prof. Dr. Odair Correa Bueno

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

Rio Claro
2015

589.2 Barcoto, Mariana de Oliveira
B244p Patogenicidade de *Syncephalastrum racemosum* nos
jardins de formigas cortadeiras / Mariana de Oliveira Barcoto.
- Rio Claro, 2015
87 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Rio Claro

Orientador: André Rodrigues

Coorientador: Odair Correa Bueno

1. Fungos. 2. Controle biológico. 3. *Atta sexdens*
rubropilosa. 4. Subcolônias. I. Título.

*Dedico esse trabalho aos meus pais, pelo
apoio psicológico, afetivo, moral e
financeiro, e, principalmente, por me
ensinarem a lidar com a perda e a
suportar a saudade.*

AGRADECIMENTOS

"Foi uma longa estrada a seguir; estive lá e parti ao amanhecer, sem dizer adeus ao dia anterior. As memórias que carrego ainda são válidas? Ou as lágrimas as confundiram? Talvez amanhã a essa hora, a chuva pare de cair e a névoa desapareça mais uma vez. Algo, em algum lugar, continua me chamando. Estou indo para casa? Há alguém além desses pés feridos? A estrada ainda continua a me chamar para seguir em frente" (Gravity - Yoko Kanno e Maaya Sakamoto).

Depois de tantos passos, quem termina essa jornada é completamente diferente da pessoa que a iniciou. Por quatro aprendemos que somos frutos de nossas leituras e críticas, e que somente questionando e formulando hipóteses a ciência pode ser desenvolvida. E também nos transformamos pessoalmente, embora essa percepção seja muito sutil. Esse percurso foi solitário na maior parte do tempo, entretanto, o contato com diversas pessoas o modificaram completamente. Assim, por causa dessas pessoas, cheguei a um ponto que não havia imaginado (ou não havia planejado), aprendi coisas que me surpreenderam e passei a analisar tudo de uma forma diferente. Gostaria de agradecer a essas pessoas, que alteraram meus pontos de vista e me levaram a questionar meus conceitos, teorias, filosofias e ideais.

À minha família, agradeço por ensinar que só podemos crescer quando temos raízes firmes e profundas, e que somente o trabalho e a dedicação permitem que os objetivos sejam alcançados. À minha mãe, Maria, agradeço pelas toneladas de coisas que já me ensinou sobre moral e caráter, e por ter dado o exemplo de ler o máximo possível. Também agradeço pelas (muitas) horas de conversa, por ouvir todos os problemas e triunfos, por rir e chorar junto, por compreender minha ausência e por me impulsionar sempre. Ao meu pai, José, agradeço por me ensinar que o valor daquilo que alcançamos é relativo ao nosso esforço. Também agradeço pela preocupação, pelas palavras na hora certa, por me socorrer sempre que foi necessário, e por deixar claro que estávamos próximos, independente da distância. Aos meus pais também agradeço pelo apoio afetivo, psicológico e financeiro. Ao meu irmão, Giovani, por me levar a lançar um novo olhar sobre as coisas, e principalmente, por me fazer questionar diversos dos meus conceitos e métodos.

Por me mostrarem como os fatos cotidianos podem ser valiosos e como podemos aprender com os caminhos que percorremos, além de todo o incentivo, preocupação, carinho, base moral e pelas conversas e risadas durante o café, agradeço aos meus avós Maria e Antônio, Ana (*in memoriam*) e João. Também às minhas tias Cléo, Vera e Sueli, meu tio

Antônio, e aos primos/amigos de infância Luana e Guilherme. Apesar da distância, saber que essas pessoas estariam à minha espera tornou o caminho menos árduo.

Ao meu namorado, Matheus, agradeço pela parceria, amizade e paciência; por compreender os períodos de ausência e a importância de tudo o que aprendi até agora, por saber lidar com as minhas complicações e manias, assim como pelas boas risadas, conversas e teorias (às vezes insanas...). Acima de tudo, agradeço por estar ao meu lado em todos os momentos, e me ajudar a suportar todas as dificuldades ao longo desses anos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Rodrigues, agradeço pela oportunidade de trabalhar no LESF, assim como pela atenção, confiança e preocupação com o desenvolvimento do trabalho. Também agradeço por todos os ensinamentos e por compreender meus pontos de vista e interpretações (nem sempre tão usuais). Além disso, agradeço pelas conversas a respeito do desenvolvimento da ciência, que me auxiliaram a elaborar uma visão mais crítica sobre os experimentos desenvolvidos.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Odair Correa Bueno, pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Formigas Cortadeiras e por disponibilizar as colônias que foram utilizadas no desenvolvimento desse trabalho. Também agradeço pela atenção, confiança, e pelos ensinamentos e dúvidas sanadas.

Ao Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca, agradeço pelo primeiro contato com a Microbiologia, e por disponibilizar o Laboratório de Microbiologia durante as primeiras etapas de desenvolvimento do trabalho.

Agradeço a todo o pessoal do LESF (e aos que já fizeram parte da equipe), Ana Maria, Tássio, Bianca, Júlio, Jaqueline, Rafael, Bárbara, Renata, Isabela, Cecília, Lucas, Sadala, pelo apoio no desenvolvimento desse estudo. Agradeço em especial ao Danilo e ao Quimi, por todos os conselhos, ensinamentos e, principalmente, por ajudarem a enxergar as várias formas de uma mesma situação.

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Formigas Cortadeiras, Marcela Ceccato, Ita, Thaís, Natalia Lorenzon e Mayara, por tudo o que me ensinaram a respeito da manutenção dos ninhos e desenvolvimento de bioensaios, pelas conversas, conselhos, atenção e todo o apoio dedicado, que foram essenciais em todas as etapas desse trabalho.

Aos amigos encontrados durante a graduação, Gabriela, Daiane, Maria Carolina, Ana Maria e Eric, agradeço por todas as conversas, conquistas e angústias compartilhadas (e claro, pelos inúmeros trabalhos que fizemos juntos).

Agradeço também ao Departamento de Bioquímica e Microbiologia, e ao Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), pelo suporte técnico concedido para o desenvolvimento desse trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), agradeço pela concessão da bolsa de iniciação científica e pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento desse trabalho.

"Três dedos seguram a pena, mas o corpo inteiro trabalha. E dói".

(Umberto Eco - O nome da rosa)

RESUMO

O fungo filamentoso *Syncephalastrum racemosum* apresenta um rápido crescimento e produção de grande quantidade de esporos. Quando esporos desse fungo são aplicados na superfície do jardim de fungo das formigas cortadeiras, as operárias removem fragmentos infectados desse substrato (*weeding*), na tentativa de evitar sua dispersão no ninho. Nesse trabalho, testamos e confirmamos os postulados de Koch para *S. racemosum*, indicando a patogenicidade de linhagens desse fungo. A fim de determinar se *S. racemosum* atuaria como um patógeno oportunista, subcolônias de *Atta sexdens rubropilosa* foram infectadas simultaneamente com esporos de *S. racemosum* e esporos do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. Adicionalmente, foram observados os efeitos destes fungos quando aplicados isoladamente nas subcolônias. As subcolônias coinfetadas e subcolônias tratadas somente com *S. racemosum* apresentaram alterações semelhantes no corte de folhas, mortalidade de operárias, condições gerais da subcolônia e separação de lixo, e foram consideradas mortas entre sete e nove dias (subcolônias coinfetadas) e entre 10 e 13 dias em subcolônias tratadas com esporos de *S. racemosum*. Assim, a infecção causada por *S. racemosum* não requer o comprometimento das defesas da colônia (morte das operárias, por exemplo), sugerindo que tal micro-organismo seja um patógeno para o jardim de fungo e não simplesmente um oportunista. Estas informações enfatizam o potencial de *S. racemosum* como agente de controle biológico das formigas cortadeiras, já que esse fungo foi considerado agressivo nos jardins de fungo desses insetos.

Palavras chave: *Atta sexdens rubropilosa*. Subcolônias. Fungos oportunistas. Controle biológico.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- <i>Syncephalastrum racemosum</i>	26
Figura 2- Conjunto de três recipientes plásticos componentes das subcolônias utilizadas para o teste de patogenicidade	34
Figura 3- Condições de acondicionamento das operárias para o teste LD ₅₀	38
Figura 4- Composição da subcolônia utilizada nos testes de coinfeção	40
Figura 5- Piloto do teste de coinfeção	41
Figura 6- Porcentagem de fragmentos de jardins de fungo, na presença e na ausência de operárias, que apresentaram crescimento de fungos	49
Figura 7- Diferenças morfológicas dos jardins de fungo na presença e na ausência de operárias.....	51
Figura 8- Porcentagem de fragmentos de jardins de fungo e lixo que apresentaram crescimento de fungos	53
Figura 9- Diferenças morfológicas do jardim e lixo na presença de operárias	55
Figura 10- Comportamento de “carpir” (<i>weeding</i>) em jardins contaminados com esporos de <i>S. racemosum</i>	57
Figura 11- Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de aplicação tópica de suspensão de esporos de <i>Metarhizium anisopliae</i>	59
Figura 12- Aparecimento de grupo de conídios na superfície de operárias de <i>A. sexdens rubropilosa</i>	60
Figura 13- Porcentagem das alterações dos itens analisados durante o primeiro teste de coinfeção	64
Figura 14- Porcentagem das alterações dos itens analisados durante o segundo teste de coinfeção	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Fungos filamentosos isolados de ninhos de formigas cortadeiras (<i>Atta sexdens rubropilosa</i> e <i>Acromyrmex</i> sp.) utilizados nos experimentos desenvolvidos	33
Tabela 2- Desenho experimental dos ensaios para o teste de patogenicidade de <i>Syncephalastrum racemosum</i> , <i>Trichoderma virens</i> , <i>Escovopsis weberi</i> e <i>Fusarium solani</i> , em subcolônias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	35
Tabela 3- Quantificação das alterações no corte, mortalidade, condições gerais e lixo separado nas subcolônias tratadas	43
Tabela 4- Resultados do teste qui-quadrado para as comparações entre os jardins de fungo e lixo para as linhagens de <i>Syncephalastrum racemosum</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Escovopsis weberi</i> e <i>Fusarium solani</i>	47
Tabela 5- Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> submetidas ao bioensaio de aplicação tópica, com suspensão de esporos de <i>Metarhizium anisopliae</i>	58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Formigas da tribo Attini e sua associação com fungos	13
2.2 Jardim de fungo	15
2.3 Manutenção do jardim de fungo	17
2.3.1 Proteção do jardim de fungo	18
2.3.2 Manejo do lixo	19
2.4 Comunidade microbiana associada ao jardim de fungo	19
2.4.1 Outros micro-organismos presentes nos jardins das formigas da tribo Attini	21
2.4.2 <i>Syncephalastrum racemosum</i>	25
2.5 Controle de formigas cortadeiras	27
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo geral	31
3.2 Objetivos específicos	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Cultivo e manutenção dos fungos	32
4.2 Teste de patogenicidade: empregando os postulados de Koch	33
4.3 Filmagem de subcolônia infectada com <i>Syncephalastrum racemosum</i>	36
4.4 Determinação da Dose Letal Mediana (LD ₅₀) de <i>M. anisopliae</i>	37
4.5 Teste de coinfeção: ensaio piloto	39
4.6 Teste de coinfeção	41
5 RESULTADOS	47
5.1. Teste de patogenicidade	47
5.2 Filmagem de subcolônia infectada com <i>Syncephalastrum racemosum</i>	56
5.3 Determinação da Dose Letal Mediana (LD ₅₀) de <i>M. anisopliae</i>	58
5.4 Teste de coinfeção: ensaio piloto	61
5.5 Teste de coinfeção	61
6 DISCUSSÃO	66
7 CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS	74
APÊNDICE A - VÍDEOS	84

1 INTRODUÇÃO

As formigas cortadeiras mantêm uma relação mutualista com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* (Basidiomycota: Agaricaceae), o qual é cultivado no interior de ninhos subterrâneos e utilizado como principal fonte de alimento para larvas, rainha e alados. As formigas cultivam o fungo na superfície do material vegetal fresco que forrageiam. O micélio do fungo mutualista em conjunto com o substrato vegetal resultam em uma estrutura de aspecto esponjoso, denominada “jardim de fungo”. A fim de promover o crescimento do jardim, as operárias podem cortar grande quantidade de folhas e flores, caracterizando as formigas cortadeiras como pragas, especialmente em ambientes alterados pelas atividades humanas, como nas áreas agrícolas ou de reflorestamento (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; FISHER; STRADLING; PEGLER, 1994; MUELLER et al., 2001; SILVA-PINHATI et al., 2004; DELLA LUCIA; SOUZA, 2011; OLIVEIRA et al., 2011).

O uso de inseticidas químicos formulados em iscas consiste em uma das principais formas de controle das formigas cortadeiras. A sulfluramida (p. ex. formulada no produto comercial Mirex-S[®]) é amplamente empregada para esse fim, devido à sua eficiência na eliminação de colônias de diversas espécies de formigas cortadeiras (OLIVEIRA et al., 2011). A sulfluramida (N-etil perfluooctano sulfonamida) é um derivado do perfluooctano sulfônico (PFOS), que atua na fosforilação oxidativa, interrompendo o fluxo de elétrons e a produção de ATP na matriz mitocondrial, levando o inseto à morte (BOARETTO; FORTI, 1997; TOMLIN, 2006; SANTOS et al. 2007; BUENO, 2013). O PFOS, assim como outros compostos perfluorinados, apresenta inércia térmica, química e bioquímica, devido às fortes ligações covalentes que ocorrem entre os átomos de flúor e carbono (TOMLIN, 2006; ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2002; COMISSÃO DE REVISÃO DOS POPs, 2006; GOOSEY, 2010). Portanto, por ser um composto persistente e tóxico, o PFOS foi considerado um Poluente Orgânico Persistente (POP) de uso restrito (Anexo B da Conferência das Partes - COP4-SC4/17) pela Convenção de Estocolmo, sendo seu uso permitido somente em casos onde não existam alternativas viáveis, como no combate às formigas cortadeiras (CONFERÊNCIA DAS PARTES, 2009; GOOSEY, 2010).

Nesse contexto, o controle biológico de formigas cortadeiras pode ser uma estratégia mais sustentável e menos agressiva ao meio ambiente (BOARETTO; FORTI, 1997; DELLA LUCIA; GANDRA; GUEDES, 2014), quando comparado ao emprego de inseticidas químicos. O uso de fungos com potencial patogênico contra as formigas ou seu fungo

mutualista constitui uma estratégia promissora de controle biológico. Essa abordagem inclui o estudo dos fungos filamentosos naturalmente associados aos ninhos desses insetos (LOPEZ; ORDUZ, 2003; FOLGARAIT et al., 2011; DELLA LUCIA; GANDRA; GUEDES, 2014).

Dentre os fungos naturalmente associados às colônias, *Syncephalastrum racemosum* apresentou elevada incidência e mostrou rápido crescimento em ninhos de laboratório tratados com inseticida (RORIGUES et al., 2005). No entanto, os aspectos da interação entre *S. racemosum*, o jardim de fungo e as formigas ainda devem ser esclarecidos. Neste estudo, buscou-se responder: (i) *S. racemosum* atua como patógeno nos jardins de fungos das formigas cortadeiras? (ii) No caso de *S. racemosum* ser um patógeno, este poderia atuar como oportunista na presença de fungos entomopatogênicos? Para responder a primeira pergunta, foi verificado se os postulados de Koch se aplicam para esse fungo, a fim de determinar se *S. racemosum* apresenta patogenicidade frente ao jardim de fungo. Para tanto, esporos foram inoculados no jardim de subcolônias de *Atta sexdens rubropilosa* e os postulados verificados. Para responder a segunda pergunta, foi avaliado o crescimento de *S. racemosum* nos jardins de subcolônias infectadas simultaneamente com esporos do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*.

A partir dos resultados encontrados no presente estudo, constatou-se que *S. racemosum* atua como um patógeno no jardim de fungo das formigas cortadeiras, sendo que sua colonização ocorre de maneira agressiva, sem a necessidade de comprometimento das defesas da colônia. Essas observações indicam que *S. racemosum* consiste em um patógeno frente ao jardim de fungo de *A. sexdens rubropilosa*, e não um fungo oportunista.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Formigas da tribo Attini e sua associação com fungos

A tribo Attini (Hymenoptera: Formicidae) consiste em um grupo monofilético restrito ao Novo Mundo, compreendendo 16 gêneros e aproximadamente 256 espécies, estas caracterizadas pelo cultivo de fungos para alimentação (MUELLER et al., 2001; SCHULTZ; BRADY, 2008; BRANDÃO, MAYHÉ-NUNES; SANHUDO, 2011; SOSA-CALVO et al., 2013). A partir da reconstrução da história evolutiva dessas formigas, sabe-se que a tribo Attini divergiu-se em dois clados principais, reconhecidos como "Paleoattini", constituído pelos gêneros *Mycocepurus*, *Myrmicocrypta* e *Apterostigma* (formando um grupo monofilético basal) e "Neoattini", que apresenta dois subgrupos também monofiléticos: (i) um grupo basal, compreendendo os gêneros *Mycetophylax*, *Mycetarotes*, *Mycetosoritis*, *Mycetagroicus*, *Cyphomyrmex*, *Paramycetophylax* e *Kalathomyrmex*, e (ii) um grupo derivado que compreende os gêneros *Sericomyrmex*, *Trachymyrmex*, *Atta* e *Acromyrmex*, sendo os dois últimos considerados os gêneros mais derivados dentro de Attini. Com base na monofilia da tribo Attini e na sua distribuição exclusiva no continente americano (sendo encontrados do sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina), especula-se que a agricultura nesse grupo surgiu uma única vez, há 50 milhões de anos, em regiões de floresta na América do Sul, após a separação do continente africano (SOLOMON et al., 2008). Desse modo, a origem das formigas cultivadoras de fungo coincide com o "ótimo climático" do início do Eoceno (50-55 milhões de anos atrás), período com elevada diversidade de espécies vegetais (CHAPELA et al., 1994; MAYHÉ-NUNES; JAFFÉ, 1998; MUELLER et al., 2001; SCHULTZ; BRADY, 2008; SOLOMON et al., 2008).

A fungicultura praticada por Attini resulta de uma relação simbiótica com fungos e pode ser dividida em cinco sistemas biologicamente distintos: (i) fungicultura basal, utilizando partes secas de plantas e carcaças de outros insetos para o cultivo de fungos da tribo Leucocoprinae (Basidiomycota: Agaricales: Agaricaceae); (ii) cultivo de fungos da família *Pterulaceae* (Basidiomycota: Agaricales), praticada por espécies do "grupo *pilosum*" pertencentes aos gênero *Apterostigma* (único caso conhecido em que o cultivar fúngico não pertence à tribo Leucocoprinae); (iii) cultivo de leveduras da tribo Leucocoprinae, desenvolvido por espécies do grupo *Cyphomyrmex rimosus*; (iv) fungicultura derivada, praticada pelos gêneros *Trachymyrmex*, *Sericomyrmex*, *Acromyrmex* e *Atta*, cujo fungo cultivado apresenta elevado nível de domesticação (i.e. não foram encontrados até o momento

na natureza, em vida livre), apresentando adaptações para o mutualismo com as formigas Attini; esses fungos também pertencem à tribo Leucocoprinae; (v) subdivisão da fungicultura derivada, que inclui a fungicultura praticada pelos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, para os quais o substrato para o cultivo do fungo são partes frescas de plantas (SCHULTZ et al., 2005; MIKHEYEV; MUELLER; BOOMSMA, 2007; SCHULTZ; BRADY, 2008; DELLA LUCIA; SOUZA, 2011). Essas formigas cultivam o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* (PAGNOCCA et al., 2001).

De acordo com Mueller et al. (2001), a evolução de elementos comportamentais da fungicultura desenvolvida por Attini pode ser resumida em dois modelos principais. O primeiro modelo é considerado tradicional, denominado "*Consumption First*", onde fungos que cresciam de forma acidental em ninhos de formigas passaram a constituir a dieta destes organismos. Posteriormente, é provável que as formigas tenham desenvolvido a capacidade de promover o crescimento do fungo por meio da adição de substrato, e, finalmente, tenha surgido um mecanismo de transmissão do fungo cultivado para as colônias filhas. Dentro desse modelo, foram sugeridos seis substratos diferentes nos quais o fungo teria sido cultivado durante a transição para o comportamento cultivador (sementes armazenadas, paredes dos ninhos, madeira apodrecida, micorrizas, cadáveres de artrópodes e fezes de formigas). Tais hipóteses compartilham o pressuposto de que as formigas constituíram o mecanismo por trás da origem do mutualismo. Alternativamente, o segundo modelo, conhecido como "*Transmission First*", propõe que nas fases iniciais da interação, as formigas não se alimentavam do fungo, atuando somente como vetores passivos de dispersão (provavelmente através de *pellets* infrabucais). Em seguida, as formigas incorporaram o fungo na sua dieta e, finalmente, desenvolveram a capacidade de cultivar e transmitir o simbionte fúngico para as colônias filhas. Assim, essa hipótese admite que o início do mutualismo esteve sob controle do fungo.

Desde o surgimento da fungicultura, interações evolutivas envolveram a dispersão vertical e o compartilhamento horizontal do fungo (CHAPELA et al., 1994; MUELLER et al., 1998; MIKHEYEV; MUELLER; BOOMSMA, 2007). A dispersão vertical ocorre quando uma rainha deixa o ninho parental, levando consigo um inóculo do fungo na cavidade infrabucal, que é utilizado para fundação do novo ninho. Após o acasalamento, escolha e escavação de um local adequado para a colônia, a rainha expelle o conteúdo da cavidade infrabucal e inicia um novo jardim. A dispersão vertical de uma colônia parental para uma colônia filha sugere que a propagação clonal do fungo evolui paralelamente (i.e. cladogênese) com as linhagens de formigas (MUELLER et al., 1998; MUELLER et al.,

2001). Em relação ao compartilhamento horizontal, este ocorre quando uma espécie de formiga coleta e passa a cultivar o fungo de outra espécie de formiga ou um fungo de vida livre. Nesse sentido, Chapela et al. (1994) sugerem que os fungos cultivados por *Attini* basais são geneticamente diversos, o que constitui um indício de múltiplas aquisições. Tal fato também foi demonstrado por Green et al. (2002). Por outro lado, as *Attini* derivadas apresentam fungos geneticamente similares, resultantes da propagação clonal durante milhões de anos (CHAPELA et al., 1994).

2.2 Jardim de fungo

As formigas cortadeiras apresentam uma relação mutualista com o fungo *L. gongylophorus*, que cultivam no interior de ninhos subterrâneos, a partir da adição de substrato vegetal fresco, formando uma estrutura denominada jardim de fungo. A fim de promover o crescimento deste, as operárias podem cortar grande quantidade de folhas e flores, caracterizando as formigas cortadeiras como pragas, principalmente, em áreas agrícolas e de reflorestamento (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; FISHER; STRADLING; PEGLER, 1994; MUELLER et al., 2001; SILVA-PINHATI et al., 2004).

As enzimas produzidas por *L. gongylophorus* desempenham um papel essencial na relação simbiótica, uma vez que degradam o material vegetal, liberando compostos que estimulam o crescimento do jardim de fungo, além de fornecer uma fonte constante de nutrientes para as formigas. Em troca, as formigas realizam a manutenção no jardim de fungo, eliminando contaminantes prejudiciais, realizando a "poda" (a fim de estimular o crescimento) e dispersando enzimas por meio do fluido fecal (CURRIE; STUART, 2001; SILVA et al., 2003; ERTHAL Jr. et al., 2008).

Segundo Siqueira et al. (1998), *L. gongylophorus* metaboliza polissacarídeos vegetais, como xilana, amido, pectina e celulose, mediando a assimilação desses compostos pelas formigas. Nesse estudo, os autores demonstraram que *L. gongylophorus* hidrolisa rapidamente amido e xilana, assimilando a xilose, maltose e glicose resultantes. Por outro lado, a celulose parece ser pouco degradada e assimilada. Tal observação corresponde à encontrada por Abril e Bucher (2002), que demonstraram a incapacidade do fungo mutualista em degradar celulose. Além disso, foram relatados elevados níveis de pectinase, assim como uma eficiente degradação de pectina, resultados condizentes com os obtidos por Silva et al. (2006a), Erthal Jr. et al. (2008) e Moller et al. (2011). Essas observações permitem inferir que a degradação de pectina pode ser utilizada para "macerar" o tecido foliar, permitindo que *L. gongylophorus*

acesse os nutrientes dos tecidos foliares internos. Adicionalmente, Silva et al. (2006b) propõem que *L. gongylophorus* seja capaz de produzir glicose a partir da degradação de amido presente no material vegetal, através da α -amilase e maltase. Tais achados sugerem que a produção de glicose a partir do amido seja um processo contínuo nos jardins, podendo ser considerado importante para a nutrição das formigas, a qual é sustentada principalmente pela glicose (SILVA et al., 2003). Corroborando com essas informações, as análises genômica e metaproteômica desenvolvidas por Aylward et al. (2013) permitiram a identificação de diversas lignocelulases, incluindo pectinases, xilanases, amilases e celulasas, além de uma grande quantidade de proteases, sugerindo que as proteínas vegetais constituem uma fonte nutricional importante para *L. gongylophorus*. Por outro lado, o estudo identificou uma relativa abundância de celulasas no estrato inferior do jardim, sugerindo que tais enzimas possam ser produzidas principalmente quando os polímeros menos recalcitrantes já foram exauridos.

Sabe-se que a composição da biomassa vegetal varia de acordo com a diversidade de plantas forrageadas e com as alterações no substrato, devido ao processo de degradação. Dessa forma, é provável que *L. gongylophorus* utilize diversos conjuntos de enzimas, a fim de adquirir nutrientes de diferentes substratos vegetais, dependendo do estágio da degradação da biomassa (AYLWARD et al., 2013).

A capacidade metabólica de *L. gongylophorus* em degradar polissacarídeos vegetais provavelmente constitui um atributo favorável para o sucesso da sua associação com as formigas (PAGNOCCA; RODRIGUES; BACCI Jr, 2011). No caso das formigas cortadeiras, o fungo apresenta características que sugerem um elevado grau de domesticação, como a aparente incapacidade de existir em sua forma de vida livre (separado das formigas) na natureza e a produção de hifas apicais especializadas, denominadas gongilídios (SCHULTZ; BRADY, 2008). Essas estruturas consistem em hifas intumescidas, com conteúdo nutritivo (principalmente carboidratos e lipídios), constituindo a única fonte de alimento de larvas, rainha e alados. Já as demais operárias podem suplementar sua alimentação com seiva vegetal ou os açúcares livres presentes nos jardins (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; SILVA et al., 2003). Nesse contexto, Hölldobler e Wilson (1990) sugerem que o jardim de fungo parece fornecer combinações específicas e adequadas de nutrientes facilmente assimiláveis derivados das plantas, como carboidratos (principalmente a glicose), aminoácidos, lipídeos e nutrientes traço (vitaminas e minerais).

2.3 Manutenção do jardim de fungo

A fungicultura desenvolvida por formigas cortadeiras inicia-se com a coleta de substrato vegetal, sobre o qual o fungo será cultivado. Assim que o substrato é levado para o interior da colônia, as operárias iniciam o processamento do material, lambendo e mastigando as folhas, resultando em fragmentos pequenos (1-2 mm). A fragmentação do material vegetal consiste em um passo fundamental no cultivo do fungo, já que elimina alguns dos micro-organismos presentes na superfície da folha, além de romper a barreira física e aumentar a área de superfície disponível para a invasão e crescimento de *L. gongylophorus* (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; CURRIE, 2001a). A polpa resultante da mastigação é incorporada no topo do jardim e inóculos da parte mais envelhecida do fungo são adicionados à sua superfície. Antes da incorporação propriamente dita, as formigas adicionam gotas de fluido fecal no substrato. O fluido fecal apresenta diversas enzimas, como pectinases, proteases, celulasas, α -amilase e maltase, muitas das quais são produzidas pelo próprio fungo. Tais enzimas são ingeridas pelas formigas e passam inalteradas através do trato digestivo, permanecendo ativas após sua deposição, indicando que as operárias transferem enzimas para a parte mais jovem do jardim (região com menor concentração enzimática). Esse mecanismo potencializa a degradação de polímeros da parede celular vegetal, fazendo com que as hifas do fungo entrem em contato com os recursos intracelulares mais rapidamente (CURRIE, 2001a; RØNHEDE; BOOMSMA; ROSENDAHL, 2004; SHIØTT et al., 2010; MOLLER et al., 2011; BACCI Jr et al., 2013; DE FINE LICHT et al., 2013).

São necessárias aproximadamente seis semanas para que o substrato seja completamente degradado pelo fungo mutualista, e, durante esse período, fragmentos frescos são adicionados no topo do jardim, resultando em uma ciclagem contínua de material, onde o substrato mais antigo encontra-se no estrato inferior do jardim (CURRIE, 2001a; MOLLER et al., 2011; DE FINE LICHT et al., 2013). Dessa maneira, diferentes estágios da degradação vegetal ocorrem em regiões distintas do jardim, fato refletido em sua aparência, que apresenta uma coloração mais escura na camada superior (com substrato vegetal incorporado), uma camada intermediária (onde a biomassa do fungo aumenta de forma substancial e os grupos de gongilídios são mais abundantes) e uma camada inferior mais clara (com biomassa micelial densa e restos de substrato vegetal não degradado). As porções exauridas do jardim de fungo na camada inferior são removidas continuamente e depositadas em pilhas de detritos, em câmaras distantes do jardim de fungo (BOT et al., 2001; CURRIE, 2001a; SUEN et al., 2010; MOLLER et al., 2011).

2.3.1 Proteção do jardim de fungo

Embora o cultivo de fungos dependa de adaptações comportamentais e fisiológicas, a capacidade de manter o jardim de fungo saudável pode ser considerada a adaptação mais importante, considerando que esse substrato frequentemente está em contato com micro-organismos presentes no material vegetal adicionado e do solo ao redor dos ninhos (CURRIE, 2001a; CURRIE; STUART, 2001).

Conforme afirmam Currie e Stuart (2001), a remoção física de micro-organismos contaminantes constitui uma das principais defesas empregadas pelas formigas para a proteção do jardim de fungo. Uma das formas de remoção de micro-organismos consiste em lambe a superfície do jardim, coletando esporos na cavidade infrabucal e, subsequentemente, descartando-os fora do jardim de fungo, na forma de *pellets*. Durante esse comportamento, designado "*grooming*", as operárias utilizam as antenas na procura por esporos invasores. De acordo com Currie e Stuart (2001), o "*grooming*" é realizado exclusivamente por operárias mínimas. No entanto, uma vez que a infecção tenha sido estabelecida, as operárias tentam suprimir a dispersão do patógeno, através da remoção de partes infectadas do jardim (micélio do fungo invasor juntamente com micélio do fungo mutualista, e ocasionalmente, substrato vegetal incorporado). O comportamento de remoção de fragmentos do jardim é denominado "*weeding*", e envolve diversas etapas e várias operárias. A primeira etapa envolve o desprendimento do fragmento, por meio da mastigação das regiões que o conectam ao restante do jardim, sendo executado por operárias mínimas. Em seguida, uma operária mínima (ou uma casta maior) segura o fragmento com as mandíbulas e oscila lateralmente, destacando-o do jardim, quando então é carregado para as câmaras de refugio por uma operária generalista (ou uma casta maior).

O crescimento de micro-organismos também pode ser impedido quimicamente, através da produção de compostos com propriedades antibióticas nas glândulas metapleurais, como ácido fenilacético, ácido indolacético e 3-hidroxicanônico (mirmicacina) (FISHER; STRADLING; PEGLER, 1994; CURRIE, 2001a; POULSEN et al., 2002; FERNÁNDEZ-MARÍN et al., 2006). De acordo com Knapp et al. (1994), as glândulas mandibulares também seriam capazes de produzir compostos antibióticos, fato observado no estudo desenvolvido por Rodrigues et al. (2008a), onde a secreção destas glândulas inibiu a germinação *in vitro* de esporos de *Cunninghamella elegans*, *Fusarium solani*, *S. racemosum* e *Trichoderma harzianum*. Adicionalmente, Rodrigues et al. (2008a) sugerem que o fluido fecal também

pode exibir propriedades antimicrobianas, inibindo a germinação de esporos de alguns fungos, porém, com menor eficiência se comparado à secreção da glândula mandibular.

2.3.2 Manejo do lixo

Colônias de formigas cortadeiras produzem quantidades significativas de lixo, este composto por jardim de fungo envelhecido, cadáveres de operárias, larvas e pupas, detritos e fragmentos de folhas secas. A manutenção de resíduos prejudiciais realizada pelas formigas cortadeiras apresenta duas características principais. Primeiramente, o lixo não é disperso do lado externo do jardim, sendo concentrado em uma ou poucas regiões, embora o compartimento destinado para o lixo da colônia seja característico para cada espécie. Como exemplo, foi observado que *Atta cephalotes* e *A. sexdens rubropilosa* depositam seu material de refugio em câmaras subterrâneas, enquanto que *A. colombica* e *A. mexicana* o fazem na superfície do solo, a uma distância segura da colônia. Em segundo lugar, o transporte do lixo a partir do jardim de fungo até o refugio é sujeito à divisão de tarefas, que, dependendo da espécie, pode ser baseada na idade (polietismo etário, i.e., mudanças de tarefas de acordo com a idade do indivíduo, que resulta em operárias mais velhas executando tarefas mais arriscadas) (BOT et al., 2001; FARJI-BRENER; MEDINA, 2000; HART; RATNIEKS, 2002; LACERDA; DELLA LUCIA; SOUZA, 2011).

Estudando o manejo do lixo de *A. cephalotes*, Bot et al. (2001) observaram diversos comportamentos, como transporte de porções jovens e envelhecidas do jardim, rearranjo de fragmentos na câmara de lixo, rearranjo de cadáveres, "*self-grooming*" e "*allogrooming*". Além disso, os autores relatam que o lixo é prejudicial para as formigas (resultando em um aumento na taxa de mortalidade destas) e para o jardim de fungo (pois pode apresentar diversos micro-organismos patogênicos), de forma que as operárias destinam um esforço considerável no manejo do lixo a fim de reduzir esses riscos.

2.4 Comunidade microbiana associada ao jardim de fungo

Embora sejam conhecidos mecanismos empregados pelas operárias para eliminar micro-organismos indesejáveis, uma comunidade complexa composta por fungos filamentosos, bactérias e leveduras permanece no jardim (CURRIE, 2001a; PAGNOCCA; MASIULIONIS; RODRIGUES, 2012).

Fungos do gênero *Escovopsis* (Ascomycota: Hypocreales) são designados parasitas especializados do jardim de fungo, e ocorrem nas colônias da maioria dos gêneros da tribo Attini, com rápido crescimento e produção de esporos, além de ser persistente no jardim de fungo (CURRIE et al., 1999a; CURRIE, 2001a). Considerando que *Escovopsis* sp. satisfaz os postulados de Koch, esse micro-organismo é caracterizado como um patógeno, capaz de aumentar a morbidade e mortalidade de jardins infectados, levando à uma redução tanto na geração de operárias, quanto no crescimento do jardim de fungo (CURRIE et al., 1999a; CURRIE, 2001a; 2001b).

Escovopsis é um micoparasita necrotrófico, que degrada as hifas do fungo mutualista para obtenção de nutrientes (REYNOLDS; CURRIE, 2004; HAIFIG, 2014). Nesse sentido, evidências indicam que a atração de *Escovopsis* até as hifas de seu hospedeiro seja mediada por quimiotaxia. Ainda, tais respostas são específicas ao cultivar (i.e., *Escovopsis* sofre maior atração pelos isolados do cultivar que ele tipicamente parasita) e podem estar relacionadas à especialização de *Escovopsis* em relação ao seu hospedeiro (GERARDO et al., 2006). Além disso, existem congruências entre as filogenias de *Escovopsis* e do fungo mutualista, sugerindo a existência de coevolução. No entanto, tais congruências não ocorrem entre as filogenias de *Escovopsis* e das formigas, indicando que o parasita seja cultivar-específico (CURRIE et al., 2003; GERARDO et al., 2004).

Nesse contexto, o crescimento de *Escovopsis* pode ser inibido através da associação com bactérias filamentosas (actinobactérias) do gênero *Pseudonocardia*, por meio da produção de um composto antibiótico (por exemplo, a dentigerumicina, isolada de bactérias encontradas na cutícula de *Apterostigma dentigerum*, CURRIE et al., 1999b; CURRIE et al., 2003; CAFARO; CURRIE, 2005; OH et al., 2009). Tais bactérias ocorrem em regiões específicas da cutícula das formigas, conservadas entre espécies, mas que variam entre os gêneros. Por exemplo, em operárias e rainhas de *Myrmicocrypta* e *Apterostigma*, as bactérias ocorrem abaixo das pernas dianteiras. Já em gêneros mais derivados de Attini, as actinobactérias são mais proeminentes nas placas laterocervicais da propleura, imediatamente posterior às partes bucais, na região ventral (CURRIE et al., 1999b; CURRIE; BOT; BOOMSMA, 2003).

Essas actinobactérias foram isoladas de 22 espécies e 8 gêneros de formigas Attini, representando a diversidade filogenética da tribo (CURRIE et al., 1999b). Nesse estudo, foi sugerido que as actinobactérias são transferidas verticalmente da colônia parental para a colônia filha, através da cutícula da rainha fundadora. Os autores afirmam que essas evidências, juntamente com o fato de que as actinobactérias produzem antibióticos que inibem

seletivamente o crescimento de *Escovopsis*, indicam que tais micro-organismos constituem um terceiro mutualista na relação entre as formigas e o jardim de fungo.

Na espécie *Acromyrmex octospinosus* foi observado que em colônias experimentalmente infectadas com *Escovopsis*, as operárias apresentaram uma quantidade maior de actinobactérias em suas cutículas (CURRIE; BOT; BOOMSMA, 2003). Além disso, foram encontradas variações na abundância de actinobactérias entre as diferentes castas. Por exemplo, rainhas e operárias de castas maiores com atividades relacionadas ao jardim apresentam toda a cutícula coberta por actinobactérias, enquanto que nas operárias de castas menores, somente as placas laterocervicais da propleura são recobertas. Por outro lado, as operárias de castas maiores responsáveis pelo forrageamento ou com atividades relacionadas ao lixo possuem uma quantidade relativamente baixa de actinobactérias recobrindo suas cutículas (CURRIE; BOT; BOOMSMA, 2003). Em relação à localização das actinobactérias, estudos com o gênero *Cyphomyrmex*, demonstraram que tais micro-organismos crescem dentro de cavidades nas placas propleurais (fôveas). É provável que as actinobactérias sejam nutridas por secreções de uma glândula exócrina, que apresenta um ducto que atravessa a cutícula e desemboca na fôvea. Por outro lado, nos gêneros *Trachymyrmex* e *Acromyrmex*, as actinobactérias crescem em células glandulares associadas diretamente ao exoesqueleto. Já em *Atta*, a distribuição das actinobactérias pode ser rara ou ausente (CURRIE et al., 1999b; CURRIE et al., 2006; ZHANG, POULSEN; CURRIE, 2007; MUELLER et al., 2008). Adicionalmente, análises filogenéticas da tribo Attini revelaram que as actinobactérias aparentemente estiveram presentes nos estágios iniciais do cultivo de fungos pelas formigas (CURRIE et al., 2006).

2.4.1 Outros micro-organismos presentes nos jardins das formigas da tribo Attini

A complexa associação entre as formigas da tribo Attini e o jardim de fungo envolve uma elevada diversidade de micro-organismos, além de *L. gongylophorus*, *Escovopsis* e *Pseudonocardia*, sendo que vários estudos foram desenvolvidos na tentativa de determinar se estes micro-organismos apresentariam alguma participação na associação (BACCI Jr et al., 1995; RODRIGUES et al., 2005; 2008b; PINTO-TOMÁS et al., 2009; SCOTT et al., 2010; SUEN et al., 2010; RODRIGUES et al., 2011; AYLWARD et al., 2012; PAGNOCCA; MASIULIONIS; RODRIGUES, 2012).

A respeito da comunidade bacteriana, alguns estudos sugerem que bactérias presentes no jardim de fungo desempenham determinadas funções na fisiologia da colônia. Nesse

contexto, demonstrou-se a ocorrência de fixação de nitrogênio atmosférico (N_2) no jardim de fungo, associada com a presença de bactérias fixadoras do gênero *Klebsiella* (PINTO-TOMÁS et al., 2009). A fixação de N_2 foi maior no estrato intermediário do jardim, coincidindo com o local onde as formigas se alimentam do fungo, sugerindo que as colônias de formigas cortadeiras obtêm uma quantidade significativa de seus requerimentos de nitrogênio a partir de simbioses fixadores de N_2 (PINTO-TOMÁS et al., 2009). Constatou-se também que a comunidade microbiana no interior do jardim de fungo abriga um conjunto diverso de bactérias, dominado por *Enterobacteriaceae* (γ -proteobactéria). Adicionalmente, foi revelada uma elevada abundância de *Klebsiella* e *Pantoea*, demonstrando-se a capacidade destas em degradar celulose. Assim, é provável que tais micro-organismos participem da degradação de substrato vegetal no jardim de fungo, sugerindo um modelo de degradação de biomassa que inclui o fungo mutualista e as bactérias (SUEN et al., 2010). De modo semelhante, a avaliação de comunidades microbianas presentes no jardim e no lixo de colônias de diversas espécies de formigas cortadeiras, indicou uma elevada abundância de bactérias Gram-negativas no jardim (particularmente γ -Proteobactéria e Bacteroidetes), de bactérias Gram-positivas (do grupo *Bacillus-Clostridium*) e anaeróbicas no lixo. Esses resultados sugerem que essas comunidades bacterianas podem ser residentes e provavelmente moldadas pelo gradiente de degradação vegetal (SCOTT et al., 2010). A partir de análises metagenômicas e metaproteômicas, Aylward et al. (2012) encontraram que a microbiota no jardim de fungo parece ser dominada por poucos grupos, como *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Escherichia* e *Pantoea*, o que poderia resultar da composição da matriz planta-fungo e do comportamento de higienização das formigas. A presença de grupos dentro de *Enterobacteriaceae* em diferentes estratos do jardim implica que essas bactérias apresentam um papel consistente no jardim de fungo, sugerindo que esses ambientes representam uma comunidade altamente estruturada, não consistindo somente em uma coleção aleatória de micro-organismos oportunistas. Além disso, a análise metagenômica revelou diversos genes bacterianos associados com a degradação de biomassa vegetal, enquanto que a análise metaproteômica mostrou a presença de peptídeos bacterianos que participam da degradação de biomassa e da biossíntese de nutrientes. Dessa forma, as informações apresentadas por Pinto-Tomás et al. (2009), Suen et al. (2010), Scott et al. (2010) e Aylward et al. (2012) propõem que o metabolismo combinado das bactérias residentes no jardim de fungo podem enriquecer esse ambiente, por meio da conversão de oligossacarídeos em outros nutrientes, podendo promover o crescimento do jardim de fungo ou ainda, sustentar a nutrição das formigas.

Diversos estudos mencionam a presença de leveduras isoladas a partir do jardim de fungo. Dentre estes estudos, Carreiro et al. (1997) relataram a presença de *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Tremella*, *Trichosporon* e *Pichia*. Também foram isoladas *Cryptococcus haglerorum* (MIDDELHOVEN et al., 2003), *Blastobotrys attinorum* (CARREIRO et al., 2004), *Trichosporon chiarellii* (PAGNOCCA et al., 2010) e *Starmerella aceti* (MELO et al., 2014). Ainda, leveduras foram encontradas no exoesqueleto de rainhas fundadoras de *A. capiguara* e *A. laevigata* (PAGNOCCA et al. 2008), assim como no exoesqueleto de machos de *A. sexdens rubropilosa* (ARCURI et al., 2014).

Quanto ao possível papel metabólico desempenhado pelas leveduras, Carreiro et al. (2002) constataram a presença de leveduras produtoras de micocinas (ou toxinas killer), proteínas de baixo peso molecular, possivelmente envolvidas com o controle de populações de leveduras e outros micro-organismos. Rodrigues et al. (2009) encontraram que leveduras isoladas de ninhos de *A. texana* inibiram o crescimento micelial de *Escovopsis*, *S. racemosum* e *Beauveria bassiana* (seja por exaustão dos recursos, mudanças no pH devido a subprodutos metabólicos ou pela produção de micocinas), sugerindo a possível participação na proteção do jardim de fungo. Além disso, Mendes et al. (2012) avaliaram o perfil enzimático de 82 linhagens de leveduras, encontrando enzimas hidrolíticas capazes de degradar polissacarídeos vegetais, incluindo a celulose, possivelmente contribuindo com geração de nutrientes disponíveis para o crescimento do jardim de fungo. Tal estudo ainda demonstrou que algumas leveduras poderiam atuar na detoxificação do ácido poligalacturônico, que, segundo Silva et al. (2003), não é assimilado pelo fungo mutualista, constituindo um composto deletério para as formigas. Dessa forma, as leveduras também poderiam participar do modelo de degradação de biomassa sugerido por Suen et al. (2010), junto com o fungo mutualista e as bactérias. Por outro lado, Little e Currie (2007, 2008) encontraram uma levedura negra, relacionada com o gênero *Phialophora*, que cresce nas fôveas das placas propleurais e, aparentemente, inibe o crescimento de *Pseudonocardia*, reduzindo a capacidade de proteção contra o crescimento de *Escovopsis*. Portanto, relatos como esses apenas demonstram o quanto nosso conhecimento a respeito da microbiota associada aos jardins ainda é incipiente.

Diversos fungos filamentosos isolados de colônias de formigas da tribo Attini podem ser usualmente encontrados em substratos vegetais e no solo adjacente ou distante das colônias, indicando que esses micro-organismos provavelmente são inseridos no jardim a partir do material vegetal forrageado ou transportados na superfície do tegumento das operárias (RODRIGUES et al., 2008b; 2011; 2013). Nesse sentido, o primeiro relato do crescimento de fungos filamentosos no jardim de cortadeiras foi realizado por Möller (1893),

que descreveu a ocorrência de *Aspergillus* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp. e *Rhizopus* sp., no jardim de *Acromyrmex disciger*. Já Kreisel (1972), ao estudar colônias de *Atta insularis* na ausência de operárias, constatou a presença de *Cunninghamella* sp., *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp. e *Trichoderma* sp. Avaliando também colônias na ausência de operárias, Bass e Cherrett (1994) observaram o rápido crescimento de *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Mucor* sp. e *Penicillium* sp.

Embora Poulsen e Currie (2006) tenham sugerido que os fungos filamentosos estão presentes no jardim de forma transiente, sem funções significativas na simbiose, alguns estudos indicam que tais micro-organismos podem desempenhar papéis importantes nas colônias de formigas cortadeiras (PAGNOCCA; MASIULIONIS; RODRIGUES, 2012). Nesse contexto, Rodrigues et al. (2005) isolaram, com elevada frequência, *S. racemosum*, *Fusarium solani* e *E. weberi* de colônias de *A. sexdens rubropilosa* de laboratório tratadas com sulfluramida, enquanto que *Trichoderma harzianum*, *F. oxysporum* e *E. weberi* foram prevalentes em ninhos de campo tratados com o mesmo inseticida, apontando que, em determinadas condições, outras espécies além de *Escovopsis* podem estar frequentemente associadas com o jardins de fungo. Conforme relatado por Silva et al. (2006c), além de *Escovopsis*, *T. harzianum* também atua como antagonista frente a *L. gongylophorus*, em ensaios *in vitro*. Adicionalmente, Rodrigues et al. (2008b) levantam a hipótese de que *F. oxysporum* e *Cunninghamella* sp. também atuariam como antagonistas em relação a *L. gongylophorus*. No entanto, o impacto negativo desses fungos na colônia resulta, provavelmente, da competição por recursos nutricionais, e não por mecanismos específicos (como ocorre com o crescimento de *Escovopsis*).

Além disso, considerando a quantidade de material vegetal forrageado pelas formigas cortadeiras, o contato desses insetos e de seu jardim com fungos endofíticos é praticamente inevitável (ARNOLD, 2007). Experimentos conduzidos por Van Bael et al. (2009) mostraram que as formigas levam mais tempo para cortar as folhas quando estas apresentam maior densidade de fungos endofíticos; além disso, as operárias reduzem a quantidade de fungos nas folhas antes da incorporação no jardim. Já Van Bael, Seid e Wcislo (2012) constataram que as operárias podem requerer mais tempo para cortar, carregar, limpar e incorporar tecidos vegetais com abundância de fungos endofíticos relativamente baixa, embora respondam de maneira semelhante a tecidos vegetais com elevada ou baixa diversidade de fungos. Essas observações sugerem que a presença de endofíticos no substrato vegetal representa um custo adicional, reduzindo o ritmo de trabalho da colônia.

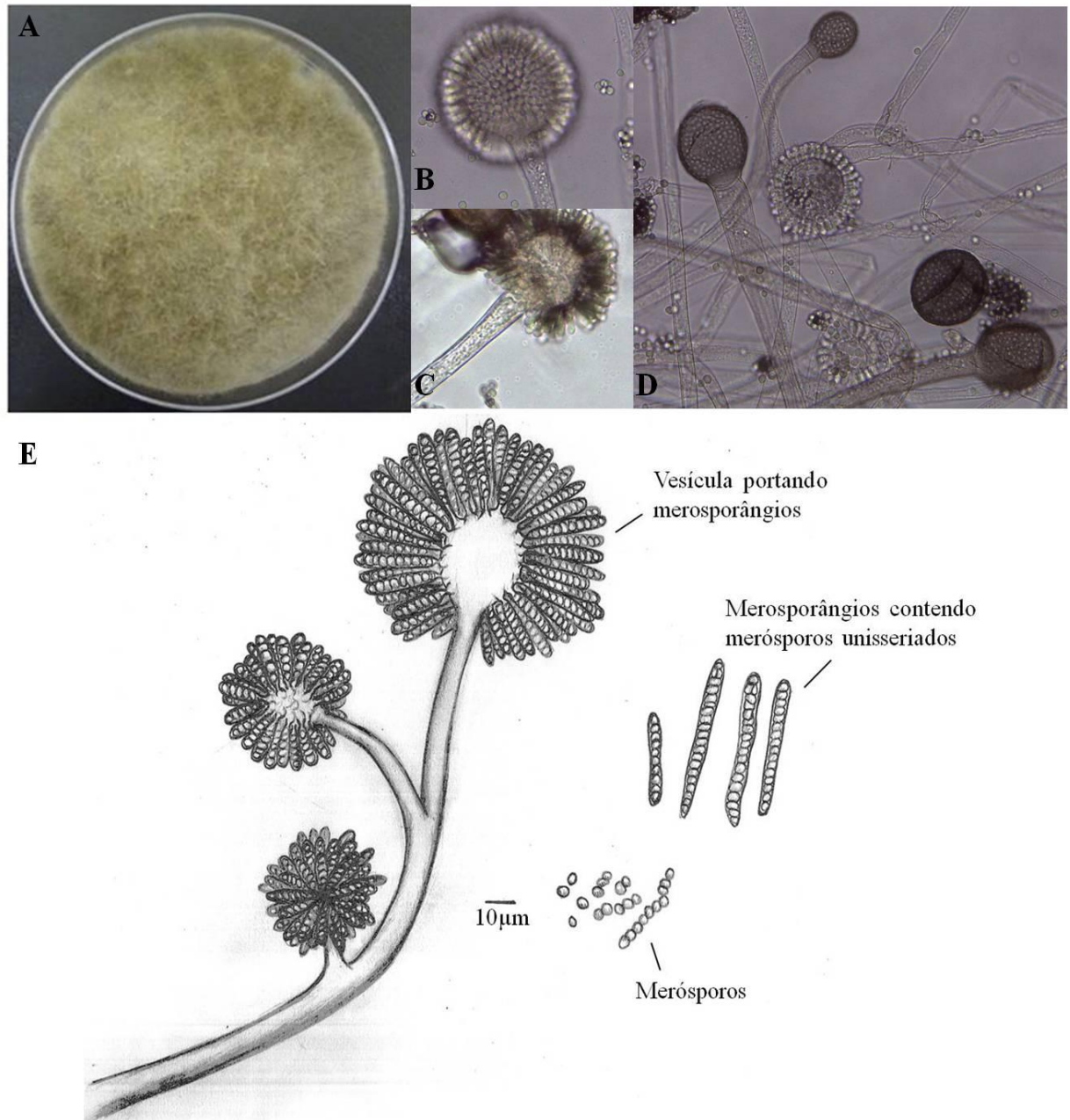
2.4.2 *Syncephalastrum racemosum*

O fungo filamentosso *S. racemosum* (Cohn) faz parte do antigo filo Zygomycota, ordem Mucorales, família Syncephalastraceae (HIBBETT et al., 2007; VITALE et al., 2012). As colônias de *S. racemosum* em meio de cultivo (Figura 1A) apresentam micélio aéreo abundante, de rápida expansão, com coloração cinzenta característica. Os esporangióforos desse fungo originam-se a partir dos rizoides, com ramificações irregulares, sendo que cada ramificação porta uma vesícula terminal (Figura 1B e 1D) que produz merosporângios sobre toda sua superfície (Figura 1C e 1E). Os merosporângios possuem coloração cinzenta e forma cilíndrica, contendo de 3 a 18 esporos enfileirados (merósporos unisseriados); os merósporos apresentam parede lisa de tonalidade marrom pálido, com formato que pode variar entre esférico a ovoide (HOOG et al., 2000).

De acordo com Domsch, Gams e Anderson (1980), *S. racemosum* pode ser considerado uma espécie tropical, frequentemente encontrada no solo e na matéria orgânica. Hocking e Miscamble constataram que o processo germinativo desse fungo é relativamente rápido, de forma que, a 25 °C e 0,995 a_w, seus esporos germinam em aproximadamente 12 horas; já a 30 °C e 0,995 a_w, a germinação ocorre por volta de 8,16 horas. Tal estudo também demonstrou que *S. racemosum* é capaz de crescer em condições de menor atividade de água (0.84 a_w), embora de forma mais lenta (de cinco a seis dias a 25 °C e por volta de 13,5 dias a 30 °C). Ainda em relação aos esporos de *S. racemosum*, Hobot e Gull (1980) observaram que concentrações relativamente baixas de esporos germinam mais rapidamente do que elevadas concentrações, sugerindo a existência de um processo inibitório. Esse estudo revelou que o ácido nonanoico atua como agente de auto-inibição, i.e, um composto presente na superfície dos esporos, que, em determinadas concentrações, interfere com a sequência normal de germinação.

Em relação aos aspectos metabólicos, sabe-se que *S. racemosum* produz uma ampla gama de enzimas, como β -amilase (RAY; CHAKRAVERTY, 1998), lipases (CHOPRA; CHANDER; SINGH, 1982), desoxirribonucleases (CHEN et al., 1993), celulase (SAPRE; JHA; PATIL, 2005), quitina diacetilase (AMORIM et al., 2005) e syncephapepsina (HO; CHEN; LIAO, 1996). Dentre essas enzimas, algumas podem apresentar interesse industrial, como é o caso de uma endoglucanase termotolerante caracterizada por Wonganu et al. (2008). Ainda nesse contexto, Cerniglia (1997) afirma que *S. racemosum* é capaz de oxidar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, como fenantreno, pireno, benzantraceno e benzopireno.

Figura 1- *Syncephalastrum racemosum*



A) Colônia de *S. racemosum* em meio ágar malte 2% (MA2%). B) Detalhe da vesícula terminal. C) Vesícula portando merosporângios. D) Esporangióforos com vesículas portando ou não merosporângios; também é possível observar a presença de merósporos. E) Desenho esquemático de *S. racemosum*, modificado de Hoog et al. (2000). Fonte: As imagens de B a D foram cedidas por Ana Maria Lima Correia. As imagens A e E foram elaboradas pela autora.

2.5 Controle de formigas cortadeiras

Devido à influência que exercem no ambiente em que ocorrem, as formigas cortadeiras podem ser consideradas espécies chave, contribuindo para a diversidade,

produtividade, ciclagem de nutrientes e energia. Além disso, essas formigas modulam a disponibilidade de recursos (de forma direta ou indireta) para outras espécies, através da mudança física de componentes bióticos e abióticos. Nesse sentido, a atividade das formigas cortadeiras altera as propriedades do solo, promovendo aeração, drenagem e penetração de raízes, aumentando a quantidade de matéria orgânica e a mineralização de nutrientes (FOWLER et al., 1989; DELLA LUCIA; GANDRA; GUEDES, 2014). Apesar da importância ecológica, devido à grande quantidade de folhas forrageadas, as formigas cortadeiras são consideradas pragas, especialmente em ambientes alterados pelas atividades antrópicas, como nas áreas utilizadas para agricultura ou reflorestamento (DELLA LUCIA; SOUZA, 2011; OLIVEIRA et al., 2011; DELLA LUCIA; GANDRA; GUEDES, 2014).

Considerando as adaptações apresentadas pelas formigas cortadeiras, os métodos de controle e manejo desses insetos diferem daqueles normalmente requeridos para o controle das demais pragas. Dessa forma, o controle das formigas deve levar em conta sua organização social, o forrageio e cultivo de fungo, comportamentos de higienização e a complexidade estrutural do ninho. Nesse contexto, os agentes de controle (químicos ou biológicos) que resultem na morte da rainha, ou que causem um impacto substancial nas castas responsáveis pelos cuidados relacionados à rainha, larvas, pupas e ao jardim de fungo, apresentam maior probabilidade de serem efetivos no controle desses insetos (DELLA LUCIA; GANDRA; GUEDES, 2014).

Para o controle das formigas cortadeiras, têm sido estudados diversos métodos culturais, físicos, químicos e biológicos, sendo o controle químico o método mais amplamente utilizado, por ser considerado mais eficiente em aplicações em larga escala (OLIVEIRA et al., 2011). O emprego de inseticidas químicos pode ser realizado a partir da aplicação de pós secos (à base de clorpirifós, deltametrina, malation, fention), fumigação, termonebulização ou pelo oferecimento de iscas tóxicas (DELABIE, 1989; OLIVEIRA et al., 2011). Dentre esses métodos, o uso de iscas tóxicas granuladas pode ser considerado o mais empregado (NAGAMOTO, 2003; DELLA LUCIA; GANDRA; GUEDES, 2014).

A composição da isca tóxica consiste na dissolução do ingrediente ativo em óleo de soja refinado, seguida da incorporação a um substrato atrativo (em geral, polpa cítrica desidratada) e formação dos *pellets* (BOARETTO; FORTI, 1997; OLIVEIRA et al., 2011; BUENO, 2013). As iscas são distribuídas próximas às trilhas e orifícios de abertura da colônia, de forma que as operárias colem essas iscas e as introduzam no ninho. No interior da colônia, as iscas são incorporadas ao jardim de fungo e, durante esse processo, as operárias mínimas (jardineiras) e generalistas são contaminadas. A morte de uma grande quantidade de

operárias relacionadas com a manutenção do jardim de fungo resulta na escassez de recursos nutricionais e contaminação por outros micro-organismos, levando à morte da colônia. Assim, o inseticida é incorporado no ciclo alimentar da colônia, atuando através da ingestão (LOECK; NAKANO, 1984; BOARETTO; FORTI, 1997; NAGAMOTO et al., 2004; DELLA LUCIA; GANDRA; GUEDES, 2014).

Ainda que outros compostos também sejam utilizados na formulação das iscas (como fipronil e clorpirifós), a sulfluramida (p. ex. o inseticida comercial Mirex-S[®]) é amplamente empregada para esse fim, devido à sua eficiência na eliminação de colônias de diversas espécies de formigas cortadeiras (OLIVEIRA et al., 2011). A sulfluramida (N-etil perfluooctano sulfonamida) é um derivado do perfluooctano sulfônico (PFOS), que atua como um desacoplador da fosforilação oxidativa, através do rompimento do gradiente de prótons (H^+); desse modo, ocorre uma interrupção do fluxo de elétrons na matriz mitocondrial, cessando, consequentemente, a produção de ATP, levando o inseto à morte (BOARETTO; FORTI, 1997; TOMLIN, 2006; SANTOS et al. 2007; BUENO, 2013). O PFOS, assim como outros compostos perfluorinados, são inertes térmica, química e bioquimicamente, devido às fortes ligações covalentes que ocorrem entre os átomos de flúor e carbono (tal ligação é considerada a mais forte das ligações orgânicas), produzindo uma elevada eletronegatividade e polaridade. Assim, as ligações fortes entre carbono e flúor requerem uma elevada energia para serem rompidas, que geralmente não é encontrada na natureza, conferindo, assim, resistência aos diversos caminhos de degradação (TOMLIN, 2006; ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2002; COMISSÃO DE REVISÃO DOS POPs, 2006; GOOSEY, 2010).

Desse modo, como o PFOS não sofre hidrólise, fotólise ou biodegradação sob condições ambientais, este apresenta um efeito bioacumulativo no ambiente. Tanto a exposição crônica quanto a aguda podem resultar em efeitos tóxicos, levando a perturbações no funcionamento dos órgãos, alterações no desenvolvimento embrionário e fetal e distúrbios endócrinos em organismos não alvo (BOSSI et al., 2005; PEDEN-ADAMS et al., 2008; GOOSEY, 2010). Por ser um composto persistente e tóxico, o PFOS foi considerado um Poluente Orgânico Persistente (POP) de uso restrito pela Convenção de Estocolmo (Anexo B da Conferência das Partes - COP4-SC4/17), sendo seu uso permitido somente em casos onde não existam alternativas viáveis (CONFERÊNCIA DAS PARTES, 2009; GOOSEY, 2010).

Nesse contexto, o controle biológico pode ser uma estratégia mais sustentável e menos agressiva ao meio ambiente. Entretanto, essa abordagem ainda requer o estudo de diversos aspectos biológicos básicos, para que tais alternativas possam ser aplicadas sem resultar em

danos ambientais, como aplicação de compostos naturais tóxicos ou introdução de espécies exóticas (BOARETTO; FORTI, 1997; DELLA LUCIA; GANDRA; GUEDES, 2014). Alguns dos inimigos naturais poderiam ser utilizados nessa forma de controle, como forídeos, aranhas, ácaros, formigas predadoras e coleópteros (como *Canthon virens* e *Canthon dives*, que atacam a rainha logo após a revoada). Adicionalmente, extratos de diversas plantas já foram avaliadas como possíveis compostos ativos para aplicação em iscas, como *Sesamum indicum*, *Ricinus communis*, *Canavalia ensiformis*, *Ipomoea batatas*, *Cedrela fissilis*, *Cepadessa fruticosa*, *Azadirachta indica* e *Carapa guianensis* (BUENO; BUENO, 2011), porém, esses extratos apresentam como alvo não somente a formiga, mas também o fungo mutualista.

O uso de fungos com potencial patogênico ou antagonista contra as formigas ou seu fungo mutualista consiste em uma estratégia promissora de biocontrole, podendo ser utilizados no desenvolvimento de pesticidas biológicos específicos e econômicos (LOPEZ; ORDUZ, 2003; FOLGARAIT et al., 2011; DELLA LUCIA; GANDRA; GUEDES, 2014).

Conforme salientaram Boaretto e Forti (1997), é necessário conhecer diversos aspectos biológicos do mutualismo entre as formigas cortadeiras e *L. gongylophorus*, assim como dos demais organismos que participem dessa interação (p. ex. *Escovopsis* e outros fungos), para que uma estratégia efetiva de controle seja elaborada. Desse modo, o levantamento da diversidade de fungos no interior das colônias é fundamental para a triagem de possíveis agentes de controle biológico. Adicionalmente, a interação entre tais micro-organismos deve ser considerada, a fim de determinar a existência de efeitos sinérgicos ou antagônicos que poderiam interferir na eficiência do método. Assim, além do uso de fungos potencialmente patogênicos, alguns estudos utilizaram o consórcio de fungos, na tentativa de encontrar efeitos sinérgicos que poderiam acelerar a morte da colônia. Nesse cenário, Lopez e Orduz (2003) demonstraram que iscas contendo esporos de *Trichoderma viride* e *Metarhizium anisopliae*, associados ou isoladamente, foram eficazes no controle de colônias de laboratório de *A. cephalotes*. Já Hughes e Boomsma (2004), avaliando a infecção de operárias por *M. anisopliae* e *Aspergillus flavus*, verificaram que o último suplantou a infecção por *M. anisopliae* durante os experimentos de coinfeção. Os autores interpretaram que tal resultado foi provavelmente devido à inibição do sistema imunológico das operárias por *M. anisopliae*, que, de outra forma, não permitiria a colonização por *A. flavus*.

Chouvenc et al. (2012) afirmam que hospedeiros sob alguma forma de estresse ou doença tornam-se mais suscetíveis a infecções por organismos não patogênicos, devido à supressão de seu sistema imunológico. O crescimento de *S. racemosum* em ninhos tratados

com iscas à base de sulfluramida (portanto, sob estresse, RORIGUES et al., 2005), sugere que o comprometimento das defesas da colônia permitiria o estabelecimento da infecção por *S. racemosum*.

Considerando o potencial do controle biológico de formigas cortadeiras utilizando fungos, o presente estudo tentou elucidar se *S. racemosum* atua como um patógeno frente ao jardim de fungo de *A. sexdens rubropilosa*, ou se pode ser considerado um micro-organismo oportunista, que requer o comprometimento das defesas da colônia para que a infecção seja estabelecida.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a patogenicidade de *Syncephalastrum racemosum* no jardim de fungo de *Atta sexdens rubropilosa*.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar se *S. racemosum* satisfaz os postulados de Koch.
- Determinar se *S. racemosum* pode atuar como um patógeno facultativo, apresentando colonização oportunista em subcolônias de *A. sexdens rubropilosa*, previamente inoculadas com esporos de um fungo entomopatogênico (*Metarhizium anisopliae*).
- Avaliar como a presença de operárias nos jardins de fungos influencia na colonização por *S. racemosum*, tanto em colônias saudáveis, quanto em colônias previamente inoculadas com *M. anisopliae*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivo e manutenção dos fungos

Além de verificar os possíveis efeitos decorrentes da presença de *S. racemosum* no jardim de fungo, considerou-se interessante que estes pudessem ser comparados com os efeitos resultantes da presença de outros fungos também encontrados nesse ambiente. Além disso, foi questionado se o comportamento de manutenção dos jardins realizado pelas operárias poderia diferir em relação ao fungo inoculado. Assim, no Teste de Patogenicidade (item 4.2), além das linhagens de *S. racemosum* (A086b, A105, A101, H1a) também foram utilizadas linhagens de *Escovopsis* sp. (A086a), *Trichoderma virens* (17BFIII) e *Fusarium solani* (AR037). Já no Teste de Coinfecção (item 4.6), também foi utilizada uma linhagem de *M. anisopliae* (AS2).

As linhagens de *S. racemosum*, bem como a linhagem de *Escovopsis* sp. foram previamente isoladas de ninhos de *A. sexdens rubropilosa* tratados com o inseticida Mirex-S[®] no laboratório (RODRIGUES et al., 2005). Já as linhagens de *T. virens*, *F. solani* e *M. anisopliae* foram isoladas de ninhos de campo de formigas cortadeiras (Tabela 1). As culturas estoque de todas as linhagens estão preservadas em glicerol 10% a -80 °C, na Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP). As linhagens foram reativadas a partir da inoculação dos esporos criopreservados em meio Ágar Batata-Dextrose (BDA, Acumedia) e incubados a 25 °C, para verificação da pureza da cultura. Após confirmar a pureza, as culturas foram transferidas para tubos contendo Ágar Malte 2% inclinado (MA2%; em g L⁻¹: 20g de extrato de malte e 15g de ágar). Tais culturas foram mantidas a 8 °C, sendo utilizadas como estoque de trabalho durante o desenvolvimento desse estudo.

Devido ao longo tempo de preservação a -80 °C, foi realizada a recuperação da patogenicidade da linhagem AS2. Após reativação da cultura em meio BDA, foi preparada uma suspensão de esporos, padronizada à uma concentração de 10⁶ esporos mL⁻¹, em câmara de Neubauer (RODRIGUES et al., 2008). Dez operárias da casta forrageadora foram submersas nessa suspensão durante 3 segundos e, posteriormente, mantidas em placa de Petri forrada com papel filtro, acondicionadas a 25 °C, no escuro. As placas foram observadas diariamente à procura por operárias mortas. Os cadáveres foram dispostos em tubos criogênicos (2 mL) contendo algodão estéril umedecido, de modo a confirmar se a morte da operária foi ocasionada pelo fungo entomopatogênico. Assim que os conídios se tornaram visíveis na superfície das operárias, foi realizada transferência destes para placas de Petri contendo MA2% e incubados a 25 °C. Todos os experimentos realizados com a linhagem AS2 partiram da cultura com a patogenicidade revigorada.

Tabela 1- Fungos filamentosos isolados de ninhos de formigas cortadeiras (*Atta sexdens rubropilosa* e *Acromyrmex* sp.) utilizados nos experimentos desenvolvidos

CÓDIGO	FUNGO	TIPO DE NINHO	LOCAL DE COLETA	ANO DE COLETA
A086a	<i>Escovopsis</i> sp.	Ninho tratado com Myrex-S®	Corumbataí-SP	2002
A086b	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	Ninho tratado com Myrex-S®	Corumbataí-SP	2002
A105	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	Ninho tratado com Myrex-S®	Corumbataí-SP	2002
A101	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	Ninho tratado com Myrex-S®	Corumbataí-SP	2002
H1a	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	Ninho tratado com Myrex-S®	Corumbataí-SP	2003
17BFIII	<i>Trichoderma virens</i>	Ninho tratado no campo com Myrex-S®	Corumbataí-SP	2003
AR037 ¹	<i>Fusarium solani</i>	Ninho de campo de <i>Acromyrmex</i> sp.	Ilhéus-BA	2010
AS2	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Ninho tratado no campo com Myrex-S®	Corumbataí-SP	2003

¹Essa linhagens pertence a um complexo de espécies crípticas, que reúne mais de uma espécie filogenética distinta, embora apresentem características morfológicas idênticas ou semelhantes. Fonte: Dados da pesquisa.

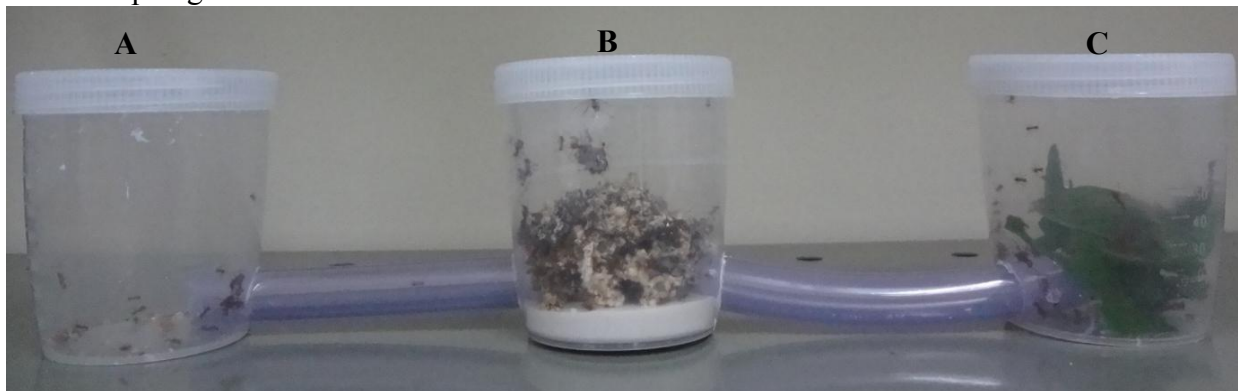
4.2 Teste de patogenicidade: empregando os postulados de Koch

Para o desenvolvimento do teste de patogenicidade foram estruturadas subcolônias de *A. sexdens rubropilosa*, compreendendo fragmentos de jardim de fungo e operárias, coletadas de uma colônia madura (14 anos) mantida no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS/UNESP/Rio Claro). As subcolônias foram acondicionadas em conjuntos de três recipientes plásticos interligados por tubos, sendo um recipiente destinado ao jardim de fungo, um recipiente para o forrageamento e outro para o material de refúgio (ou lixo) da subcolônia (Figura 2). Os recipientes consistiam em coletores universais de 80 mL (JProlab), nos quais foram feitos orifícios de 0,5 cm de diâmetro e conectados com tubos plásticos. Os tubos utilizados apresentavam parede de 2 mm, para que não pudessem ser cortados pelas operárias. Para manter a umidade do jardim de fungo, uma camada de aproximadamente 1 cm de espessura de gesso foi adicionada no recipiente central. Além disso, para evitar que as operárias deixassem as subcolônias, foi aplicada uma fina camada de Teflon® (Politetrafluoretileno) nas bordas dos recipientes.

Devido ao tamanho dos recipientes, as operárias de castas maiores, como soldados (cápsula cefálica com aproximadamente 3,0 mm) e forrageadoras (cápsula cefálica com 2,0 a 2,2 mm) foram excluídas, embora algumas forrageadoras tenham permanecido em algumas subcolônias. A separação das castas foi realizada segundo o proposto por Souza et al. (2011).

A quantidade de jardim de fungo adicionada foi padronizada a partir da graduação do coletor universal (o jardim foi adicionado até atingir o nível de 50 mL do coletor).

Figura 2- Conjunto de três recipientes plásticos componentes das subcolônias utilizadas para o teste de patogenicidade



A) Recipiente destinado ao material de refugio. B) Recipiente destinado ao jardim de fungo. C) Recipiente destinado para as folhas frescas (forrageamento das operárias). Fonte: Elaborada pela autora.

Para os experimentos compreendendo subcolônias com operárias e jardim de fungo, foram estruturadas em média doze réplicas para cada linhagem de fungo testada, sendo estas mantidas em condições controladas (25 °C, no escuro) por um período de cinco dias antes do teste de patogenicidade. Durante o período de aclimação, a manutenção do jardim foi realizada por meio da adição de folhas de hibisco na câmara de forrageio. Esse período de aclimação permitiu que as operárias reestruturassem o jardim e retornassem às suas atividades normais (forrageio e incorporação de substrato ao jardim de fungo). Por outro lado, as subcolônias na ausência de operárias não passaram pelo processo de aclimação, já que a falta de manutenção e higienização permitiria o crescimento de micro-organismos contaminantes, resultando na morte do jardim. Essas subcolônias foram estruturadas um dia antes do teste de patogenicidade, onde as operárias foram removidas do jardim com auxílio de uma pinça estéril. Assim, para os experimentos abrangendo somente o jardim de fungo, foram estruturadas cinco subcolônias para cada linhagem testada.

Após o período de aclimação, as subcolônias foram submetidas ao teste de patogenicidade (comprovação dos postulados de Koch). O experimento foi desenvolvido em dois grupos teste e um grupo controle (Tabela 2), cada um apresentando cinco réplicas (i.e. subcolônias).

Tabela 2- Desenho experimental dos ensaios para o teste de patogenicidade de *Syncephalastrum racemosum*, *Trichoderma harzianum*, *Escovopsis* sp. e *Fusarium solani*, em subcolônias de *Atta sexdens rubropilosa*

Grupo	Descrição
I	Cinco subcolônias contendo jardim de fungo e operárias generalistas e mínimas. Foi inoculado 1 mL de solução de 0,05% de Tween 80 na superfície do jardim.
II	Cinco subcolônias contendo jardim de fungo e operárias generalistas e mínimas. Foi inoculado 1 mL de suspensão padronizada a 10^6 esporos.mL ⁻¹ (de cada fungo) na superfície do jardim.
III	Cinco subcolônias contendo apenas jardim de fungo, sem operárias. Foi inoculado 1 mL de suspensão padronizada a 10^6 esporos.mL ⁻¹ (de cada fungo) na superfície do jardim.

Fonte: Dados da pesquisa

As aplicações em cada grupo ocorreram como descrito a seguir:

- a) Grupo I: Foi inoculado 1 mL de solução Tween 80 (0,05%) na superfície de todo o jardim de fungo, com o auxílio de uma micropipeta. A solução foi gotejada, para que a maior superfície possível de jardim pudesse ser atingida. Assim que a solução foi parcialmente absorvida, cinco fragmentos com aproximadamente 5mm² de jardim foram removidos e transferidos para uma placa de Petri contendo meio MA2%, suplementado com 150 µg mL⁻¹ de cloranfenicol (Sigma). As placas foram incubadas a 25 °C, no escuro, sendo posteriormente analisadas a fim de determinar se houve crescimento de micro-organismos.
- b) Grupos II e III: Foi preparada uma suspensão de esporos em solução de 0,05% de Tween 80, sendo padronizadas a uma concentração de 10^6 esporos mL⁻¹, em câmara de Neubauer (RODRIGUES et al., 2008a). A suspensão foi agitada, e, então inoculada diretamente na superfície do jardim de fungo, com auxílio de uma micropipeta. A solução foi gotejada, para que a maior superfície possível de jardim pudesse ser atingida. Assim que a solução foi parcialmente absorvida, cinco fragmentos com aproximadamente 5mm² de jardim foram removidos e transferidos para meio MA2%, suplementado com 150 µg mL⁻¹ de cloranfenicol (Sigma). As placas foram incubadas a 25 °C, no escuro, e posteriormente analisadas a fim de verificar a presença do fungo inoculado.

Os isolamentos foram realizados a cada 24 horas, até o experimento completar 72 horas. Os fragmentos removidos foram inoculados em MA2% e, após incubação, foram

examinados em microscópio óptico a fim de confirmar a identidade do fungo. Em seguida, o número de fragmentos nos quais houve crescimento do fungo inoculado foi contabilizado. A análise estatística para avaliar as diferenças observadas no número de fragmentos contendo *S. racemosum* foi realizada através do teste qui-quadrado utilizando o *software* R v.3.0.1.

4.3 Filmagem de subcolônia infectada com *Syncephalastrum racemosum*

A partir dos resultados observados no Teste de Patogenicidade (item 5.1), a linhagem H1A foi selecionada para ser utilizada nos demais experimentos, uma vez que apresentou maior agressividade frente ao jardim de fungo (em relação às demais linhagens de *S. racemosum* testadas).

Na tentativa de verificar as respostas comportamentais das operárias frente à contaminação do jardim de fungo com *S. racemosum*, foi realizada a filmagem de uma subcolônia de *A. sexdens rubropilosa* infectada por esse fungo. A subcolônia foi estruturada e mantida em condições semelhantes àsquelas do Teste de Patogenicidade (item 4.2).

Após o período de aclimação, a subcolônia foi infectada com esporos de *S. racemosum*. Para tanto, foi preparada uma suspensão de esporos da linhagem H1a em solução de 0,05% de Tween 80, a uma concentração de 10^6 esporos mL^{-1} , padronizada em câmara de Neubauer. Após agitação, 1 mL da suspensão foi inoculado na superfície do jardim de fungo com auxílio de uma micropipeta.

A fim de facilitar a visualização do jardim de fungo e das eventuais alterações nas atividades das operárias, uma placa de vidro foi disposta na abertura do recipiente destinada ao jardim de fungo. A filmagem foi realizada utilizando-se uma câmera de vídeo digital Sony Handycam HDR-CX150, por um período aproximado de 9 horas. No entanto, considerando que um vídeo resultante de 9 horas de filmagem ultrapassaria a capacidade de memória da câmera, optou-se por acompanhar o experimento durante o período de execução, filmando-se intervalos correspondentes a eventos considerados relevantes. Os vídeos foram editados nos *softwares* PMB (Sony, versão 5.2) e Windows Movie Maker 2012.

4.4 Determinação da Dose Letal Mediana (LD₅₀) de *Metarhizium anisopliae*

A Dose Letal Mediana (LD₅₀) de *M. anisopliae* foi determinada com a finalidade de especificar a concentração de esporos a ser utilizada no teste de coinfeção (item 4.6), bem como o período pelo qual o experimento deveria ser conduzido. Foram utilizadas operárias da casta forrageadora (cápsula cefálica com aproximadamente 2,0 a 2,2 mm), separadas segundo o proposto por Souza et al. (2011). Tais operárias foram obtidas a partir de uma colônia madura de *A. sexdens rubropilosa* (sete anos), mantida no CEIS. As operárias foram coletadas com auxílio de uma pinça entomológica, sendo transferidas para uma bandeja com as bordas revestidas por camada fina de Teflon®, a fim de evitar que as operárias fugissem. No momento da coleta, um pedaço de algodão umedecido foi disposto na bandeja, para reduzir o estresse causado pela transferência.

Baseando-se nos experimentos desenvolvidos por Hughes et al. (2004) foi preparada uma suspensão inicial de esporos de *M. anisopliae* em Tween 80 (0,005%), contendo aproximadamente 10⁹ esporos mL⁻¹ (concentração padronizada em câmara de Neubauer), sendo esta agitada a fim de garantir a homogeneização. Essa suspensão foi serialmente diluída para que fossem obtidas suspensões com concentrações na ordem de 10⁸, 10⁷, 10⁶, 10⁵, 10⁴ e 10³ esporos mL⁻¹. Com auxílio de uma micropipeta, foi aplicado 1 µL de cada suspensão no pronoto das operárias. Após a aplicação, as operárias foram mantidas em grupos de 10 por placa de Petri (estas forradas com papel filtro esterilizado), sendo utilizadas 5 placas por concentração de esporos, totalizando 50 operárias por concentração (Figura 3A). Com o intuito de verificar agressividade do método, o mesmo procedimento foi realizado com 1 µL de Tween 80 (0,005%). Além disso, para determinar a influência das condições de acondicionamento, foi mantido um grupo sem nenhum tratamento. Para a manutenção das operárias durante o experimento, foi oferecida aproximadamente 0,1g de dieta sólida (5% de glicose, 1% de peptona bacteriológica, 0,1% de extrato de levedura e 1,5% de ágar bacteriológico), trocada diariamente a fim de garantir recursos nutricionais e evitar contaminação (BUENO et al., 1995). As placas foram acondicionadas durante 25 dias em BOD, a 25 °C, no escuro, com aproximadamente 80% de umidade relativa. As operárias mortas foram superficialmente esterilizadas através de submersão em álcool 70% durante 3 segundos e dispostas em tubos criogênicos (2 mL) contendo algodão estéril umedecido (Figura 3B), de modo a confirmar se a morte da operária foi ocasionada pelo fungo entomopatogênico (Figura 3C). Essa confirmação foi realizada examinando se ocorreu a

esporulação do fungo inoculado nos cadáveres. Foram obtidas imagens de algumas operárias mortas através dos *softwares* IM50 (Leica Microsystems) e Auto-Montage (Syncroscopy).

Adicionalmente, a fim de determinar a real quantidade de esporos da linhagem AS2 viáveis na suspensão (i.e, a quantidade de esporos capazes de infectar as operárias), foi realizado um teste de viabilidade de esporos. O ensaio foi realizado inoculando-se 100 μL da suspensão de concentração 10^3 esporos mL^{-1} em meio MA2%. Foram inoculadas três placas, acondicionadas a 25 °C e analisadas entre 12 e 48 horas.

Figura 3- Condições de acondicionamento das operárias para o teste LD_{50} .



A) Operárias mantidas em placas forradas com papel filtro, com dieta sólida substituída diariamente. B) Operária morta disposta em tubo criogênico C) Confirmação da causa da morte da operária por *Metarhizium anisopliae* (observar cadáver de operária recoberto com esporulação do fungo). Fonte: Elaborada pela autora.

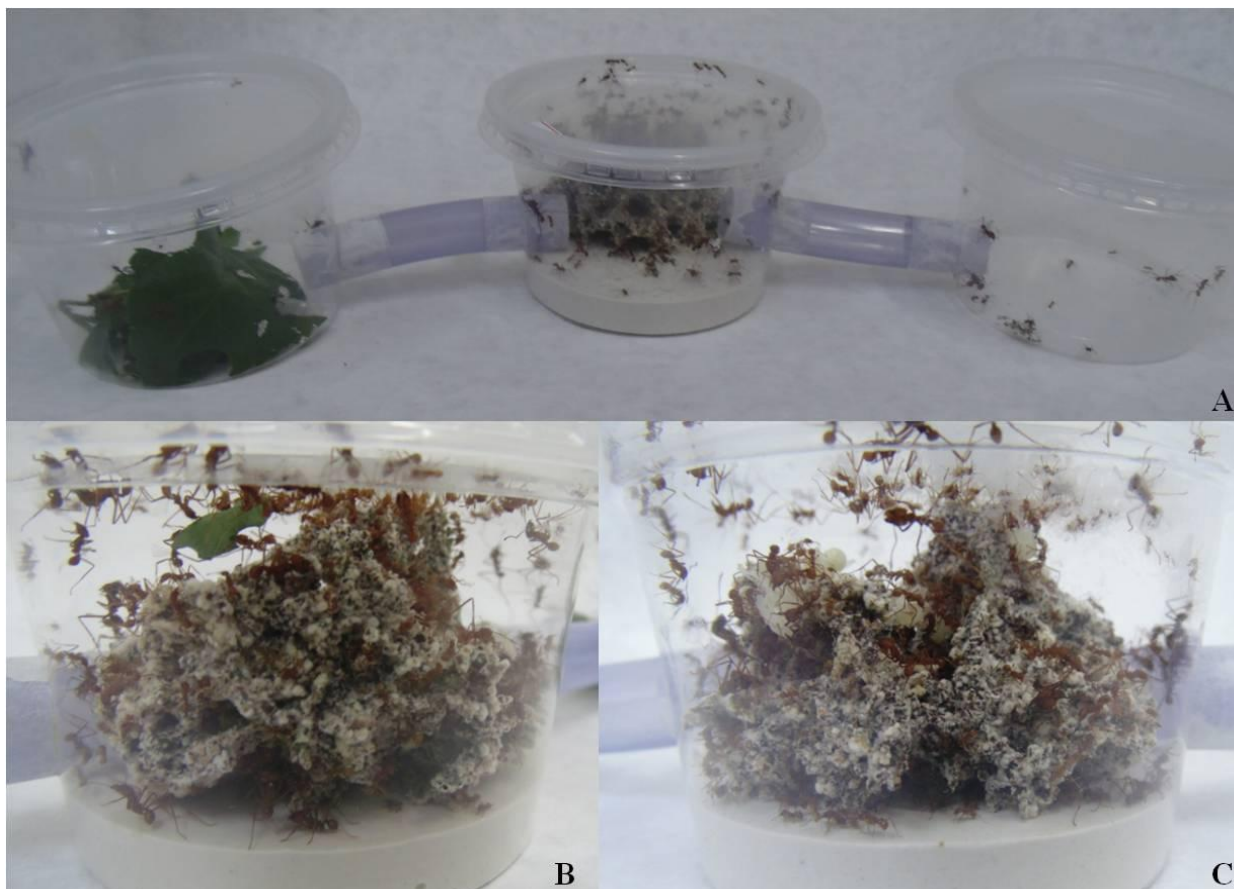
A comparação entre as curvas de sobrevivência das operárias nos diferentes tratamentos foi realizada utilizando-se o teste *log-rank* (MOTULSKY, 1995), utilizando o *software* Graph-Pad Prism v 3.0.

4.5 Teste de coinfecção: ensaio piloto

Foi elaborado um teste piloto a fim de determinar alguns parâmetros e condições de acondicionamento, bem como avaliar a viabilidade do método. Embora o método proposto neste estudo não tenha sido encontrado na literatura, alguns aspectos foram baseados no experimento desenvolvido por Jaccoud e colaboradores (1999). As subcolônias de *A. sexdens rubropilosa* foram mantidas de forma semelhante às subcolônias anteriormente descritas para o Teste de Patogenicidade (item 4.2), alterando-se somente o tamanho do recipiente e dos tubos plásticos. Foram utilizados potes plásticos descartáveis de 250 mL, nos quais foram feitos orifícios de 1,6 cm, conectados por tubos plásticos com 2 mm de parede.

As subcolônias de *A. sexdens rubropilosa* foram elaboradas com fragmentos de jardim de fungo e operárias coletadas de uma colônia madura (14 anos de idade) de *A. sexdens rubropilosa*, mantida no CEIS. O jardim de fungo foi disposto na câmara central e, embora a quantidade (em massa) do jardim ainda não tivesse sido determinada nessa etapa do experimento, esta foi padronizada como duas colheres e meia (de sopa) de jardim por subcolônia. Na tentativa de manter a subcolônia o mais próximo possível das condições naturais de um ninho (e assegurar a viabilidade biológica dos possíveis resultados), as operárias não foram selecionadas, sendo adicionadas operárias de todas as castas, bem como ovos e larvas em diversos estágios de diferenciação (Figura 4). A manutenção do jardim foi realizada por meio da adição de folhas de hibisco na câmara de forrageio. As folhas foram substituídas a cada dois dias. Foram estruturadas seis subcolônias, sendo estas mantidas em condições controladas (25 °C, no escuro) por um período de cinco dias antes do teste.

Figura 4- Composição da subcolônia utilizada nos testes de coinfeção.



A) Visão geral da subcolônia, com recipientes destinados ao jardim de fungo, forrageio e deposição de lixo. B) Operárias executando a manutenção e incorporação de substrato vegetal durante o período de aclimação. C) Presença de ovos e pupas em diversos estágios de diferenciação, assim como operárias de diferentes castas. Fonte: Elaborada pela autora.

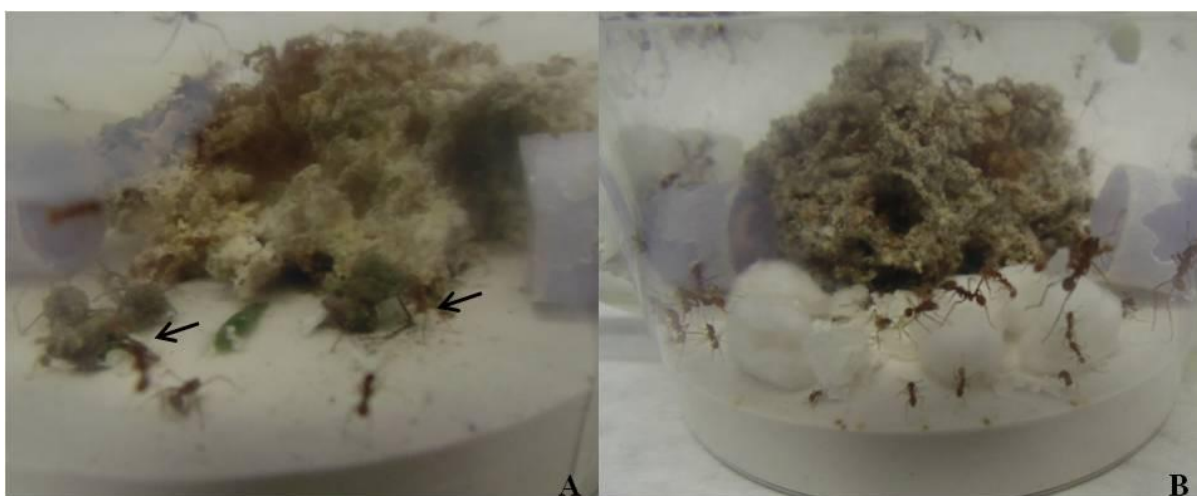
De acordo com Hughes et al. (2004), a contaminação de operárias por esporos de *M. anisopliae* ocorre naturalmente por meio de cadáveres esporulando ou por esporos dispersos no solo. Dessa forma, para o primeiro grupo testado ($n = 2$ subcolônias), foram utilizadas as operárias mortas como resultado do Teste de Determinação da Dose Letal Mediana (LD_{50}) de *M. anisopliae* (item 4.4), sendo selecionadas algumas das quais apresentavam elevada densidade de esporos. Foram utilizadas 5 operárias mortas por subcolônia. Adicionalmente, 1 mL de suspensão de esporos de *S. racemosum* H1a, a uma concentração de 10^6 esporos mL^{-1} , foi inoculado na superfície do jardim de fungo (Figura 5A).

Em relação ao segundo grupo testado, tentou-se simular a presença de "esporos dispersos no solo", através de bolas de algodão esterilizadas, nas quais foram inoculados 200 μL de suspensão de esporos de *M. anisopliae*, a uma concentração de 10^6 esporos mL^{-1} (Figura 5B). Em cada subcolônia, foram adicionadas 5 bolas de algodão, totalizando 1 mL de

suspensão de esporos. Adicionalmente, 1 mL de suspensão de esporos de *S. racemosum* H1a, a uma concentração de 10^6 esporos mL^{-1} , foi inoculado na superfície do jardim de fungo.

Devido à alteração no tamanho dos recipientes, considerou-se interessante que uma subcolônia fosse mantida sem tratamento (grupo controle), a fim de determinar o período necessário para que houvesse recuperação das atividades normais de forrageamento e incorporação de substrato vegetal ao jardim de fungo, parâmetros que foram considerados na aclimação das subcolônias do Teste de coinfeção (item 4.6).

Figura 5- Piloto do teste de coinfeção.



A) Teste utilizando 5 operárias mortas e recobertas com esporos de *Metarhizium anisopliae* (setas), juntamente com 1 mL de suspensão de esporos de *S. racemosum* (10^6 esporos mL^{-1}) inoculada no jardim. B) Teste utilizando suspensão de esporos de *M. anisopliae* (10^6 esporos mL^{-1}) aplicados em bolas de algodão, juntamente com 1 mL de suspensão de esporos de *S. racemosum* (10^6 esporos mL^{-1}) inoculada no jardim. Fonte: Elaborada pela autora.

4.6 Teste de coinfeção

Para o desenvolvimento do teste de coinfeção, foram confeccionadas 26 subcolônias de *A. sexdens rubropilosa* e mantidas nas condições mencionadas no item 4.5 (Figura 4). Nessa etapa, a quantidade de jardim adicionada foi padronizada em 1,5 colher de sopa (correspondendo a aproximadamente 1 g). As subcolônias foram mantidas em condições controladas durante 12 dias antes do teste, para que as operárias pudessem retomar suas atividades normais (período de aclimação). Durante o período de aclimação, a manutenção do jardim foi realizada por meio da adição de folhas de hibisco na câmara de forrageio, estas trocadas a cada dois dias.

As subcolônias foram distribuídas em 4 grupos contendo 5 subcolônias selecionadas aleatoriamente. Em cada grupo foi aplicado um tratamento, conforme descrito a seguir:

- a) Grupo I: Foram inoculados 2 mL de solução Tween 80 (0,005%) na superfície de todo o jardim de fungo, com o auxílio de um borrifador, para que a maior superfície possível do jardim pudesse ser atingida.
- b) Grupo II: Foi preparada uma suspensão de esporos de *S. racemosum* em solução de 0,005% de Tween 80, padronizada a uma concentração de 10^6 esporos mL^{-1} , em câmara de Neubauer (RODRIGUES et al., 2008a). A suspensão foi agitada, e 2 mL foram inoculados diretamente na superfície do jardim de fungo, com auxílio de um borrifador.
- c) Grupo III: Foi preparada uma suspensão de esporos de *M. anisopliae* em solução de 0,005% de Tween 80, padronizada a uma concentração de 10^8 esporos mL^{-1} , em câmara de Neubauer. Essa concentração foi determinada de acordo com os resultados do teste LD_{50} . A suspensão foi agitada, e, então 2 mL foram inoculados diretamente na superfície do jardim de fungo, com auxílio de um borrifador.
- d) Grupo IV: Foi preparada uma suspensão de esporos de *S. racemosum* (10^6 esporos mL^{-1}) e *M. anisopliae* (10^8 esporos mL^{-1}), em solução de 0,005% de Tween 80, em câmara de Neubauer. A suspensão foi agitada, e 2 mL foram inoculados diretamente na superfície do jardim de fungo, com auxílio de um borrifador.

Após a aplicação do tratamento, as subcolônias foram mantidas durante 14 dias nas mesmas condições em que estavam durante o período de aclimação, e a manutenção destas (troca de folhas) foi realizada a cada dois dias. Adicionalmente, após 72 horas de tratamento, foram removidos 5 fragmentos com aproximadamente 5 mm^2 do jardim e do lixo, sendo transferidos para uma placa de Petri contendo MA2%, suplementado com $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cloranfenicol. As placas foram mantidas a 25°C no escuro, sendo posteriormente analisadas a fim de determinar o crescimento dos micro-organismos inoculados. Além disso, 20 operárias mortas de cada teste foram dispostas em tubos criogênicos (2 mL) contendo algodão estéril umedecido, de modo a confirmar se a morte das mesmas ocorreu devido à contaminação por *M. anisopliae*.

O experimento descrito acima foi realizado duas vezes, com um intervalo de aproximadamente 5 semanas, a fim de validar os resultados encontrados e detectar possíveis interferências externas. As subcolônias foram avaliadas durante 14 dias, a partir das observações dos seguintes aspectos: corte de folhas, mortalidade de operárias, condições gerais da subcolônia e separação de lixo. Tais itens foram considerados com base na escala de quantificação (escores), apresentada na Tabela 3.

Tabela 3- Quantificação das alterações no corte, mortalidade, condições gerais e lixo separado nas subcolônias tratadas.

Aspecto considerado	Escore	Descrição	Imagem
Corte	0	Normal Há corte em quantidades normais e incorporação no jardim de fungo, onde a maioria dos fragmentos cortados é incorporada.	
	1	Pouca alteração Até 25% de alteração; nesse caso, há corte em quantidade normal, mas a incorporação é reduzida, o que é observado a partir de fragmentos de folhas cortados e não incorporados, deixados na câmara de forrageio.	
	2	Alteração média Até 50% de alteração; nesse caso, o corte é reduzido e não há incorporação do material vegetal no jardim de fungo.	
	3	Elevada alteração Até 75% de alteração. O corte é significativamente reduzido, sendo que somente fragmentos pequenos são visíveis, não havendo incorporação.	

- 4** **Alteração completa**
- Corte completamente alterado ou morte da colônia. Não há corte ou incorporação



Mortalidade	0	Normal	*
		Operárias mortas em quantidade semelhante ao que ocorre em subcolônias na ausência de tratamento	
	1	Pouca mortalidade	*
		Mortalidade um pouco acima do normal com até 25% das operárias mortas.	
	2	Mortalidade média	*
		Aproximadamente metade da população de operárias da subcolônia estão mortas ou morrendo.	
	3	Elevada mortalidade	*
		Mortalidade significativa, quando até 75% da população de operárias está morta ou morrendo.	
	4	Mortalidade completa	*
		Todas as operárias da subcolônia estão mortas ou morrendo.	
Condições gerais da subcolônia	4	Normal	
		Colônia apresenta quantidade normal de lixo e atividades de corte, incorporação e manutenção, com crescimento do jardim de fungo	



3

Pouca alteração

A colônia apresenta uma quantidade de lixo de até 25% do volume inicial, com relativa redução nas atividades de corte e incorporação (esta última é mais significativa). Não há crescimento do jardim. A mortalidade das operárias é superior (até 25%) ao considerado "normal".



2

Alteração média

Até 50% de redução das atividades de corte, não havendo incorporação. O lixo pode compreender até 50% do volume inicial do jardim de fungo. A mortalidade de operárias também pode atingir até 50%. Em alguns pontos, o jardim pode apresentar um aspecto envelhecido (mais escuro).



1

Elevada alteração

Até 75% de redução das atividades de corte, sem incorporação e manutenção do jardim. O lixo compreende até 75% do volume inicial do jardim. O jardim apresenta aspecto seco e envelhecido, e as operárias apresentam elevada mortalidade (até 75%).



0

Colônia morta

Jardim de fungo morto, com poucas ou nenhuma operária viva.



Lixo	0	Normal Sem alterações em relação à colônias sem tratamento.	
	1	Pouca alteração Quantidade de lixo compreende até 25% do volume inicial do jardim de fungo.	
	2	Alteração média Quantidade de lixo compreende até 50% do volume inicial do jardim de fungo.	
	3	Elevada alteração Quantidade de lixo compreende até 75% do volume inicial do jardim de fungo.	
	4	Colônia morta O lixo compreende todo o jardim e as operárias mortas.	

* Por constituir um aspecto quantitativo, além das dificuldades da obtenção de imagens que representassem adequadamente a quantidade de operárias mortas, tais imagens não foram adicionadas.
 Fonte: Dados da pesquisa.

5 RESULTADOS

5.1 Teste de patogenicidade

Os postulados de Koch foram avaliados a fim de determinar a patogenicidade dos fungos testados. Para tanto, esporos de fungos isolados de colônias comprometidas (Tabela 1) foram aplicados em subcolônias saudáveis, posteriormente, fragmentos do jardim de cada subcolônia foram isolados em diferentes períodos. O número de fragmentos contaminados foi analisado com base nas seguintes questões: (i) A presença das formigas influencia na recuperação de *S. racemosum* nos jardins ao longo do tempo? (ii) O tipo de substrato (jardim ou lixo) afeta a probabilidade de recuperação de fragmentos contendo *S. racemosum*? As mesmas questões guiaram a análise dos resultados dos demais fungos testados (Tabela 1). A fim de determinar a influência exercida pela presença de operárias nos jardins, foi aplicado o teste de qui-quadrado (DYTHAM, 2011) para verificar a independência das variáveis (presença de operárias x probabilidade de recuperação de fragmentos contaminados, Tabela 4). A hipótese nula prevê que a presença de formigas não influencia na proporção do fungo recuperado, enquanto que a hipótese alternativa prevê que a presença de formigas influencia a proporção de fungos recuperados.

Tabela 4- Resultados do teste qui-quadrado para as comparações entre os jardins de fungo e lixo para as linhagens de *Syncephalastrum racemosum*, *Trichoderma virens*, *Escovopsis* sp. e *Fusarium solani*.

Linhagens	JP – JA *	JP – LP *
<i>S. racemosum</i> A086b	$\chi^2 = 21,1613$ p= 0,065	$\chi^2 = 62,9156$ p< 0,001
<i>S. racemosum</i> A105	$\chi^2 = 25,525$ p= 0,008	$\chi^2 = 64,2797$ p< 0,001
<i>S. racemosum</i> A101	$\chi^2 = 19,3798$ p< 0,001	$\chi^2 = 51,0015$ p< 0,001
<i>S. racemosum</i> H1a	$\chi^2 = 22,211$ p= 0,040	$\chi^2 = 59,0595$ p< 0,001
<i>T. virens</i> 17BFIII	$\chi^2 = 23,0144$ p= 0,027	$\chi^2 = 63,0444$ p< 0,001
<i>Escovopsis</i> sp. A086a	$\chi^2 = 0,8746$ p= 0,8315	$\chi^2 = 29,9314$ p= 0,00035
<i>F. solani</i> AR037	$\chi^2 = 5,3371$ p= 0,1487	$\chi^2 = 40,3294$ p= 0,0011

* JP: Jardim na presença de operárias. JA: Jardim na ausência de operárias. LP: Lixo na presença de operárias. Os valores foram considerados significativos quando p< 0,05. Fonte: Dados da pesquisa.

A partir das informações elencadas na Tabela 4, observou-se que para três linhagens de *S. racemosum* (A105, A101 e H1a) e para a linhagem de *T. virens* (17BFIII), a presença de operárias influenciou significativamente a proporção de fungos recuperados dos jardins, havendo a tendência de recuperação de um menor número de fragmentos com o fungo inoculado nos jardins com operárias. Por outro lado, a proporção de fragmentos contaminados foi semelhante em jardins na ausência e presença de operárias quando inoculados com as linhagens *S. racemosum* (A086b), *E. weberi* (A086a) e *F. solani* (AR037), indicando que, provavelmente, as operárias não foram capazes de remover completamente esses fungos do jardim (Tabela 4). No caso da infecção com *F. solani* e *T. virens*, as operárias armazenaram o lixo na própria câmara do jardim, o que pode ter influenciado na recuperação de fragmentos infectados (ou seja, aumentando as chances de recuperar fragmentos contaminados dos jardins). Esses dados também são graficamente reportados na Figura 6, a qual demonstra a dinâmica da infecção ao longo do tempo. A análise desses dados permite observar que algumas linhagens são inicialmente removidas, porém voltam a aparecer no jardim em 72 horas de tratamento (Figuras 6A, 6B, 6E). Enquanto uma linhagem foi removida em 72 horas de tratamento (Figura 6D), outras linhagens não foram removidas do jardim de fungo durante todo o período do experimento (Figuras 6C, 6F, 6G). As diferenças morfológicas dos jardins de fungo na presença e na ausência de operárias, quando submetidos a tratamentos com esporos de fungos podem ser observadas na Figura 7.

Figura 6- Porcentagem de fragmentos de jardins de fungo, na presença e na ausência de operárias, que apresentaram crescimento de fungos

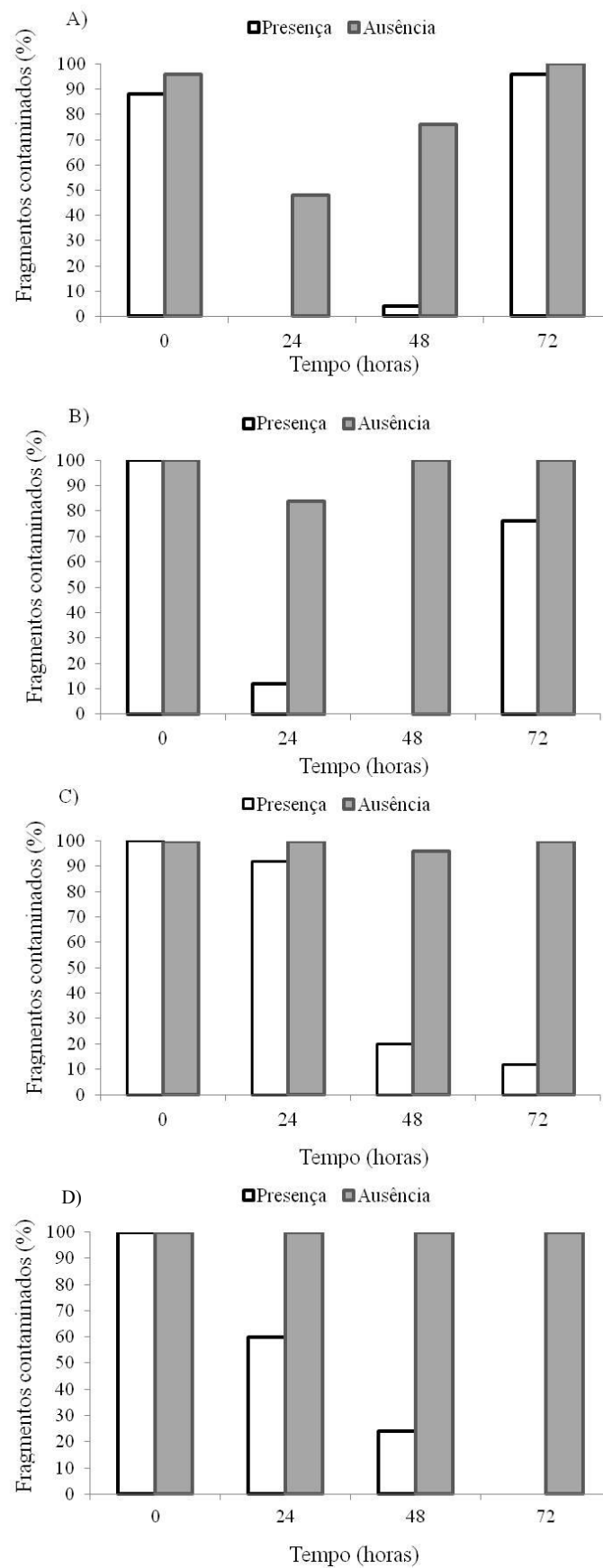
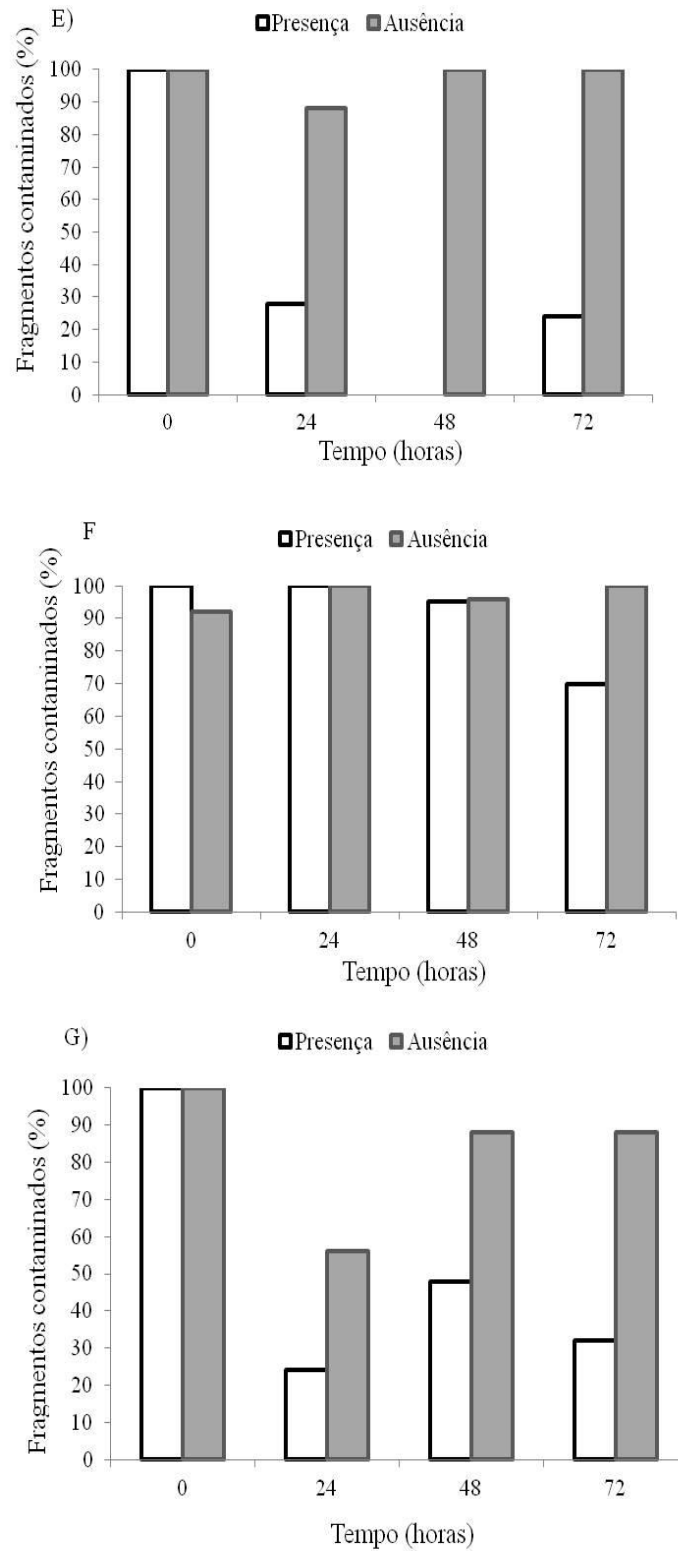
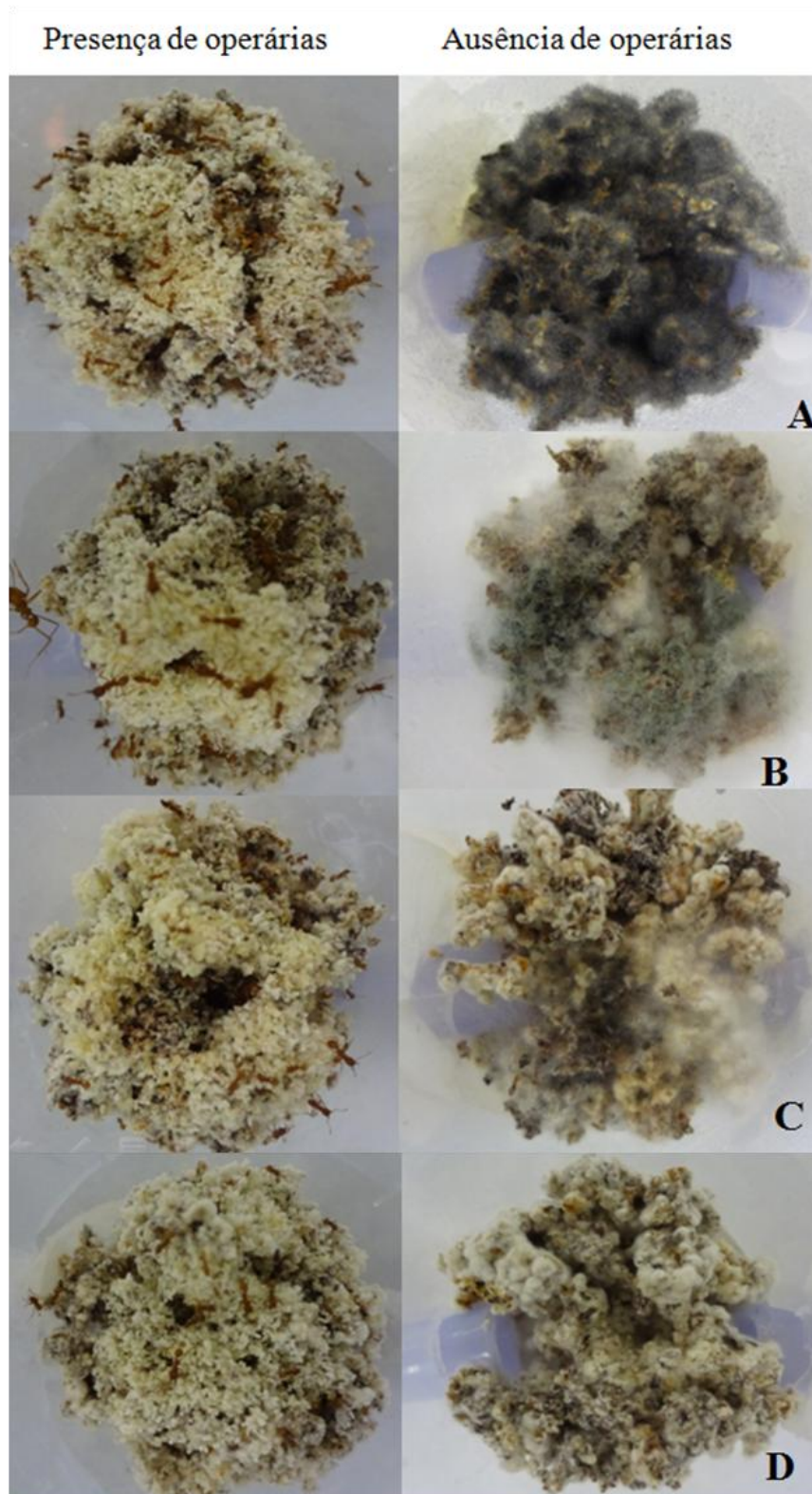


Figura 6- Continuação



A) *Syncephalastrum racemosum* (A086b). B) *S. racemosum* (A105) C) *S. racemosum* (A101); D) *S. racemosum* (H1a); E) *Trichoderma virens* (17BFIII); F) *Escovopsis* sp. (A086a) e G) *Fusarium solani* (AR037). Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 7- Diferenças morfológicas dos jardins de fungo na presença e na ausência de operárias, quando submetidos a tratamentos com esporos de fungos.



Imagens obtidas 72 horas após inoculação de esporos de fungos. Coluna à esquerda: presença de operárias. Coluna à direita: ausência de operárias. (A) *Syncephalastrum racemosum* H1a; (B) *Trichoderma virens* 17BFIII; (C) *Escovopsis* sp. A086a; (D) *Fusarium solani* AR037. Notar a abundante esporulação de *S. racemosum* em relação aos demais fungos. Fonte: Elaborada pela autora

A fim de determinar se o tipo de substrato (jardim e lixo) afeta a probabilidade de recuperação de fragmentos, foi aplicado o teste qui-quadrado (Tabela 4). Para todos os fungos testados, o tipo de substrato também influencia a probabilidade de recuperação ao longo do tempo, havendo uma tendência geral de maior probabilidade de recuperação de fragmentos com o fungo inoculado, a partir do lixo do que no jardim de fungo (Figura 8). No entanto, a probabilidade de recuperação a partir do jardim permaneceu alta para *S. racemosum* A086b e A105, bem como para *Escovopsis* sp., indicando que as operárias não foram capazes de remover completamente esses fungos do jardim (Figura 8). Em alguns casos houveram dificuldades no isolamento dos fragmentos do lixo, como nas situações nas quais o lixo foi depositado nos tubos que interligam os recipientes, ou na própria câmara do jardim, dificultando ou mesmo impossibilitando a remoção de fragmentos e posterior isolamento.

Após a inoculação dos esporos, algumas diferenças morfológicas foram observadas entre jardim e lixo. Entre tais diferenças, pode-se destacar o aspecto escuro, envelhecido e úmido das porções depositadas no lixo, enquanto que no jardim de fungo, o aspecto esponjoso foi mantido. Essas diferenças podem ser visualizadas na Figura 9.

Figura 8- Porcentagem de fragmentos de jardins de fungo e lixo que apresentaram crescimento de fungos

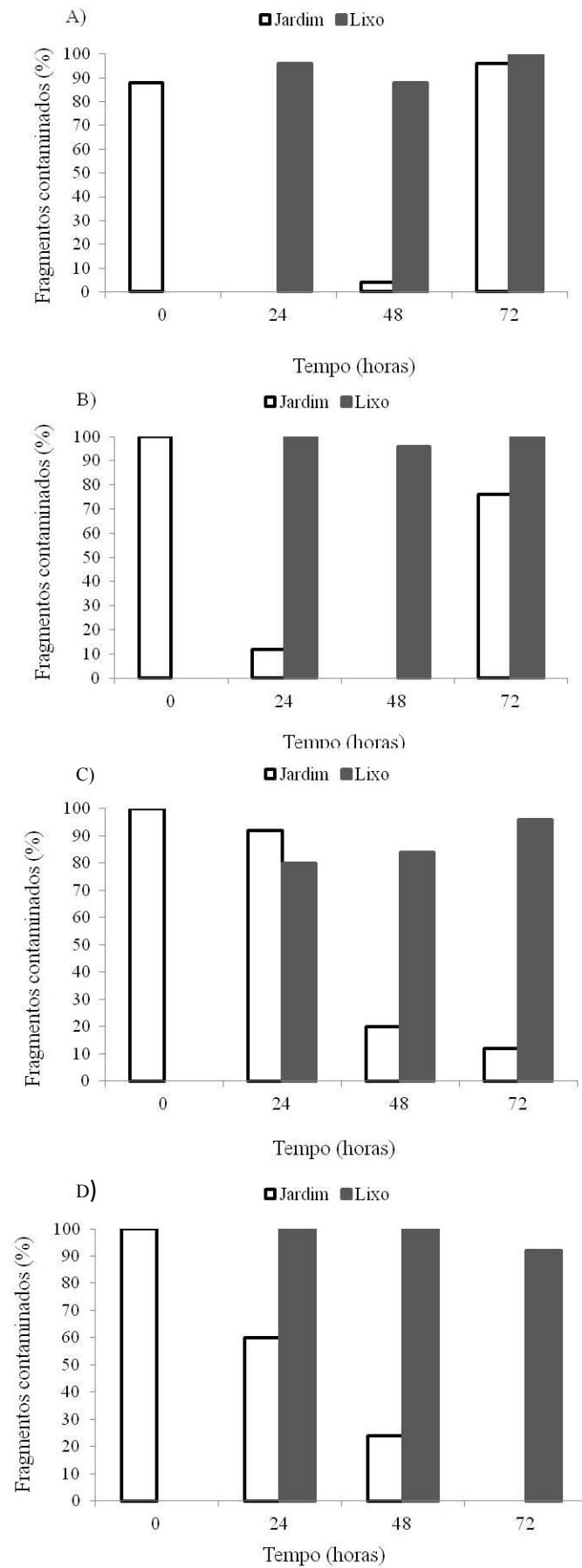
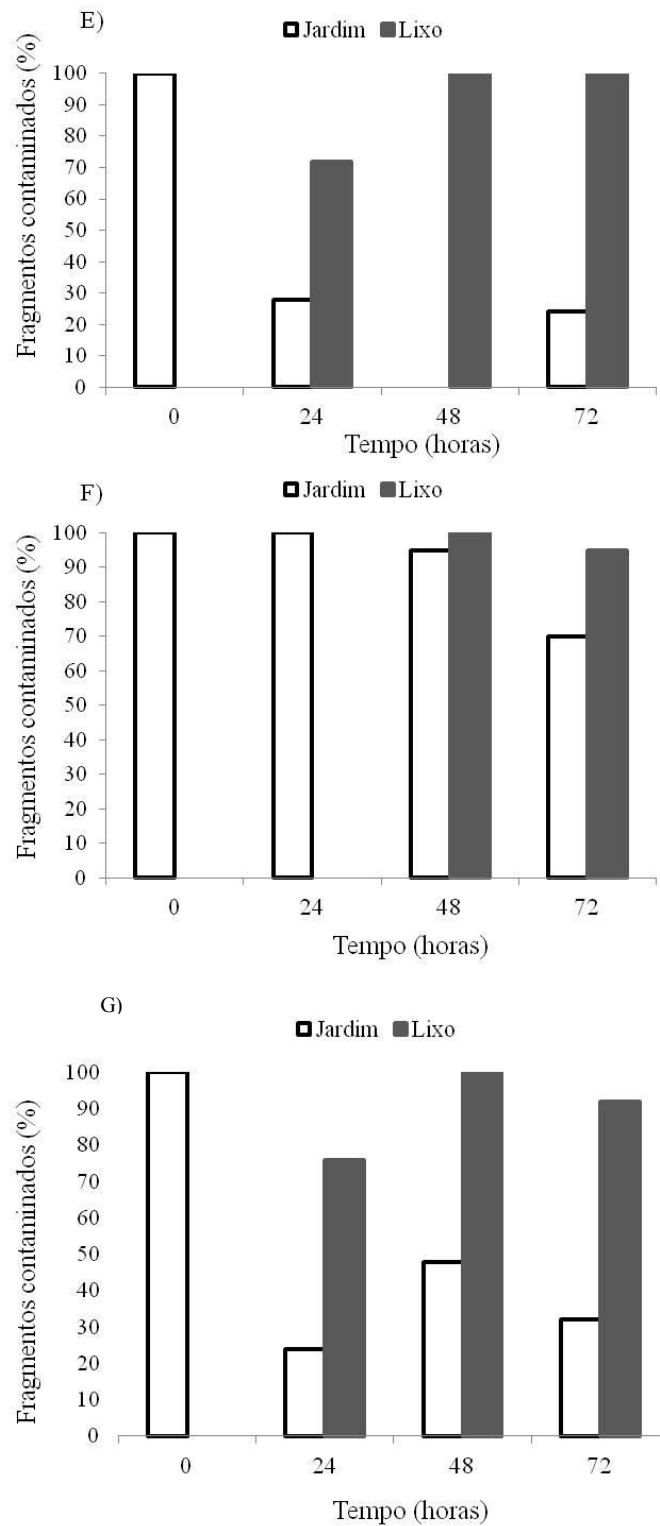
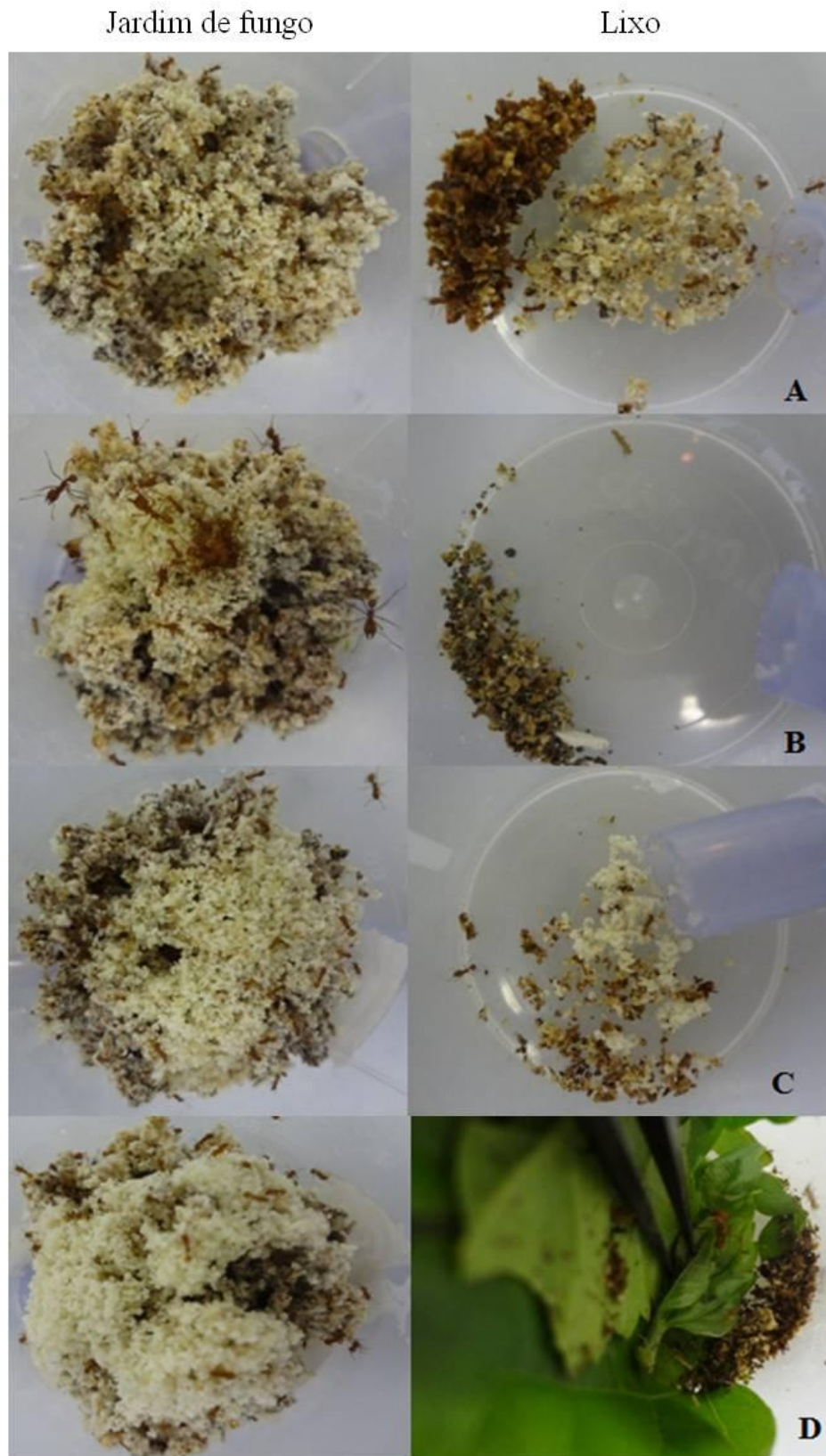


Figura 8- Continuação



A) *Syncephalastrum racemosum* (A086b). B) *S. racemosum* (A105). C) *S. racemosum* (A101). D) *S. racemosum* (H1a). E) *Trichoderma virens* (17BFIII). F) *Escovopsis* sp. (A086a) e G) *Fusarium solani* (AR037). Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 9- Diferenças morfológicas do jardim e lixo na presença de operárias.



Imagens obtidas 72 horas após a inoculação de esporos. Coluna à esquerda: jardim de fungo. Coluna à direita: lixo. (A) *Syncephalastrum racemosum* H1a; (B) *Trichoderma virens* 17BFIII; (C) *Escovopsis* sp.A086a; (D) *Fusarium solani* AR037. Notar a semelhança entre o lixo de *S.racemosum* e *Escovopsis* sp. Fonte: Elaborada pela autora.

5.2 Filmagem de subcolônia infectada com *Syncephalastrum racemosum*

A partir dos vídeos obtidos da colônia tratada com *S. racemosum*, foi possível observar que as operárias iniciaram a manipulação das regiões ao redor do local de aplicação da suspensão aproximadamente 1 hora após a inoculação, ou seja, antes mesmo que a suspensão fosse absorvida pelo jardim de fungo. Após 2 horas de inoculação, uma quantidade maior de operárias parecia estar envolvida em atividades de sanitização do jardim. Aproximadamente 4 horas após a inoculação, as operárias estabeleceram o local para deposição do material de refugo (no recipiente destinado para tal finalidade), e por volta de 5 horas e 30 minutos após a inoculação, foi registrada a remoção do primeiro fragmento do jardim de fungo. É interessante notar que esse comportamento, descrito por Currie e Stuart (2001) como ato de “carpir” o jardim (*weeding*), é realizado por pequenos grupos de operárias mínimas (Figura 10), podendo levar mais de 30 minutos para ser executado. Posteriormente à remoção de pequenos fragmentos do jardim de fungo, estes são reunidos na parte inferior do jardim, de onde são levados para o lixo. Tais eventos foram compilados em quatro vídeos:

- Primeiro vídeo: Compilado geral das atividades, desde o reconhecimento das regiões nas quais a suspensão foi aplicada até a remoção de fragmentos e sua deposição no recipiente destinado ao lixo. O vídeo está disponível no Apêndice A, e também pode ser acessado a partir do link:

https://www.dropbox.com/s/3msbpd34vwvl69b/Primeiro%20v%C3%ADdeo_Ap%C3%AAndice%20A_TCC_M.O.Barcoto.mp4?dl=0

- Segundo vídeo: Remoção de um fragmento, com ênfase na organização das operárias durante o processo de corte das hifas do jardim de fungo. O vídeo está disponível no Apêndice A, e também pode ser acessado a partir do link:

https://www.dropbox.com/s/rfzr5wx2y2vocgt/Segundo%20v%C3%ADdeo_Ap%C3%AAndice%20A_TCC_M.O.Barcoto.mp4?dl=0

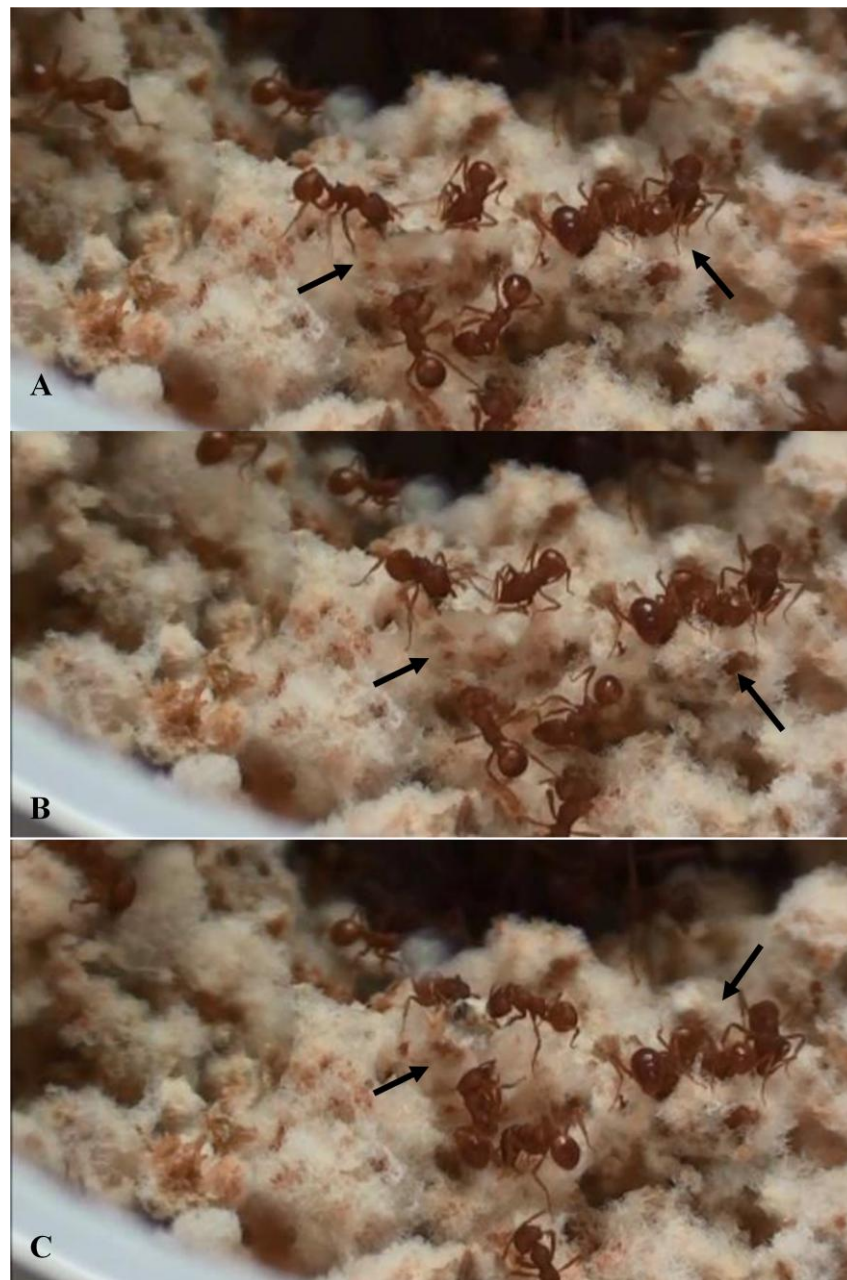
- Terceiro vídeo: Delineamento da região contaminada e remoção do fragmento, com ênfase no corte propriamente dito. O vídeo está disponível no Apêndice A, e também pode ser acessado a partir do link:

https://www.dropbox.com/s/b4c5cgrzfni6zm8/Terceiro%20v%C3%ADdeo_Ap%C3%AAndice%20A_TCC_M.O.Barcoto.mp4?dl=0

- Quarto vídeo: Etapas do processo de remoção, conforme descrito por Currie e Stuart (2001). O vídeo está disponível no Apêndice A, e também pode ser acessado a partir do link:

<https://www.dropbox.com/s/fff7yqe0h07t341/Quarto%20v%C3%ADdeo_Ap%C3%AAndice%20A_TCC_M.O.Barcoto.mp4?dl=0>

Figura 10- Comportamento de “carpir” (*weeding*) em jardins contaminados com esporos de *Syncephalastrum racemosum*



O comportamento de “carpir” (*weeding*) é realizado por pequenos grupos de operárias mínimas. O comportamento consiste na remoção de fragmentos de jardim de fungo (setas). Imagens de A a C representam a sequência cronológica de remoção do fragmento. Fonte: Elaborada pela autora.

5.3 Determinação da Dose Letal Mediana (LD₅₀) de *Metarhizium anisopliae*

A determinação da LD₅₀ foi realizada com a finalidade de estabelecer a concentração de esporos a ser utilizada no teste de coinfeção com esporos de *M. anisopliae* e *S. racemosum* (item 4.6). Os resultados do teste permitiram observar que a suspensão de esporos de *M. anisopliae* com concentração de 10⁸ esporos mL⁻¹ seria a mais adequada para os testes de coinfeção, uma vez que, em 7 dias, essa concentração levou 50% da população de operárias à morte. Quanto às demais concentrações, não foi observada uma relação estrita entre dose e sobrevivência mediana, como pode ser observado nos tratamentos com suspensões nas concentrações 10⁶, 10⁴ e 10³ esporos mL⁻¹ (Tabela 5 e Figura 11).

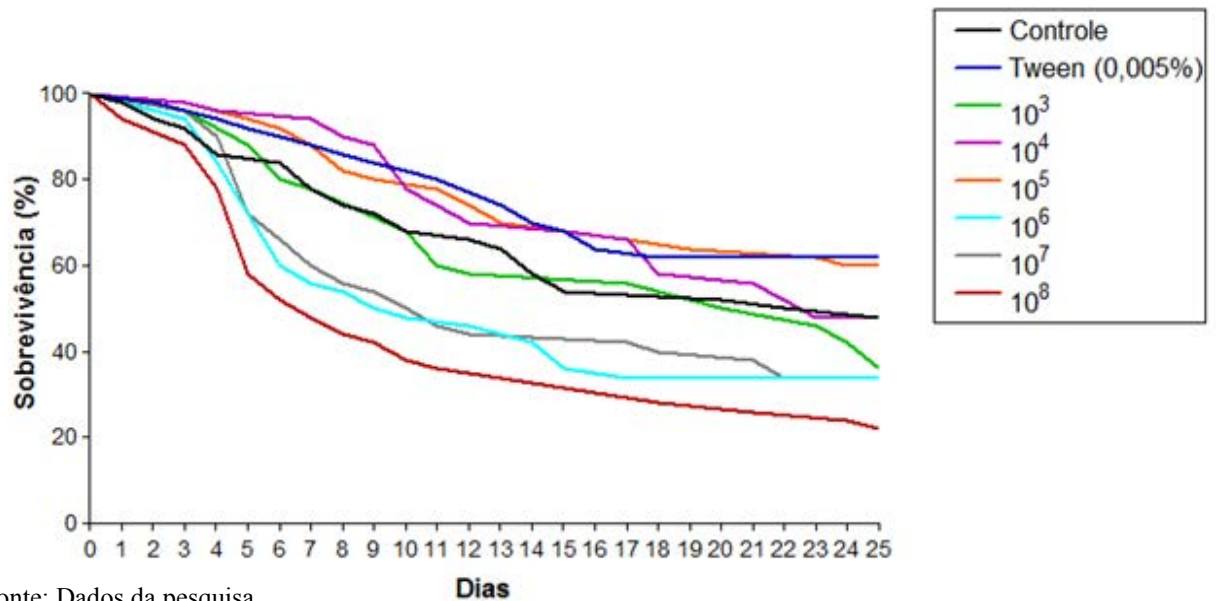
Tabela 5- Mortalidade acumulada e sobrevivência mediana (Md) de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de aplicação tópica, com suspensão de esporos de *Metarhizium anisopliae*.

Tratamento	Porcentagem acumulada de mortalidade por dia ¹										Md*
	1	2	3	6	8	10	14	17	21	25	
Controle (ausência de tratamento)	2	6	8	16	26	32	42	46	48	52	22a
Controle (Tween 80 0,005%)	0	2	4	10	14	18	30	36	38	38	>25a
Suspensão de 10 ³ esporos mL ⁻¹	0	2	4	20	22	32	42	44	50	64	20b
Suspensão de 10 ⁴ esporos mL ⁻¹	0	0	2	4	10	22	30	34	44	52	23a
Suspensão de 10 ⁵ esporos mL ⁻¹	0	0	2	8	18	20	30	34	36	40	>25a
Suspensão de 10 ⁶ esporos mL ⁻¹	2	4	6	40	46	52	58	66	66	66	9b
Suspensão de 10 ⁷ esporos mL ⁻¹	0	0	4	34	44	50	56	58	62	66	10b
Suspensão de 10 ⁸ esporos mL ⁻¹	6	6	12	48	56	62	66	66	74	78	7b

¹Na tabela foram elencados somente os dias nos quais a morte de operárias foi observada

*Letras distintas em relação ao controle indicam diferenças significativas de acordo com o teste *log rank* (p>0,05). Fonte: Dados da pesquisa

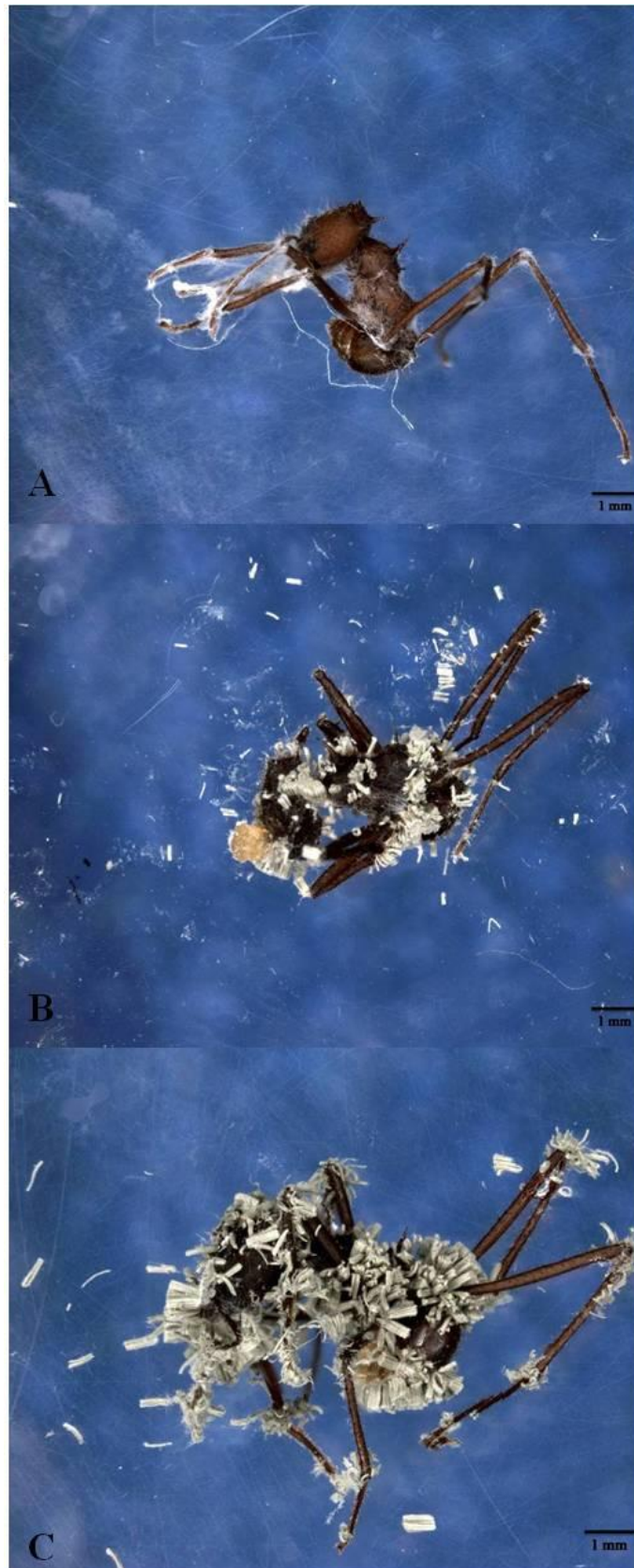
Figura 11- Curvas de sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* submetidas ao bioensaio de aplicação tópica de suspensão de esporos de *Metarhizium anisopliae* em diferentes concentrações



Em adição, o teste de viabilidade revelou que aproximadamente 9,1% dos esporos eram viáveis.

A partir das imagens obtidas através dos *softwares* IM50 (Leica Microsystems) e Auto-Montage (Syncroscopy), foi possível observar a tendência de liberação agrupada dos esporos de *M. anisopliae* a partir da superfície das operárias mortas no ensaio em questão, em diferentes estágios de crescimento (Figura 12).

Figura 12- Aparecimento de grupo de conídios na superfície de operárias de *Atta sexdens rubropilosa*.



A sequência representa os estágios de produção e dispersão agrupada de esporos. A) Início do crescimento de hifas na superfície da operária. B) Crescimento intermediário de conídios. C) Estágio final do crescimento de conídios. Fonte: Elaborada pela autora.

5.4 Teste de coinfecção: ensaio piloto

O ensaio piloto do teste de coinfecção foi realizado no intuito de estabelecer e padronizar as condições de acondicionamento e manutenção do teste, assim como determinar o método de aplicação da suspensão de esporos. Foi observado que as operárias manipularam tanto as bolas de algodão, quanto as operárias mortas. As operárias dispersaram as bolas de algodão por toda a câmara do jardim, havendo, inclusive tentativa de incorporação de substrato vegetal nas mesmas, além da tentativa de incorporação de fragmentos de algodão no jardim. Houve separação significativa de lixo e redução nas atividades de forrageio. A dispersão dos fragmentos de algodão dificultou a identificação e contabilização das operárias mortas decorrentes do contato com esporos de *M. anisopliae*. Entretanto, a mortalidade observada nessas colônias foi menor (abaixo de 50%, de acordo com a Tabela 3), do que no teste onde foram adicionadas operárias mortas, nos quais foram observadas, juntamente com o material de refugio separado, a presença de operárias mortas de todas as castas (acima de 75% de mortalidade). Assim, o método de aplicação de esporos de *M. anisopliae* em bolas de algodão mostrou-se pouco prática, além de acarretar dificuldades na avaliação das condições da subcolônia.

A partir da observação da colônia na ausência de tratamento, constatou-se a necessidade de redução da quantidade de jardim de fungo adicionada. Verificou-se também que a incorporação de substrato vegetal nas condições do experimento requer pelo menos 12 dias, período determinado para aclimação das subcolônias no desenvolvimento do Teste de Coinfecção. Dessa forma, o ensaio piloto permitiu a determinação de alguns aspectos do teste de coinfecção, como a quantidade de jardim adicionada (1,5 colher de sopa, correspondendo a aproximadamente 1 g), o período de aclimação (12 dias) e intervalo para manutenção do jardim (folhas de hibisco substituídas a cada dois dias).

5.5 Teste de coinfecção

A fim de determinar se *S. racemosum* atuaria como um patógeno oportunista, as subcolônias foram infectadas simultaneamente com esporos de *S. racemosum* e *M. anisopliae*. Adicionalmente, também foram observados os efeitos destes fungos quando aplicados isoladamente nas subcolônias.

Os valores acumulados de cada aspecto considerado na Tabela 3 foram analisados graficamente, considerando a porcentagem de alteração observada diariamente, durante os 14

dias do ensaio. A representação gráfica das alterações observadas no primeiro teste estão apresentadas na Figura 13, enquanto que os resultados do segundo teste estão representados na Figura 14.

Os resultados permitiram notar que no tratamento com esporos de *M. anisopliae*, as atividades de corte e incorporação não sofrem alterações significativas até o 7º dia, a partir do qual passam a decair; já no segundo teste, essas atividades decaem até o 7º dia, não havendo redução adicional no corte. As condições gerais do primeiro teste decaem gradualmente a partir do 1º dia, e a morte ocorre no 14º dia; já no segundo teste, as condições avaliadas decaem até o 5º dia, e então são estabilizadas, não resultando na morte das colônias. Em relação à mortalidade, esta aumenta gradualmente entre o 2º e o 10º dia no primeiro teste, e entre o 4º e 7º dia no segundo teste, embora não atinja a totalidade das operárias em ambos os casos. Quanto à separação do lixo, esta atividade aumenta a partir do 8º dia no primeiro teste, e do 1º ao 7º dia no segundo teste (Figuras 13 e 14).

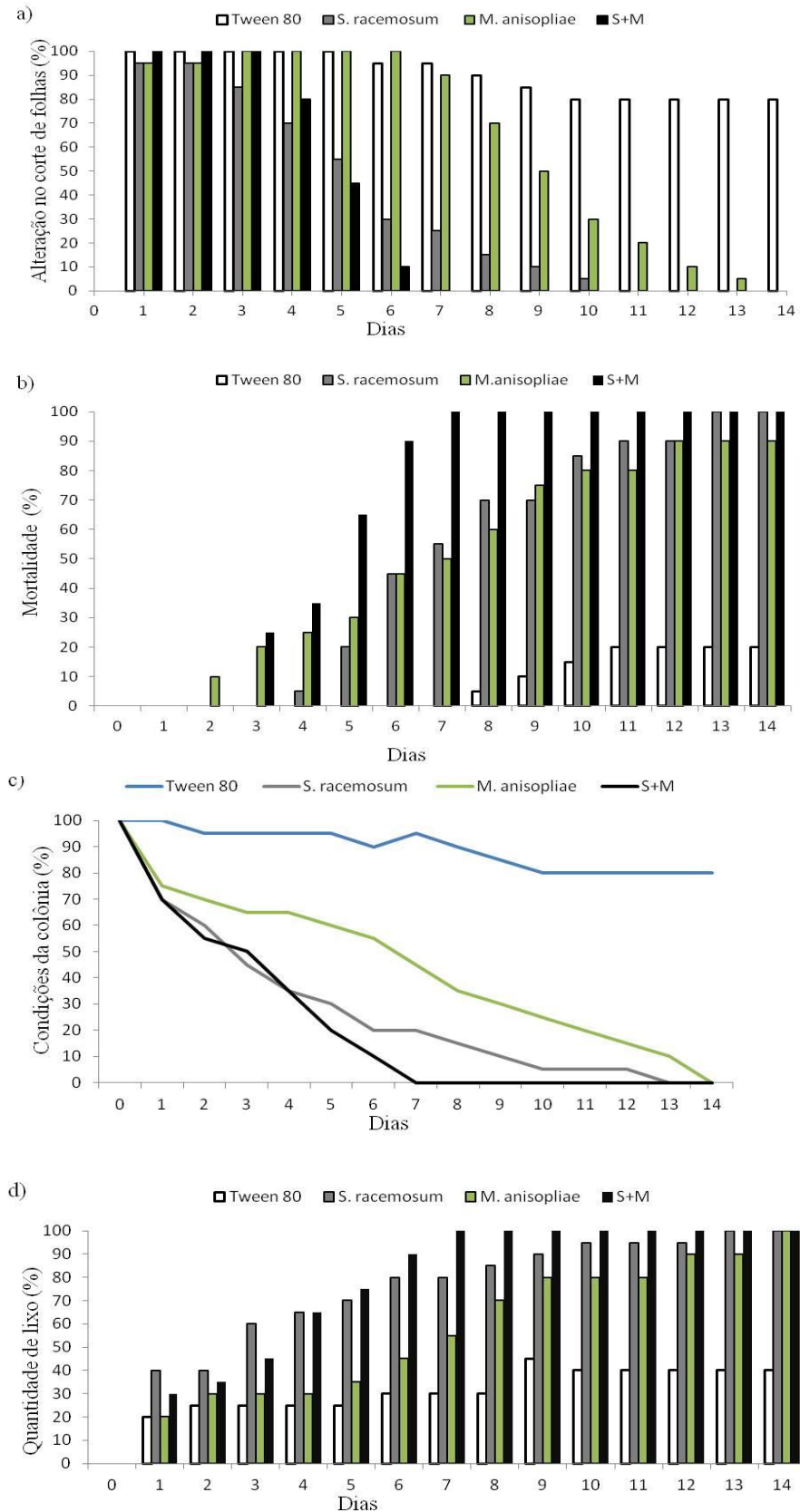
Em relação ao tratamento com esporos de *S. racemosum* H1a, nos dois ensaios considerados, as alterações no corte, na incorporação, na mortalidade e na separação de lixo iniciam-se no 4º dia de tratamento com (Figuras 13 e 14). As condições gerais (a subcolônia de uma forma geral) decaíram logo no início do tratamento, e a morte da subcolônia ocorreu em 13 dias no primeiro teste e em 10 dias no segundo. O aumento do lixo foi significativo logo no primeiro dia de observação para os dois testes, o que é condizente com os dados observados no Teste de Patogenicidade (item 5.1). A mortalidade nesse tratamento provavelmente decorre da morte do jardim de fungo e, conseqüentemente, escassez de recursos nutricionais para as operárias. Essa observação pode ser comprovada pela diferença entre o período de morte do jardim e das operárias, já que o jardim tende a se tornar seco e envelhecido, sendo separado completamente na forma de lixo, quando então a mortalidade das operárias passa a ser mais elevada. As atividades de corte e forrageio sofreram decréscimo a partir do 4º dia nos dois testes (o que coincide com o comprometimento da manutenção do jardim de fungo), sendo interrompidas no 10º dia no primeiro teste e no 11º dia no segundo teste.

Já o tratamento conjunto com esporos de *S. racemosum* e *M. anisopliae* resultou em decréscimo no corte e incorporação de material vegetal a partir do 4º dia, nos dois testes, com interrupção completa dessas atividades no 7º e 11º dia no primeiro e segundo testes, respectivamente (Figuras 13 e 14). As condições gerais decaem logo no início do tratamento e a morte ocorre em 7 e 9 dias no primeiro e segundo experimentos, respectivamente. O aumento do lixo é notável a partir do primeiro dia de observação. No entanto, no tratamento

de coinfeção, a mortalidade das operárias provavelmente ocorre por dois motivos: i) devido à infecção por *M. anisopliae*, e/ou ii) como consequência da ausência de recursos nutricionais devido à morte do jardim de fungo. Desse modo, a mortalidade das operárias no primeiro teste de coinfeção aumenta a partir do 4º dia (com mortalidade total no 7º dia). Já no segundo teste, a mortalidade das operárias aumenta a partir do 2º dia (com mortalidade total no 11º dia, dois dias após a morte do jardim de fungo).

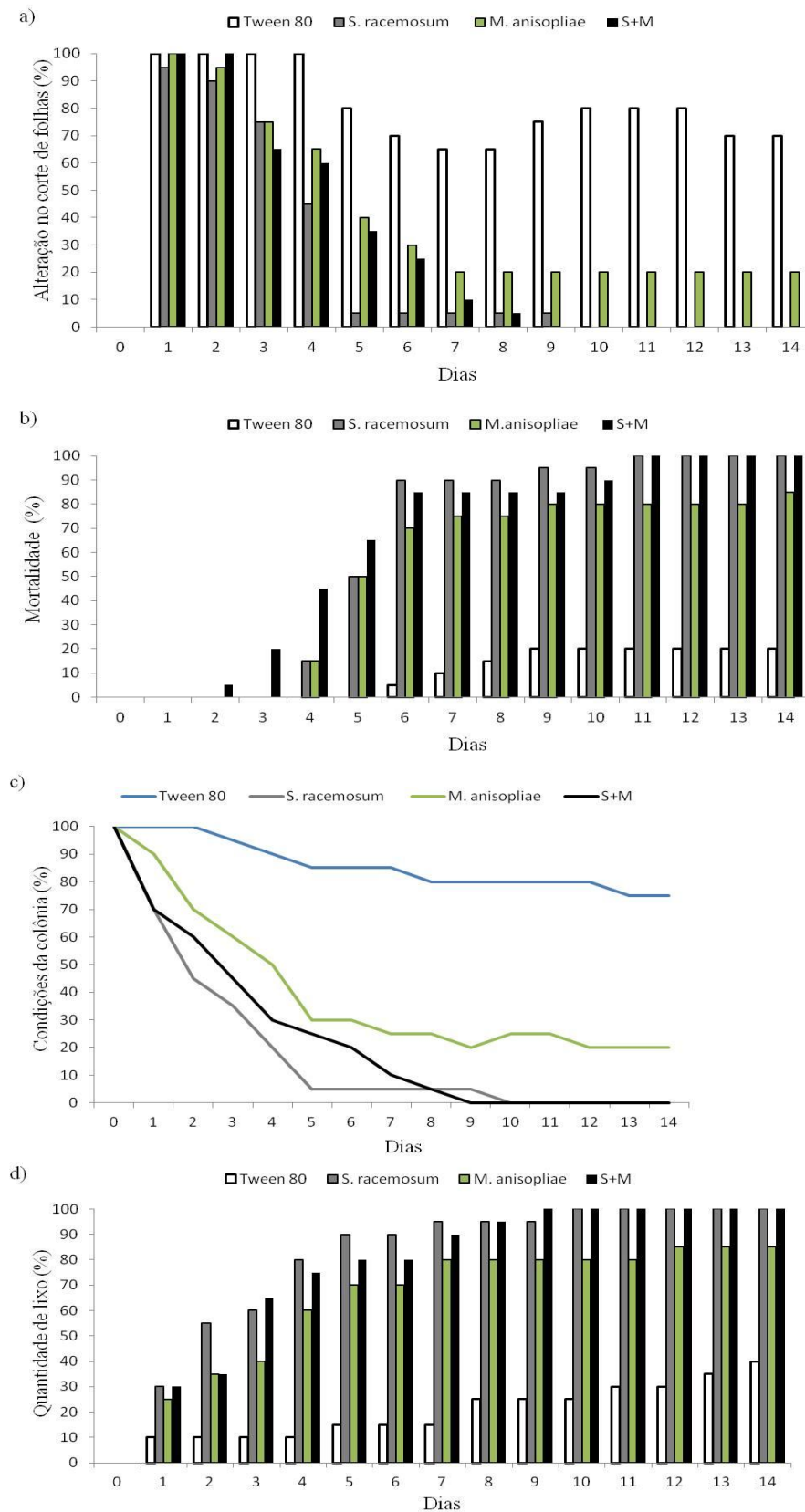
A partir dos resultados obtidos, constata-se que a coinfeção resultou em alterações pronunciadas nas subcolônias, afetando todas as atividades normais, sendo que após 14 dias de observação, não houveram colônias sobreviventes.

Figura 13- Porcentagem das alterações dos itens analisados durante o primeiro teste de coinfecção em subcolônias de *Atta sexdens rubropilosa*.



Alterações nas subcolônias após 14 dias de observação. A solução Tween 80 (0,005%) foi utilizada como tratamento controle (a) Corte de folhas. (b) Mortalidade. (c) Condições gerais da colônia. (d) Quantidade de lixo. Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 14- Porcentagem das alterações dos itens analisados durante o segundo teste de coinfecção em subcolônias de *Atta sexdens rubropilosa*.



Alterações nas subcolônias após 14 dias de observação. A solução Tween 80 (0,005%) foi utilizada como tratamento controle (a) Corte de folhas. (b) Mortalidade. (c) Condições gerais da colônia. (d) Quantidade de lixo. Fonte: Dados da pesquisa.

6 DISCUSSÃO

Diversos estudos relataram que as colônias de formigas cortadeiras apresentam uma microbiota associada complexa, sendo que a atuação de muitos dos micro-organismos encontrados nesse ambiente ainda não foi elucidada, como é o caso de *S. racemosum*. Apesar de *S. racemosum* ser encontrado em colônias de formigas da tribo Attini, as características da associação desse fungo nunca foram avaliadas. No presente estudo, procurou-se compreender o papel desempenhado por esse fungo, bem como sua possível natureza patogênica, através da comprovação dos postulados de Koch e do teste de coinfecção com um entomopatógeno conhecido; o último foi realizado na tentativa de determinar se *S. racemosum* atuaria como um patógeno oportunista.

Durante o teste de patogenicidade, foi observado que após 48 horas de inoculação, *S. racemosum* cresceu em toda a superfície do jardim na ausência de operárias, iniciando a produção de esporos, e, em 72 horas foi verificada uma grande quantidade de esporos (Figura 7A). Estudando eventos germinativos de *S. racemosum*, Hobot e Gull (1977) definem que a sequência de desenvolvimento consiste: (i) no intumescimento dos esporos, (ii) crescimento do tubo germinativo e (iii) crescimento da nova hifa. Os autores demonstraram que, na presença de glicose, os eventos germinativos (especificamente o evento ii) são iniciados em maior proporção entre 4 e 8 horas, após a inoculação. Os autores também observaram que a glicose é essencial para o intumescimento dos esporos e emergência do tubo de germinação, sendo que na ausência desse açúcar nenhum dos eventos morfológicos relacionados à germinação é iniciado. Adicionalmente, Silva et al. (2003) afirmam que enzimas do fungo mutualista atuam na degradação extracelular de polissacarídeos vegetais (como amido e pectina) resultando em carboidratos solúveis presentes no jardim, principalmente glicose, utilizados pelas formigas como recurso nutricional. Nesse contexto, pode-se supor que a glicose proveniente da degradação do substrato vegetal estimule a rápida germinação e crescimento de *S. racemosum* no jardim de fungo, e que, em última análise, a atividade enzimática de *L. gongylophorus* promova o crescimento do parasita. Dessa forma, esses dados podem ser correlacionados com os resultados obtidos durante a filmagem, inferindo-se que, após 5 horas e 30 minutos, os esporos inoculados no jardim de fungo da subcolônia iniciaram o processo de emergência do tubo de germinação.

Dado o curto período para o início da germinação, é possível que antes desse evento, as operárias não sejam capazes de remover todos os esporos inoculados no jardim de fungo, por meio do comportamento descrito por Currie e Stuart (2001) como *grooming* (ato de remoção

dos esporos utilizando o aparato bucal). Na tentativa de evitar a dispersão do patógeno, as operárias removem as partes infectadas do jardim, consistindo em micélio do fungo invasor, juntamente com o micélio do fungo mutualista e do material foliar fresco (*weeding*). Esse comportamento foi descrito pelos autores como uma resposta à infecção por *Escovopsis*, envolvendo diversas etapas e várias operárias. A primeira etapa envolve a separação do fragmento, atividade realizada por operárias mínimas, por meio da mastigação das regiões que o conectam ao jardim. Em seguida, o fragmento é destacado, sendo então carregado para as câmaras de refugio (CURRIE; STUART, 2001). No entanto, as mesmas etapas de remoção de fragmentos contaminados também foram observadas nos jardins infectados com *S. racemosum* (vídeos no Apêndice A), de forma que, no lixo separado pelas operárias, podem ser visualizados fragmentos muito semelhantes aos do lixo de subcolônias infectadas com *Escovopsis* sp. (Figura 9A e 9C, Vídeo 1 - Apêndice A). Esses dados indicam que os comportamentos de sanitização podem não ser rápidos o suficiente para conter o crescimento de *S. racemosum* no jardim de fungo.

Na subcolônia filmada, os locais onde houve remoção dos fragmentos de jardim de fungo correspondiam aos locais de inoculação, sugerindo que as operárias sejam capazes de reconhecer os eventos germinativos dos esporos de *S. racemosum*, a partir dos quais há o estabelecimento da infecção. Por outro lado, ao invés de reconhecerem os esporos invasores e/ou seus eventos germinativos, também é possível que as operárias reconheçam alterações no metabolismo e na aptidão de *L. gongylophorus*. Segundo Herz, Hölldobler e Roces (2008), as operárias são capazes de associar características particulares dos vegetais com reações específicas do fungo mutualista após o contato deste com o substrato, de modo que as reações de rejeição (e consequente remoção) são mediadas pelo fungo mutualista. De forma semelhante, as operárias poderiam também reconhecer reações de *L. gongylophorus* frente à germinação e crescimento de micro-organismos invasores (como alterações metabólicas ou respostas bioquímicas), bem como compostos associados à degradação do seu micélio, subprodutos ou compostos secundários produzidos pelo fungo invasor.

Os resultados obtidos a partir do teste de patogenicidade e da filmagem permitiram constatar que *S. racemosum* atua como um patógeno em relação ao jardim de fungo de *A. sexdens rubropilosa*, porém, esses testes por si só não revelaram mais detalhes a respeito da natureza patogênica do fungo. Por ter sido isolado de ninhos tratados com inseticida (RODRIGUES et al., 2005), presumimos que *S. racemosum* poderia atuar como um oportunista. A fim de comprovar tal hipótese, foi realizado um teste de coinfeção com o fungo entomopatogênico *M. anisopliae*. Antes do teste propriamente dito, foi determinada a

LD₅₀ de *M. anisopliae*, para estabelecer a quantidade de esporos a ser utilizada no ensaio de coinfeção.

A determinação da LD₅₀ de *M. anisopliae* indicou que a suspensão com concentração de 10⁸ esporos mL⁻¹ seria a mais adequada para os testes de coinfeção, uma vez que, em 7 dias, essa concentração levou 50% da população de operárias à morte. No entanto, alguns resultados foram contrários ao esperado; assim, a suspensão com concentração 10⁶ atingiu a sobrevivência mediana antes (9 dias) do que a suspensão com concentração 10⁷ (10 dias), e a suspensão com 10³ atingiu a sobrevivência mediana antes (20 dias) do que a suspensão com 10⁴ (23 dias), sendo o mesmo observado para o tratamento controle (22 dias, Figura 10). Esses resultados poderiam ser consequências de diversos fatores, como a viabilidade e a distribuição não uniforme dos esporos, estresse relacionado ao método de aplicação e condições de acondicionamento, além da mortalidade natural das operárias.

A concentração relativamente baixa de esporos viáveis, juntamente com a distribuição não uniforme destes, poderiam explicar parcialmente os resultados mencionados acima, uma vez que, se uma suspensão com elevada concentração de esporos apresentar a maioria desses esporos inviáveis, provavelmente resultará na morte de poucas operárias. De fato, o teste de viabilidade revelou que aproximadamente 9,1% dos esporos eram viáveis. Em adição, durante a realização dos experimentos, notou-se que mesmo após a homogeneização em vórtex, a distribuição dos esporos de *M. anisopliae* pode não ter sido uniforme entre as diferentes concentrações utilizadas, devido à formação de aglomerados de esporos na suspensão. Deve ser considerado também que, mesmo se a suspensão possuísse distribuição uniforme de esporos viáveis, o volume aplicado poderia não apresentar tais condições.

Além disso, o método envolve o deslocamento das operárias do seu ambiente natural (que por si só constitui um fator estressante), bem como a aplicação tópica, que compreende a estabilização da operária com a pinça entomológica e aplicação da suspensão no pronoto, constituindo situações estressantes. Do mesmo modo, embora as condições de acondicionamento tenham sido as mais próximas possíveis das condições naturais do formigueiro (umidade relativa, temperatura e condições luminosas), a permanência em um ambiente diferente também pode ser um fator relacionado com estresse e morte de operárias. Finalmente, também deve ser considerada a possibilidade de que algumas operárias utilizadas nos ensaios poderiam estar próximas de alcançarem o tempo máximo de vida ou não estarem saudáveis, tornando-se mais frágeis e suscetíveis ao tratamento e condições de acondicionamento.

Apesar das suspensões com algumas concentrações resultarem em mortalidade maior do que a esperada, o experimento permitiu determinar a concentração de esporos a ser utilizada no teste de coinfeção (10^8 esporos mL^{-1}).

Embora alguns dos tratamentos com menores concentrações de esporos (abaixo de 10^5 esporos mL^{-1}) também tenham atingido a sobrevivência mediana, observa-se que isso ocorreu, em média, 13 dias após a sobrevivência mediana ter sido atingida para os tratamentos com concentrações mais elevadas. Tais resultados condizem com as afirmações de Hughes et al. (2004), que sugerem a existência de um limiar de invasão para que a infecção seja bem sucedida, abaixo da qual a infecção provavelmente não terá sucesso. Acima desse limiar, a infecção ocorre e leva o hospedeiro à morte, sugerindo a ocorrência do efeito Allee, ou seja, indivíduos (nesse caso, esporos) de uma espécie que se beneficiam de alguma forma da presença de conspecíficos (STEPHENS, 1999). O efeito Allee, nessas circunstâncias, possivelmente está associado com as defesas dos hospedeiro contra os parasitos. No entanto, acima de uma determinada quantidade de esporos, estes passam a competir pelos recursos disponíveis no hospedeiro. De fato, os autores observaram que a aptidão individual desses parasitas reduz linearmente com a concentração do tratamento, relatando-se que não houve aumento significativo na mortalidade em tratamentos com concentração superior a 10^7 esporos mL^{-1} .

No caso de *M. anisopliae*, os esporos tendem a permanecer unidos, resultando na dispersão de grupos de esporos; assim a interação entre hospedeiro e parasita tende a envolver diversos indivíduos parasitas. Essa situação ocorre particularmente em parasitos que exibem semelparidade, liberando todos seus propágulos de transmissão em um único evento, que normalmente coincide com a morte do hospedeiro. Nesse ponto, o efeito da competição pelo hospedeiro (considerando uma fonte escassa de recursos) faz com que a dispersão seja a melhor estratégia de sobrevivência (HUGHES et al., 2004). Foi possível observar a tendência de liberação agrupada dos esporos de *M. anisopliae* a partir da superfície das operárias mortas, em diferentes estágios de crescimento (Figura 11). Essas observações confirmaram a morte das operárias pelo patógeno.

Os resultados apresentados durante o teste de coinfeção (Figuras 13 e 14) indicam que a presença simultânea de *S. racemosum* e *M. anisopliae* resultou em alterações pronunciadas nas subcolônias, afetando todas as atividades normais, sendo que após 14 dias de observação, não houveram colônias sobreviventes. Embora a morte das colônias tenha ocorrido em um período relativamente curto, deve-se atentar para a escala em que foram realizados, já que muitos aspectos encontrados em campo não foram considerados nesse

ensaio. Dentre tais aspectos, destaca-se a ausência da rainha na subcolônia. Esta constitui a fonte de novas operárias que poderiam dar continuidade à manutenção do jardim de fungo. Nos testes realizados, a morte de uma operária resulta em uma redução permanente na "força de trabalho" para o desenvolvimento das atividades normais da colônia; entretanto, na presença de uma rainha, mesmo com a morte de um elevado número de operárias, ainda existe a possibilidade de reposição da força de trabalho. Outra questão relevante consiste no tamanho das subcolônias utilizadas, facilitando a dispersão dos esporos e crescimento destes em grande parte da superfície do jardim de fungo, condição improvável em campo. Além disso, é importante considerar que os experimentos foram desenvolvidos em um espaço limitado, onde o jardim de fungo e as operárias permanecem confinados na presença de esporos, aumentando as chances de infecção. Assim, ressalta-se que os resultados encontrados podem ser considerados promissores dentro da escala em que foram executados, constituindo um primeiro passo de uma possível aplicação no controle biológico. A viabilidade da aplicação futura depende da otimização do método para ninhos em escalas de campo.

Além dos resultados observados na coinfecção, foi interessante notar que colônias tratadas somente com *S. racemosum* apresentaram alterações próximas às encontradas nos testes onde *S. racemosum* e *M. anisopliae* foram aplicados simultaneamente. Ao contrário do que foi suposto no início do desenvolvimento desse estudo, onde especulava-se a respeito da possível interação sinérgica entre *S. racemosum* e *M. anisopliae*, constatou-se que o tratamento somente com *S. racemosum* é capaz de levar a subcolônia à morte, em intervalos bem próximos aos encontrados para a coinfecção. Embora a morte das colônias no primeiro teste tenha ocorrido no 13º dia, tal fato deve-se à sobrevivência de uma colônia desse tratamento, onde um pequeno fragmento permaneceu vivo durante mais tempo que os demais, prolongando a sobrevivência da subcolônia. Já no segundo teste, essa diferença foi menor, de forma que a morte das subcolônias tratadas com *S. racemosum* ocorreram um dia após o tratamento com os dois fungos coinoculados. Assim, se ocorre alguma interação sinérgica entre *S. racemosum* e *M. anisopliae*, esta é um tanto sutil. Tais constatações levaram ao questionamento da hipótese de que *S. racemosum* seria um patógeno oportunista.

No presente estudo, foi comprovado que *S. racemosum* é considerado um patógeno para o jardim de fungo de formigas cortadeiras, pois confirmaram-se os Postulados de Koch. Este fato, de acordo com Mobley (1996), constitui um indicativo de que o micro-organismo corresponda a um agente etiológico (i.e., que seja responsável por causar alguma alteração patológica). De fato, segundo Casadevall e Pirofski (2000) e Pirofski e Casadevall (2012), um micro-organismo pode ser considerado patógeno quando pode causar danos no hospedeiro, o

que também é observado nos casos de infecção de colônias por *S. racemosum*. Ainda segundo esses autores, a designação de um micro-organismo como patógeno é um pouco mais complexa, já que alguns micro-organismos classificados como patógenos podem não causar doenças em todos os hospedeiros, assim como podem ser classificados como não patogênicos e resultarem em quadros patológicos em determinados hospedeiros (como no caso dos patógenos oportunistas).

Micro-organismos considerados patógenos oportunistas são ocasionalmente associados à doenças, que por algum motivo não completam os postulados de Koch. A maior parte das informações a respeito de patógenos oportunistas é proveniente da literatura clínica, de forma que, caracteristicamente, estes podem ser definidos como micro-organismos que podem se tornar patogênicos após alguma perturbação no organismo hospedeiro (como quadros patológicos, ferimentos, medicamentos, infecções primárias, imunodeficiência e envelhecimento), mas não desencadeiam doenças em hospedeiros não comprometidos. Contudo, essa definição não exclui a patogenicidade a um organismo saudável submetido a uma elevada carga parasitária ou fatores de virulência específicos, que podem suplantar defesas normais desse hospedeiro (BROWN; CORNFORTH; MIDEO, 2012; CASADEVALL; PIROFSKI, 2000). Externo ao conceito clínico, algumas espécies do gênero *Trichoderma* podem ser consideradas patógenos oportunistas para determinadas espécies vegetais (HARMAN et al., 2004).

No desenvolvimento dos experimentos de coinfeção, foi inicialmente considerado que *S. racemosum* atuaria como um oportunista. Segundo esse raciocínio, as operárias seriam capazes de controlar a infecção (de forma semelhante ao sistema imune em mamíferos), removendo os esporos invasores por meio dos comportamentos de *grooming* e *weeding* (CURRIE; STUART, 2001), garantindo a viabilidade do jardim de fungo. Assim, quando tratadas com *M. anisopliae*, presumia-se que, ao comprometer as condições de defesa normais do jardim de fungo, a infecção por *S. racemosum* seria estabelecida, levando a colônia à morte. No entanto, verificou-se que a infecção por *S. racemosum* foi estabelecida e levou a colônia à morte mesmo quando somente seus esporos foram aplicados, ou seja, não requer um comprometimento nas defesas do jardim de fungo. Nesse contexto, sugere-se que, ao contrário do especulado no início do desenvolvimento do presente estudo, *S. racemosum* consista em um patógeno para o jardim de fungo de *A. sexdens rubropilosa*, e não simplesmente um oportunista.

Além disso, a presença de um oportunista em um organismo saudável não ocasiona o desenvolvimento da doença em tal hospedeiro. Dessa forma, seria esperado que, se *S.*

racemosum consistisse em um fungo oportunista, este poderia ser isolado a partir de ninhos de formigas cortadeiras saudáveis com certa frequência. Pelo contrário, nos estudos desenvolvidos por Rodrigues et al. (2011), Reis (2014) e Pereira (2014) não foi reportado o isolamento de *S. racemosum* em ninhos de *Cyphomyrmex wheeleri*, *Trachymyrmex septentrionalis*, *Atta texana* (RODRIGUES et al., 2011), *A. cephalotes* (REIS, 2014), *A. capiguara* e *A. sexdens rubropilosa* (PEREIRA, 2014). Segundo relatos de Seal e Mueller (2013), *S. racemosum* foi encontrado em jardins comprometidos de *A. texana*, *T. septentrionalis* e *T. turrifex* nos experimentos de laboratório desenvolvidos pelos autores, mas não foi esclarecido se o fungo levou ao declínio da colônia ou se compreendeu apenas uma infecção secundária. Nesse contexto, Rodrigues et al. (2008a) afirmam ser mais provável que *S. racemosum* seja um competidor generalista do que um patógeno especializado de formigas cortadeiras (como é o caso de *Escovopsis*). Se esse quadro for verdadeiro, é possível que as mesmas características que permitem que *S. racemosum* seja um competidor generalista, constituam fatores de virulência frente ao jardim de fungo. Entre tais características, pode ser mencionada a produção de uma ampla gama de enzimas (β -amilase, lipases, desoxirribonucleases, celulase, syncephapepsina), que possibilitariam a degradação de diversos componentes do jardim de fungo (CHOPRA; CHANDER; SINGH, 1982; CHEN et al., 1993; HO; CHEN; LIAO, 1996; RAY; CHAKRAVERTY, 1998; SAPRE; JHA; PATIL, 2005). Além das enzimas, reitera-se que a relação entre a dependência de glicose para a germinação de esporos de *S. racemosum* e a presença desse açúcar em grande quantidade no jardim de fungo pode constituir um aspecto crucial na patogenicidade de *S. racemosum* nesse ambiente (HOBOT; GULL, 1977; SILVA et al., 2003). Ainda, é possível que o rápido crescimento de *S. racemosum* no jardim de fungo esteja relacionado com um metabolismo acelerado de glicose, fato que, em conjunto com as diversas enzimas produzidas pelo fungo, o tornam voraz nesse substrato. Devido ao rápido crescimento, os mecanismos de limpeza empregados pelas operárias são ineficientes, de modo que *S. racemosum* é capaz de reproduzir-se e gerar uma grande quantidade de biomassa.

7 CONCLUSÕES

A partir dos ensaios desenvolvidos durante esse estudo, foi possível verificar que *S. racemosum* atua como um patógeno no jardim de fungo das formigas cortadeiras, uma vez que este completa os Postulados de Koch. Além disso, observou-se que a colonização de *S. racemosum* ocorre de forma agressiva, não requerendo o comprometimento das defesas da colônia para ser estabelecida. Essa constatação sugere que, ao contrário do especulado no início do presente estudo, *S. racemosum* consista em um patógeno frente ao jardim de fungo de *A. sexdens rubropilosa* e não apenas um oportunista. Adicionalmente, verificou-se que em colônias infectadas por *S. racemosum*, as operárias removem fragmentos do jardim de fungo (*weeding*) na tentativa de eliminar o fungo invasor (comportamento semelhante ao observado em ninhos infectados com esporos do parasita especializado, *Escovopsis*). A remoção dos fragmentos do jardim coincide com o período de germinação dos esporos de *S. racemosum*, de modo que os resultados estão de acordo com estudos que demonstram a dependência de glicose para que ocorram os eventos germinativos. Nesse sentido, o presente estudo contribuiu para o melhor entendimento da interação entre *S. racemosum*, jardim de fungo e as operárias. Estudos futuros deverão ser realizados em ninhos de campo, a fim de verificar o potencial de *S. racemosum* em formulações aplicadas no controle biológico em condições naturais.

REFERÊNCIAS

- ABRIL, A. B.; BUCHER, E. H.. Evidence that the fungus cultured by leaf-cutting ants does not metabolise cellulose. **Ecology Letters**, Oxford, v. 5, p.325-328, 2002.
- AMORIN, R. V. S.; LEDINGHAN, W. M.; FUKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Screening of chitin deacetylase from Mucoralean strains (Zygomycetes) and its relationship to cell growth rate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 32, p. 19-23, 2005.
- ARCURI, S. L.; PAGNOCCA, F. C.; MELO, W. G. P.; NAGAMOTO, N. S.; KOMURA, D. L.; RODRIGUES, A. Yeasts found on an ephemeral reproductive caste of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 106, p475-487, 2014.
- ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, London, v. 21, n. 2, p. 51-66, 2007.
- AYLWARD, F. O.; BURNUM, K. E.; SCOTT, J. J.; SUEN, G.; TRINGE, S. G.; ADAMS, S. M.; BARRY, K. W.; NICORA, C. D.; PIEHOWSKI, P.; PURVINE, S. O.; STARRETT, G. J.; GOODWIN, L. A.; SMITH, R. D.; LIPTON, M. S.; CURRIE, C. C. Metagenomic and metaproteomic insights into bacterial communities in leaf-cutter ant fungus gardens. **ISME J**, New York, v. 6, P. 1688-1701, 2012.
- AYLWARD, F. O.; BURNUM-JOHNSON, K. E.; TRINGE, S. G.; TEILING, C.; TREMMEL, D. M.; MOELLER, J. A.; SCOTT, J. J.; BARRY, K. W.; PIEHOWSKI, P. D.; NICORA, C. D.; Malfatti, S. A.; MONROE, M. E.; PURVINE, S. O.; GOODWIN, L. A.; SMITH, R. D.; WEINSTOCK, G. M.; GERARDO, N. M.; SUEN, G.; LIPTON, M. S.; CURRIE, C. C. *Leucoagaricus gongylophorus* produces diverse enzymes for the degradation of recalcitrant plant polymers in leaf-cutter ant fungus gardens. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 79, n. 12, p. 3770-3778, 2013.
- BACCI, M. Jr.; RIBEIRO, S. B.; CASAROTTO, M. E. F.; PAGNOCCA, F. C. Biopolymer-degrading bacteria from nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 28, p. 79-82, 1995.
- BACCI Jr, M.; BUENO, O. C.; RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F. C.; SOMERA, A. F.; SILVA, A. A metabolic pathway assembled by enzyme selection may support herbivory of leaf-cutter ants on plant starch. **Journal of Insect Physiology**. Oxford, v. 59, p. 525-531, 2013.
- BASS, M.; CHERRETT, J. M. The role of leaf-cutting ant workers (Hymenoptera: Formicidae) in fungus garden maintenance. **Ecological Entomology**. London, v. 19, n. 3, p. 215-220, 1994.
- BOARETTO, M. A. C.; FORTI, L. C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. **Série Técnica IPEF**, Piracicaba, v.11, n.30, p. 31-46, 1997.
- BOT, A. N. M. CURRIE, C. R.; HART, A. G.; BOOMSMA, J. J. Waste management in leaf-cutting ants. **Ethology Ecology & Evolution**. Firenze, v. 13, p. 225-237, 2001.

BOSSI, R.; RIGET, F. F.; DIETZ, R.; SONNE, C.; FAUSER, P.; DAM, M.; VORKAMOP, K.. Preliminary screening of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and other fluorochemicals in fish, birds and marine mammals from Greenland and the Faroe Islands. **Environmental Pollution**. London, v. 136, p. 323-329, 2005.

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

BROWN, S.P.; CORNFORTH, D.M.; MIDEO, N. Evolution of virulence in opportunistic pathogens: generalism, plasticity, and control. **Trends in Microbiology**. Cambridge, v. 20, n. 7, p. 336–342, 2012.

BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; SILVA, O. A.; MATENHAUER, A. M. C. Effect of sesame (*Sesamum indicum* L) on nest development of *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera, Formicidae). **Journal of Applied Entomology**. Berlin, v. 119, n. 1-5, p. 341-343, 1995.

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

BUENO, F. C. **Seleção de ingredientes ativos para o desenvolvimento de iscas tóxicas para o controle formigas-cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae)**. 2013. 79p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2013.

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

CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA F. C.; BACCI, M. Jr.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; MIDDELHOVEN, W. J. Occurrence of killer yeasts in leaf-cutting ant nests. **Folia Microbiologica**, Praga, v. 47, n. 3, p. 259–262, 2002.

CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI, M. Jr.; LACHANCE, M. A.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; RUIVO, C. C. C.; ROSA, C. R. *Sympodiomyces attinorum* sp. nov., a yeast species associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, n. 5, p. 1891–1894, 2004.

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

CERNILIA, C. E. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 19, p. 324-333, 1997.

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

CHEN, L.Y.; HO, H.C.; TSAI, Y.C.; LIAO, T.H. Deoxyribonuclease of *Syncephalastrum racemosum*- Enzymatic Properties and Molecular Structure. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. [S.I.], v. 303, n.1, p. 51-56, 1993.

CHOPRA, A.K.; CHANDER, H.; SINGH, J. Lipolytic Activity of *Syncephalastrum racemosum*. **Journal of Dairy Science**. Champaing, v. 65, n.10, p. 1890-1894, 1982.

CHOUVENC, T.; EFSTATHION, C.A.; ELLIOT, M.L.; SU, N. Resource competition between two fungal parasites in subterranean termites. **Naturwissenschaften**. Halle, v.99, p.949-958, 2012.

COMISSÃO DE REVISÃO DOS POLUENTES ORGÂNICOS PERSISTENTES. Perfluorooctane sulfonate: risk profile. In: ENCONTRO DA COMISSÃO DE REVISÃO DOS POLUENTES ORGÂNICOS PERSISTENTES, n. 2., 2006, Geneva. Disponível em: <<http://chm.pops.int/Convention/POPsReviewCommittee/Reviewedchemicals/tabid/78/Default.aspx>> Acesso em: 15 fev. 2013.

CONFERÊNCIA DAS PARTES. COP4-SC4/17. In: ENCONTRO DA CONFERÊNCIA DAS PARTES PARA A CONVENÇÃO DE ESTOCOLMO SOBRE POLUENTES ORGÂNICOS PERSISTENTES, n.4, 2009, Geneva. Disponível em: <<http://chm.pops.int/Convention/COP/COPDecisions/tabid/208/Default.aspx>>. Acesso em: 25 ago. 2014.

CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceedings 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. A community of ants, fungi and bacteria: A multilateral approach to studying symbiosis. **Annual Review of Microbiology**. Palo Alto, v. 55, p. 357-380, 2001a.

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

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

CURRIE, C. R.; 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, 2003.

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

CURRIE, C. R.; POULSEN, M.; MENDENHALL, J. BOOMSMA, J. J.; BILLEN, J. Coevolved crypts and exocrine glands support mutualistic bacteria in fungus-growing ants. **Science**, Washington, v. 311, n. 81, p. 81-83, 2006.

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

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

DELLA LUCIA, T. M. C.; GANDRA, L. C.; GUEDES, R., N. C. M. Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. **Pest Management Science**. Sussex, v. 70, p. 14-23, 2014.

DELABIE, J.H.C. Novas opções para o controle das formigas cortadeiras, *Acromyrmex subterraneus brunneus* e *Atta sexdens sexdens* (Hymenoptera: Formicidae: Attini), na região cacauera da Bahia, Brasil. **Agrotropica**, v.1, n.3, p. 173-180, 1989.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press, v. 1, 1980, 860 p.

DYTHAM, C. **Choosing and using statistics: a biologist's guide**. 3 ed. West Sussex: Wiley-Blackwell, 2011. 316 p.

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

FARJI-BRENER, A. G.; MEDINA, C. A. The importance of where to dump the refuse: seed banks and fine roots in nests of the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* and *A. colombica*. **Biotropica**. Washington, v. 32, n. 1, p. 120-126, 2000.

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

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

FOLGARAIT, P.; GOROSITO, N.; POULSEN, M.; CURRIE, C. R. Preliminary in vitro insights into the use of natural fungal pathogens of leaf-cutting ants as biocontrol agents. **Current Microbiology**, New York, v. 63, n. 3, p. 250-258, 2011.

FOWLER, H. G.; PAGANI, M. I.; SILVA, O. A. A pest is a pest is a pest? The dilemma of neotropical leaf-cutting ants: keystone taxa of natural ecosystems. **Environmental Management**. New York, v. 13, n. 6, p. 671-675, 1989.

GERARDO, N. M.; MUELLER, G. M.; PRICE, S. L.; CURRIE, C. R. Exploiting a mutualism: parasite specialization on cultivars within the fungus-growing ant symbiosis. **Proceedings of the Royal Society of London, Series B**, London, v. 271, n. 1550, p. 1791–1798, 2004.

GERARDO, N. M.; JACOBS, S. R.; CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G. Ancient host-pathogen associations maintained by specificity of chemotaxis and antibiosis. **PLoS Biology**, California, v. 4, n. 8, p.1358-1363, 2006.

GOOSEY, E. R. **Towards understanding the fate of perfluoroalkyl compounds (PFCs) within urban environments**: Implications for human exposure. 2010. 347p. Tesis (Ph. D of Philosophy) - Division of Environmental Health and Risk Management, University of Birmingham, United Kingdom, 2010.

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

HAIFIG, S. S. V. **Natureza do parasitismo de *Escovopsis* e *Escovopsioides* sobre *Leucoagaricus gongylophorus*, fungos associados aos jardins de formigas cortadeiras** 2014. 62 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2014.

HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I; LORITO, M. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews - Microbiology**. London, v. 2, 2004.

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.

HERZ, H.; HÖLLDOBLER, B.; ROCES, F. Delayed rejection in a leaf-cutting ant after foraging on plantes unsuitable for the symbiotic fungus. **Behavioral Ecology**. Cary, v.19, n1., p.575-582, 2008.

HIBBETT, D. S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J. F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P. F.; ERIKSSON, O. E.; HUHDORF, S.; JAMES, T.; KIRK, P. M.; LÜCKING, R.; THORSTEN LUMBSCH, H.; LUTZONI, F.; MATHENY, P. B.; MCLAUGHLIN, D. J.; POWELL, M. J.; REDHEAD, S.; SCHOCH, C. L.; SPATAFORA, J. W.; STALPERS, J. A.; VILGALYS, R.; AIME, M. C.; APTROOT, A.; BAUER, R.; BEGEROW, D.; BENNY, G. L.; CASTLEBURY, L. A.; CROUS, P. W.; DAI, Y-C.; GAMS, W.; GEISER, D. M.; GRIFFITH, G. W.; GUEIDAN, C.; HAWKSWORTH, D. L.; HESTMARK, G.; HOSAKA, K.; HUMBER, R. A.; HYDE, K. D.; IRONSIDE, J. E.; KÖLJALG, U.; KURTZMAN, C. P.;

LARSSON, K. H.; LICHTWARDT, R.; LONGCORE, J.; MIĄDLIKOWSKA, J.; MILLER, A.; MONCALVO, J.-M.; OZLEY-STANDRIDGE, S.; OBERWINKLER, F.; PARMASIO, E.; REEB, V.; ROGERS, J. D.; ROUX, C.; RYVARDEN, L.; SAMPAIO, J. P.; SCHÜBLER, A.; SUGIYAMA, J.; THORN, R. G.; TIBELL, L.; UNTEREINER, W. A.; WALKER, C.; WANG, Z.; WEIR, A.; WEISS, M.; WHITE, M. M.; WINKA, K.; YAO, Y.-J.; ZHANG, N. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, Cambridge, v. 3, p. 509-547, 2007.

HO, H.-C.; CHEN, L.-Y.; LIAO, T.-H. Identification of a fungal protein of *Syncephalastrum racemosum* as aspartic proteinase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. [S.I.] v. 334, n.1, p. 97-103, 1996.

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

HOBOT, J. A.; GULL, K. The identification of a self-inhibitor from *Syncephalastrum racemosum* and its effect upon sporangiospore germination. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 46, p. 435-441, 1980.

HOCKING, A. D.; MISCAMBLE, B. F. Water relations of some Zygomycetes isolated from food. **Mycological Research**, Cambridge, v. 99, n. 9, p. 1113-1118, 1995.

HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M. J. **Atlas of clinical fungi**. 2 ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelfcultures/Universitat Rovira i Virgili, 2000, 1160 p.

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

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

HUGHES, W.O.H.; PETERSEN, K.S.; UGELVIG, L.V.; PEDERSEN, D.; THOMSEN, L.; POULSEN, M.; BOOMSMA, J.J. Density-dependence and within-host competition in a semelparous parasite of leaf-cutting ants. **BMC Evolutionary Biology**. [S.I.], v. 4, n.45, p. 1-12, 2004.

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

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

KREISEL, H. Fungi from fungus gardens of *Atta insularis* in Cuba. **Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie**. Berlin, v. 12, n. 8, p. 643–654, 1972.

LACERDA, F. G.; DELLA LUCIA, T. M. C.; SOUZA, D. J. Biologia comportamental das operárias do lixo das colônias de formigas cortadeiras. IN: DELLA-LUCIA, T. M. C. (Ed.) **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Ed. UFV, 2011, p. 262-283.

LOECK, A.E.; NAKANO, O. Efeito de novas substâncias visando o controle de saúveiros novos de *Atta laevigata* (Smith, 1858) (Hymenoptera-Formicidae). **Solo**, Piracicaba, v. 1, p. 25-30, 1984.

LITTLE, A.E.F.; CURRIE, C.R. Symbiotic complexity: discovery of a fifth symbiont in the attine ant-microbe symbiosis. **Biological Letters**, London, v. 15, n. 3, p. 501–504, 2007.

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

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

MAYHÉ-NUNES, A. J.; JAFFÉ, K. On the biogeography of Attine (Hymenoptera: Formicidae). **Ecotropicos**, Caracas, v. 11, n. 1, p. 45-54, 1998.

MELO, W. G. P. 1, ARCURI, S. L.; RODRIGUES, A.; MORAIS, P. B.; MEIRELLES, L. A.; PAGNOCCA, F. C. *Starmerella aceti* sp. nov., a new ascomycetous yeast species isolated from fungus garden of the leafcutter ant *Acromyrmex balzani*. **International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology**. Reading, v. 64, p. 1428-1433, 2014.

MENDES, T. D.; RODRIGUES, A.; DAYO-OWOYEMI, I.; MARSON, F. A. L.; PAGNOCCA, F. C. Generation of nutrients and detoxification: possible roles of yeasts in leaf-cutting ant nests. **Insects**, v. 3, n. 1, p. 228-245, 2012.

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 leafcutting ant *Atta sexdens*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 83, n. 2, p. 167–174, 2003.

MIKHEYEV, A. S.; MUELLER, U. G.; BOOMSMA, J. J. Population genetic signatures of diffuse co-evolution between leaf-cutting ants and their cultivar fungi. **Molecular Ecology**. Oxford, v. 16, p. 209-216.

MOBLEY, H.L.T., Defining *Helicobacter pylori* as a Pathogen: Strain Heterogeneity and Virulence. **The American Journal of Medicine**. New York, v. 100, n.5, 1996.

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

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

MOTULSKY, H. **Intuitive biostatistics**. New York: Oxford University Press, 1995.

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

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

MUELLER, U.G.; DASH, D.; RABELING, C.; RODRIGUES, A. Coevolution between attine ants and actinomycete bacteria: a reevaluation. **Evolution**, Oxford, v. 62, n. 11, p. 2894-2912, 2008.

NAGAMOTO, N.S. **Estudos toxicológicos de princípios ativos utilizando como modelo *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae)**. 2003. 234 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

NAGAMOTO, N.S.; FORTI, L.C.; ANDRADE, A.P.P.; BOARETTO, M.A.C.; WILCKEN, C.F. Method for the evaluation of insecticidal activity over time in *Atta sexdens rubropilosa* workers (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, Chico, v. 44, n. 2, p. 413-432, 2004.

OH, D.C.; POULSEN, M.; CURRIE, C. R.; CLARDY, J. Dentigerumycin: a bacterial mediator of an ant-fungus symbiosis. **Nature Chemical Biology**, New York, v. 5, n. 6, p. 1-4, 2009.

OLIVEIRA, M. A.; ARAÚJO, M. S.; MARINHO, C. G. S.; RIBEIRO, M. M. R.; DELLA LUCIA, T. M. C. Manejo de formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed.) **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Ed. UFV, 2011, p. 400-419.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Environmental directorate, joint meeting of the chemicals committee and the working party on chemicals, pesticides and biotechnology**: Cooperation on existing chemicals hazard assessment of perfluorooctane sulfonate (pfos) and its salts. Paris, 2002. Disponível em: <<http://www.oecd.org/dataoecd/23/18/2382880.pdf>> Acesso em: 25 ago. 2014.

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

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

PAGNOCCA, F. C.; LEGASPE, M. F. C.; RODRIGUES, A.; RUIVO, C. C. C.; NAGAMOTO, N. S.; BACCI, M. Jr.; FORTI, L. C. Yeasts isolated from a fungus-growing ant nest, including the description of *Trichosporon chiarellii* sp. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 60, n. 6, p. 1454-1459, 2010.

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

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

PEDEN-ADAMS, M. M.; KELLER, J. M.; EUDALY, J. B.; GILKESON, G. S.; KEIL, D. E. Suppression of Humoral Immunity in Mice Following Exposure to Perfluorooctane Sulfonate. **Toxicological Sciences**. Orlando, v. 104, p. 144–154, 2008.

PEREIRA, J.S., **Comunidades de fungos em jardins de formigas cortadeiras com diferentes hábitos de forrageamento**. 2014. 106 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2014.

PINTO-TOMÁS, A. A.; ANDERSON, M. A.; SUEN, G.; STEVENSON, D. M.; CHU, F. S. T.; CLELAND, W.; WEIMER, P.J.; CURRIE, C. R. Symbiotic nitrogen fixation in the fungus gardens of leaf-cutter ants. **Science**. Washington, v. 326, p. 1120-1123, 2009.

PIROFSKI, L-A.; CASADEVALL, A. Q&A: What is a pathogen? A question that begs the point. **BMC Biology**. [S.I.], v. 10, n.6, 2012.

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 and Sociobiology**. New York, v. 52, p. 151-157, 2002.

POULSEN, M.; CURRIE, C. R. Complexity of insect-fungal associations: exploring the influence of microorganisms on Attine ant-fungus symbiosis. In: BOURTZIS, K.; MILLER, T. A. (Eds.) **Insect Symbiosis**, Newbury: CRC Press, v. 2, [s.n.], p. 57-77, 2006.

RAY, R.R.; CHAKRAVERTY, R. Extracellular β -amylase from *Syncephalastrum racemosum*. **Mycological Research**. Cambridge, v.102, n12, p. 1563-1567, 1998.

REIS, A.B.S. **Diversidade de fungos nos jardins de *Atta cephalotes* (“Saúva da Mata”)**. 2014. 71 p. Dissertação (Mestrado em Biologia e Biotecnologia de Micro-organismos) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2014.

REYNOLDS, H. T.; CURRIE, C. R. Pathogenicity of *Escovopsis weberi*: The parasite of the attine ant-microbe symbiosis directly consumes the ant-cultivated fungus. **Mycologia**, Lawrence, v. 96, n. 5, p. 955-959, 2004.

RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI, M. Jr.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PENNING, L. H. Variability of non-mutualistic fungi associated with *Atta sexdens rubropilosa* nests. **Folia Microbiologica**, Prague, v. 50, n. 5, p. 421-425, 2005.

RODRIGUES, A. CARLETTI, C.D.; BUENO, O.C.; PAGNOCCA, F.C. Leaf-cutting ant faecal fluid and mandibular gland secretion: effects on microfungi spore germination. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 64-67, 2008a.

- RODRIGUES, A.; BACCI, M. Jr.; MUELLER, U. G.; ORTIZ, A.; PAGNOCCA, F. C. Microfungal “weeds” in the leafcutter ant symbiosis. **Microbial Ecology**, Washington, v. 56, n. 4, p. 604-614, 2008b.
- RODRIGUES, A.; CABLE, R. N.; MUELLER, U. G.; BACCI, M. JR.; PAGNOCCA, F. C. Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungal garden pathogens of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 96, n. 3, p. 331-342, 2009.
- RODRIGUES, A.; MUELLER, U. G.; ISHAK, H. D.; BACCI, M. Jr; PAGNOCCA, F. C. Ecology of microfungal communities in gardens of fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae): a year-long survey of three species of attine ants in Central Texas. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 78, n. 2, p. 244–255, 2011.
- RODRIGUES, A.; PASSARINI, M.R.Z.; FERRO, M.; NAGAMOTO, N.S.; FORTI, L.C.; BACCI Jr, M.; SETTE, L.D.; PAGNOCCA, F.C. Fungal communities in the garden chamber soils of leaf-cutting ants. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, p.1-11, 2013, no prelo.
- RØNHEDE, S.; BOOMSMA, J. J.; ROSENDAHL, S. Fungal enzymes transferred by leaf-cutting ants in their fungus gardens. **Mycological Research**. Cambridge, v. 108, n. 1, p. 101-106, 2004.
- SANTOS, A.V.; OLIVEIRA, B. L.; SAMUELS, R.I. Selection of entomopathogenic fungi for use in combination with sub-lethal doses of imidacloprid: perspectives for the control of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). **Mycopathologia**, Dordrecht v.163, p.233–240, 2007.
- SAPRE, M.P.; JHA, H.; PATIL, M.B. Purification and characterization of a thermostable-cellulase free xylanase from *Syncephalastrum racemosum* Cohn. **The Journal of General and Applied Microbiology**. [S.I] v.51, n.6, p.327-334, 2005.
- SCHIØTT, M.; ROGOWSKA-WRZESINSKA, A.; ROEPSTORFF, P.; BOOMSMA, J. J. Leaf-cutting ant fungi produce cell wall degrading pectinase complexes reminiscent of phytopathogenic fungi. **BCM Biology**. [S.I], v.8, n. 156, 2010. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1741-7007/8/156>>. Acesso em 22 ago. 2014.
- SCHULTZ, T. R.; MUELLER, U. G.; CURRIE, C. R. REHNER, S.A. Reciprocal illumination: a comparison of agriculture in humans and in fungus-growing ants. In: VEGA, F. E.; BLACKWELL, M. (Ed.). **Insect- Fungal Associations**. New York: . Oxford University Press, 2005, p149 – 190.
- SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America**, Washington, v. 105, n. 14, p. 5435-54401, 2008.
- SEAL, J.N.; MUELLER, U.G. Instability of novel ant-fungal associations constrains horizontal exchange of fungal symbionts. **Evol Ecol.**, 2013.
- 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.

SCOTT, J. J.; BUDSBERG, K. J.; SUEN, G.; WIXON, D. L.; BALSER, T.C.; CURRIE, C.R. Microbial community structure of leaf-cutter ant fungus gardens and refuse dumps. **PLoS ONE**. [S.I], v. 5, n. 3, e9922, doi:10.1371/journal.pone.0009922, 2010.

SILVA, A.; BACCI Jr, M.; PAGNOCCA, F. C; BUENO, O. CC.; HEBLING, M. J. A. Production of polysaccharidases in different carbon sources by *Leucoagaricus gongylophorus* Möller (Singer), the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* Linnaeus. **Current Microbiology**. New York, v. 53, p. 68-71, 2006a.

SILVA, A.; BACCI Jr.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. Starch metabolism in *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. **Microbiological Research**. Jena, v. 161, p. 299-303, 2006b.

SILVA, A.; RODRIGUES, A.; BACCI Jr, M.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O.C. Susceptibility of the ant-cultivated fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales: Basidiomycota) towards microfungi. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 162, n. 2, p. 115-119, 2006c.

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

SIQUEIRA, C. G. S., BACCI Jr., M.; PAGNOCCA, F, C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 64, n. 12, p. 4820-4822, 1998.

SOLOMON, S. E; BACCI JÚNIOR, M.; MARTINS JÚNIOR, J.; VINHA, G. V.; MUELLER, U. G. Paleodistributions and comparative molecular phylogeography of leafcutter ants (*Atta* spp.) provide new insight into the origins of Amazonian diversity. **PLoS One**, San Francisco, v. 2, n. 3, p. 1-15, 2008.

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

STEPHENS, P.A.; SUTHERLAND, W.J.; FRECKLETON, R.P. What Is the Allee Effect? **Oikos**. Copenhagen, v.87, n.1, p.185-190, 1999.

SUEN, G.; SCOTT, J. J.; AYLWARD, F. O.; ADAMS, S. M.; TRINGE, S. G.; PINTO-TOMÁS, A. A.; FOSTER, C. E.; PAULY, M.; WEIMER, P.J.; BARRY, K. W.; GOODWIN, L. A.; BOUFFARD, P.; LI, L.; OSTERBERGER, J.; HARKINS, T. T.; SLATER, S. C.; DONOHUE, T. J.; CURRIE, C. C. An insect herbivore microbiome with high plant biomass-degrading capacity. **PLoS Genetics**, [S.I], v.6, n. 9, e1001129. doi:10.1371/journal.pgen.1001129, 2010.

TOMLIN, C.D.S (ed.). **The pesticide manual: a world compendium**. 14 ed. Alton, Hampshire: BCPC, 2006. 1349p.

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

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

VITALE, R. G.; HOOG, G. S.; SCHWARZ, P.; DANNAOUI, E.; DENG, S.; MACHOUART, M.; VOIGT, K.; SANDE, W. W. J.; DOLATABADI, S.; MEIS, J. F.; WALTHER, G. Antifungal Susceptibility and Phylogeny of Opportunistic Members of the Order *Mucorales*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 50, n. 1, doi:10.1128/JCM.06133-11, 2012.

WONGANU, B.; POOTANAKIT, K.; BOONYAPAKRON, K.; CHAMPREDA, V.; TANAPONGPIPAT, S.; EURWILAICHITR, L. Cloning, expression and characterization of a thermotolerant endoglucanase from *Syncephalastrum racemosum* (BCC18080) in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, [S.I.], v. 58, p. 78-86, 2008.

ZHANG, M.M.; POULSEN, M.; CURRIE, C.R. Symbiont recognition of mutualistic bacteria by *Acromyrmex* leaf-cutting ants. **ISME J**, New York, v. 1, n. 4, p. 313-320, 2007.

APÊNDICE

APÊNDICE A- Comportamento de *weeding* em subcolônias infectadas por *Syncephalastrum racemosum*