
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ÁREA: MICROBIOLOGIA APLICADA)

SADALA SCHMIDT VARANDA HAIFIG

**Natureza do parasitismo de *Escovopsis* e *Escovopsioides* sobre
Leucoagaricus gongylophorus, fungos associados aos jardins de
formigas cortadeiras**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área: Microbiologia Aplicada).

Rio Claro – SP
2014

SADALA SCHMIDT VARANDA HAIFIG

**Natureza do parasitismo de *Escovopsis* e *Escovopsioides* sobre
Leucoagaricus gongylophorus, fungos associados aos jardins de
formigas cortadeiras**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Ciências
Biológicas (Área: Microbiologia
Aplicada).

Orientador: Prof. Dr. André Rodrigues

Rio Claro – SP
2014

589.2 Haifig, Sadala Schmidt Varanda
H149n Natureza do parasitismo de Escovopsis e Escovopsioides
sobre Leucoagaricus gongylophorus, fungos associados aos
jardins de formigas cortadeiras / Sadala Schmidt Varanda
Haifig. - Rio Claro, 2014
59 f. : il., figs., tabs., fots.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: André Rodrigues

1. Fungos. 2. Micoparasitismo. 3. Antagonismo. 4. Jardim
de fungo. 5. Atta. I. Título.

*Ao meu marido, Ives
e aos meus pais, Maria Elizabeth e Mario Saul,
pelo apoio e amor.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por todas as graças alcançadas e por todo aprendizado que me tem permitido.

Aos meus pais, Maria Elizabeth Schmidt e Mario Saul Pereira Varanda da Cruz, pelo apoio e amor incondicional.

Ao meu marido, Ives Haifig, pelo amor, companheirismo, incentivo e por toda ajuda que pode me oferecer.

A minha avó Lázara Jesuína Schmidt pelo amor, fé e força.

Aos meus avós (*In memoriam*) Rodolpho Schmidt, Maria de Lourdes de Jesus Pereira e Mario Varanda da Cruz que contribuíram para a minha formação.

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Rodrigues, por ter me aceitado como aluna, pelos ensinamentos e por sua acessibilidade, estando sempre disponível a ajudar e ensinar.

Ao Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca por ter aberto as portas do seu laboratório durante o estágio que realizei, me dando assim, a oportunidade de aprender e estudar na UNESP de Rio Claro.

A todos os amigos que fiz e a equipe do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos Filamentosos que foram fundamentais nessa caminhada!

A Dr. Tatiane Albarici por ter me ajudado na obtenção das frações e ter feito as análises por HPLC.

Aos técnicos do Laboratório de Microscopia de Varredura, em especial, Dr. Pablo Nunes e Mônica, por terem me auxiliado nas análises de microscopia.

A Jaqueline Silva, Bárbara Monique e Lucas Meirelles por algumas fotos utilizadas neste estudo.

A CAPES pela concessão da bolsa e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Aplicada pela oportunidade e apoio técnico.

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica e Microbiologia e da Seção Técnica de Pós-Graduação que me auxiliaram nos momentos que eu precisei.

Muito obrigada a todos!

RESUMO

As formigas cortadeiras, ao longo da evolução, desenvolveram o hábito de cultivar fungos e utilizá-los como fonte de alimento. Esses insetos utilizam folhas e flores frescas como substrato para o cultivo do mutualista fúngico (*Leucoagaricus gongylophorus*). As culturas desses insetos são continuamente ameaçadas por fungos do gênero *Escovopsis*, considerados parasitas do fungo cultivado pelas formigas. Embora sejam conhecidos os efeitos danosos sobre *L. gongylophorus*, o mecanismo de ação do parasitismo de *Escovopsis* sp. ainda é pouco compreendido. Nesse contexto, avaliamos a natureza do antagonismo de várias linhagens de *Escovopsis* sp. frente ao fungo cultivado pelas formigas cortadeiras. Adicionalmente, avaliamos o potencial antagonista de *Escovopsioides* sp., um fungo recentemente descrito e para o qual desconhece-se o papel nos ninhos desses insetos. Primeiramente, foram realizados ensaios clássicos de culturas pareadas *in vitro* para avaliar a interação entre *L. gongylophorus* e os dois fungos filamentosos teste. Posteriormente, a ação antifúngica de compostos secretados pelos fungos filamentosos frente a *L. gongylophorus* foi avaliada. Para tanto, foram obtidos extratos brutos utilizando os cultivos de *Escovopsis* sp. e *Escovopsioides* sp. na (i) ausência (EBA) e na (ii) presença do fungo mutualista (EBP), além da (iii) fração acetato e (iv) butanol. Esses extratos foram incorporados em meio de cultivo e o crescimento micelial de *L. gongylophorus* foi avaliado. A interação física entre os fungos filamentosos e o fungo cultivado pelas formigas foi avaliada através de ensaios de antagonismo aliados a microscopia eletrônica de varredura. Nos ensaios de culturas pareadas, todos os fungos filamentosos (*Escovopsis* sp. e *Escovopsioides* sp.) afetaram negativamente o crescimento de *L. gongylophorus*. No geral, a maioria dos extratos brutos EBA e EBP de *Escovopsis* sp. e *Escovopsioides* sp. inibiu significativamente o crescimento do fungo cultivado pelas formigas. Por outro lado, as frações acetato e butanol de apenas cinco linhagens inibiram significativamente o crescimento do fungo mutualista. Os resultados indicam que ambos, *Escovopsis* sp. e *Escovopsioides* sp., produzem metabólitos com ação antifúngica sobre o fungo mutualista. Interações físicas foram observadas entre as hifas de *Escovopsis* sp. e as hifas de *L. gongylophorus*, nos ensaios de antagonismo aliados à microscopia de varredura. As linhagens de *Escovopsis* sp. e *Escovopsioides* sp. mantiveram contato físico com as hifas do fungo mutualista, entretanto, nenhuma estrutura especializada relacionada ao micoparasitismo foi encontrada. Os resultados corroboram com estudos prévios que apontam *Escovopsis* sp. como um micoparasita necrotrófico do fungo cultivado pelas formigas. Em adição, os resultados sugerem que *Escovopsioides* sp. é um antagonista do fungo das formigas, porém não tão agressivo, quando comparado a *Escovopsis* sp.

PALAVRAS-CHAVE: Micoparasitismo. Antagonismo. Jardim de fungo. *Atta*

ABSTRACT

The leaf-cutting ants, across the evolution, developed the ability to grow fungi and use them as food resource. These insects use fresh leaves and flowers as substrate to grow the mutualistic fungus (*Leucoagaricus gongylophorus*). The farming of these insects are continuously threatened by fungi of the genus *Escovopsis*, considered parasites of the fungus reared by the ants. Although the harmful effects on *L. gongylophorus* are known, the mechanism of action of the parasitism of *Escovopsis* sp. is still poorly understood. In this context, we evaluated the nature of the antagonism of various strains of *Escovopsis* sp. towards the fungus cultivated by the leaf-cutting ants. In addition, we evaluated the potential antagonistic role of *Escovopsioides* sp., a recently described fungus for which its role in the ant nests is unknown. First, *in vitro* co-culture assays were carried out to evaluate the interaction between *L. gongylophorus* and the two filamentous fungi. Then, the antifungal activities of compounds secreted by the filamentous fungi against *L. gongylophorus* were evaluated. Crude extracts were obtained using grows of *Escovopsis* sp. and *Escovopsioides* sp. (i) in the absence (EBA) and (ii) in the presence (EBP) of the mutualistic fungus, in addition to (iii) acetate and (iv) butanol fractions. These extracts were incorporated in the culture medium and the micelial growth of *L. gongylophorus* was evaluated. The physical interaction between the filamentous fungi and the fungus cultivated by the ants was evaluated using antagonism assays associated with scanning electron microscopy. In the co-culture assays, all the *Escovopsis* sp. and *Escovopsioides* sp. filamentous fungi negatively affected the growth of *L. gongylophorus*. In general, the majority of the EBA and EBP crude extracts from *Escovopsis* sp. and *Escovopsioides* sp. significantly inhibited the growth of the mutualistic fungus. The results indicate that both *Escovopsis* sp. and *Escovopsioides* sp. produce metabolites with antifungal activity against the mutualistic fungus. Physical interactions were observed between hyphae of *Escovopsis* sp. and hyphae of *L. gongylophorus* in the antagonism assays associated to scanning electron microscopy. The strains of *Escovopsis* sp. and *Escovopsioides* sp. kept physical contact with the hyphae of the mutualistic fungus, although no specialized structure related to mycoparasitism was found. The results corroborate previous studies that point *Escovopsis* sp. as a necrotrophic mycoparasite of the fungus cultivated by the antes. In addition, the results suggest the *Escovopsioides* is an antagonist of the ant fungus, but not as aggressive as *Escovopsis* sp.

KEYWORDS: Mycoparasitism. Antagonism. Fungus garden. *Atta*.

Lista de Figuras

- Figura 1.** A: Jardim de fungo de *Atta sexdens rubropilosa*. Esta estrutura compreende o substrato vegetal forrageado pelas operárias e o micélio do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* (coloração branca). B: Imagem de microscopia de luz do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006 com 15 dias de crescimento, evidenciando a presença de gongilídios, vesículas ricas em nutrientes, nas extremidades das hifas do fungo..... 12
- Figura 2.** *Escovopsioides* sp. (*Ascomycota: Hypocreales*). A: aspecto morfológico da cultura de *Escovopsioides* sp. mantida a 25 °C, durante 7 dias. B: imagem de microscopia de luz de *Escovopsioides* sp., mostrando a presença de clamidósporos. C: imagem de microscopia de luz de *Escovopsioides* sp., evidenciando a formação de esporos de origem blástica (seta). 15
- Figura 3.** *Escovopsis* sp. , fungo parasita do jardim de fungo das formigas da tribo Attini. A: aspecto morfológico da cultura de *Escovopsis* sp. mantida a 25°C, com 7 dias. B-C: microscopia de luz das linhagens de *Escovopsis* sp. ES004 e NL005, respectivamente, mostrando conidióforos, estrutura de reprodução, em forma de “escova”. 15
- Figura 4.** Ensaios de co-cultivo *in vitro* entre o fungo mutualista das formigas cortadeiras (*Leucoagaricus gongylophorus* FF2006) e fungos filamentosos *Escovopsis* sp. (ES002, ES005 e RS020) e *Escovopsioides* sp. (RS046 e RS054) isolados dos jardins dessas formigas. 31
- Figura 5.** Placas de co-cultivo com seis dias de crescimento de diferentes linhagens de *Escovopsis* sp. (ES004, RS019, RS030 e RS076) e *Escovopsioides* sp. (RS046 e RS054) frente ao fungo cultivado pelas formigas cortadeiras, *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006. As setas escuras apontam regiões de esporulação sobre a colônia do fungo mutualista. 32
- Figura 6.** Crescimento de *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006 nos extratos EBA e EBP provenientes de linhagens de *Escovopsis* sp. (NL001 e RS030) e *Escovopsioides* sp. (RS046), após 28 dias de incubação. Controle: meio A com aveia suplementado com caldo batata-dextrose..... 34
- Figura 7.** Alterações morfológicas observadas no fungo *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006 nos tratamentos com o solvente DMSO. A e B: reverso e obverso de uma colônia do fungo mutualista no controle do meio (sem DMSO). C e D: reverso e obverso de uma colônia do fungo mutualista na presença do solvente. Placas com 28 dias de crescimento. 37
- Figura 8.** Fungo cultivado pelas formigas cortadeiras, *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006. A: hifas com a presença de gongilídios nas suas extremidades (controle sem DMSO). B: ausência de gongilídios nas hifas do fungo cultivado no controle com DMSO..... 38
- Figura 9.** *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006 na presença dos extratos EBA e EBP provenientes das linhagens de *Escovopsis* sp. (ES002, NL005 e RS030), após 28 dias de incubação a 25 °C. Note o escurecimento do reverso da colônia de *L. gongylophorus* quando em contato com os extratos. Controle: meio com aveia, suplementado com caldo batata-dextrose. 38
- Figura 10.** Espectro obtido por HPLC da fração acetato da linhagem de *Escovopsis* sp. RS076. A seta evidencia uma maior produção de um composto no extrato bruto na presença do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006 (EBP). 39
- Figura 11.** Ensaios de antagonismo em ágar água. A: Seta aponta micélio de *Escovopsis* sp. RS076 crescendo em direção a *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006 (L). Placa com dois dias de incubação a 25 °C. B: Seta aponta micélio de *Escovopsioides* sp. RS054, crescendo em direção ao fungo mutualista. Placa com cinco de incubação a 25 °C. 40
- Figura 12.** Placas controle dos fungos filamentosos *Escovopsis* sp. RS076 e *Escovopsioides* sp. RS046 nos ensaios de antagonismo em ágar água com quatro dias de experimento. Os fungos foram inoculados nas placas e após quatro dias de incubação: A. Fragmento de *Escovopsis* sp. RS076 não apresentando crescimento micelial. B. Fragmento de *Escovopsioides* sp. RS046 apresentado crescimento micelial. 40
- Figura 13.** Micrografias eletrônicas de varredura dos ensaios de antagonismo realizados com *Escovopsis* sp. NL005 e RS055 frente à *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006. A. Gongilídios e hifas do fungo mutualista com 20 dias de crescimento (barra: 100 µm). B. Contato físico da hifa

do fungo mutualista com a hifa de *Escovopsis* sp. NL005, evidenciado pelas setas (barra: 50 μ m). C-E: enrolamento da hifa do fungo *L. gongylophorus* na hifa de *Escovopsis* sp. NL005 (barras: 100 – 50 μ m). D: contato físico da hifa de *Escovopsis* sp. NL005 sobre um gongilídio, contato físico da hifa de *L. gongylophorus* com a hifa do *Escovopsis* sp (barra: 100 μ m). F: Crescimento expressivo de *Escovopsis* sp. RS055 e formação de conidióforos, ausência do fungo mutualista (barra: 100 μ m).42

Figura 14. Micrografias eletrônicas dos ensaios de antagonismo realizados com *Escovopsioides* sp. RS046 frente à *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006. A. Controle da linhagem RS046 com doze dias de crescimento (barra: 100 μ m). Setas indicam presença de clamidósporos. B. Hifas da linhagem RS046 de *Escovopsioides* sp. sobre gongilídios (barra: 300 μ m). C-D. Hifas da linhagem RS046 de *Escovopsioides* sp. sobre gongilídios (barra: 500 μ m).....43

Lista de Tabelas

Tabela 1. Origem dos isolados dos fungos utilizados nos experimentos e mantidos na Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM – UNESP).	23
Tabela 2. Crescimento (área \pm erro padrão em cm ²) e porcentagem de inibição do fungo cultivado pelas formigas cortadeiras, <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> FF2006, na presença de diferentes fungos filamentosos.	29
Tabela 3. Crescimento micelial (área média \pm erro padrão, em cm ²) de <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> FF2006, após 21 dias na presença dos extratos brutos de fungos filamentosos cultivados na ausência (EBA) e na presença (EBP) do fungo mutualista.	33
Tabela 4. Crescimento micelial (média \pm erro padrão, em cm ²) de <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> FF2006, após 21 dias na presença da fração acetato (FA) de cultivos de fungos filamentosos associados às formigas cortadeiras.	36
Tabela 5. Crescimento micelial (média \pm erro padrão, em cm ²) de <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> FF2006, após 21 dias na presença da fração butanol (FB) de cultivos de fungos filamentosos associados às formigas cortadeiras.	37
Tabela A1. Estatísticas obtidas do teste ANOVA (2 critérios) para os experimentos de crescimento micelial do fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> a partir dos ensaios de co-cultivo frente a diferentes linhagens de fungos filamentosos.	58
Tabela A2. Estatísticas obtidas do teste ANOVA (2 critérios) para os experimentos de crescimento micelial de <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> frente aos extratos brutos de linhagens <i>Escovopsis</i> sp. e <i>Escovopsioides</i> sp. cultivados na ausência (EBA) e na presença (EBP) do fungo mutualista.	58
Tabela A3. Estatísticas obtidas do teste ANOVA (2 critérios) para os experimentos de crescimento micelial do fungo <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> a partir da comparação dos extratos brutos na ausência (EBA) com os extratos brutos na presença (EBP) do fungo mutualista das linhagens <i>Escovopsis</i> sp. e <i>Escovopsioides</i> sp.	59
Tabela A4. Estatísticas obtidas do teste ANOVA (2 critérios) para os experimentos de crescimento micelial de <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> frente as frações acetato e butanol de extratos de cultivo de linhagens de <i>Escovopsis</i> sp. e <i>Escovopsioides</i> sp.	59

Sumário

1 INTRODUÇÃO	9
2 ESTADO DA ARTE.....	11
2.1 Fungicultura praticada pelas formigas da tribo Attini	11
2.2 Micro-organismos associados aos jardins das formigas da tribo Attini.....	13
2.3 Fungos micoparasitas.....	16
2.4 <i>Escovopsis</i> : fungo micoparasita do jardim das formigas da tribo Attini	19
3 OBJETIVOS	21
4 MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Linhagens avaliadas	22
4.2 Ensaios de co-cultivo <i>in vitro</i>	23
4.2.1 Procedimento	23
4.2.2 Avaliação e análise dos dados.....	24
4.3 Ensaios com extratos.....	25
4.3.1 Testes utilizando extratos brutos.....	25
4.3.2 Testes utilizando as frações acetato de etila e butanol.....	25
4.3.3 Avaliação e análise dos dados dos ensaios com extratos.....	26
4.4 Análise por HPLC	27
4.5 Estudo das interações físicas entre os fungos antagonistas e o fungo mutualista das formigas cortadeiras.....	27
5 RESULTADOS.....	29
5.1 Ensaios de co-cultivo <i>in vitro</i>	29
5.2 Ensaios para avaliação da ação antifúngica das linhagens	32
5.3 Ensaios para avaliação da ação antifúngica das frações	35
5.4 Avaliação das frações por HPLC	38
5.5 Avaliação da interação física entre os fungos filamentosos e o fungo mutualista.....	39
6 DISCUSSÃO	44
7 CONCLUSÕES	50
8 PERSPECTIVAS	51
REFERÊNCIAS.....	52
APÊNDICE	58

1 INTRODUÇÃO

As formigas da tribo Attini desenvolveram o fascinante hábito de cultivar fungos e utilizá-los como alimento. Os gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, conhecidos como formigas cortadeiras, praticam uma fungicultura considerada a mais derivada da tribo, caracterizada pelo uso de folhas e flores frescas como substrato para o crescimento do parceiro fúngico.

O fungo cultivado por esses insetos é um basidiomiceto denominado de *Leucoagaricus gongylophorus* (*Basidiomycota: Agaricales: Agaricaceae*). Nesta associação, as formigas fornecem proteção e o substrato vegetal necessário para o desenvolvimento do seu parceiro; em contrapartida, o fungo é a principal fonte de nutrientes para as larvas e as rainhas desses insetos.

Os ninhos dessas formigas abrigam diversas câmaras subterrâneas, muitas das quais são preenchidas com o “jardim de fungo”. Essa estrutura compreende o material vegetal forrageado e preparado pelas operárias, além do micélio do fungo mutualista, o micro-organismo dominante nesse substrato. Estudos relacionados à diversidade genética do fungo indicam que, em uma mesma colônia, apenas uma única linhagem do fungo mutualista é encontrada nos jardins de fungo espalhados nas várias câmaras. Nesse sentido, as formigas cortadeiras apresentam monoculturas de fungos em seus ninhos.

Teorias evolutivas sugerem que organismos que apresentam baixa variabilidade genética são mais vulneráveis à infecções por parasitas. Nesse contexto, vários estudos demonstraram a presença de parasitas no jardim de fungo das formigas cortadeiras. Por exemplo, fungos do gênero *Escovopsis* (*Ascomycota: Hypocreales*) são considerados parasitas do fungo cultivado pelas formigas e ocasionam um impacto negativo no desenvolvimento do jardim, levando em alguns casos, à morte da colônia.

Apesar dos avanços sobre a biologia de *Escovopsis* sp., pouco se conhece a respeito do mecanismo de interação entre esse parasita e o fungo cultivado pelas formigas. Apenas um estudo investigou o modo de como o parasita interage com *L. gongylophorus*, no qual foi demonstrado em experimentos *in vitro* que *Escovopsis* sp. provoca a degeneração do micélio do fungo mutualista, assim, utilizando as hifas do hospedeiro como fonte de nutrientes (REYNOLDS; CURRIE, 2004). Segundo o estudo, a degeneração das hifas poderia estar relacionada à liberação de substâncias químicas por *Escovopsis* sp., já que nenhuma interação física, como o contato entre as hifas do parasita e do hospedeiro, foi observada. Entretanto, os autores desse estudo não avaliaram se substâncias químicas estão realmente envolvidas no parasitismo.

Além do parasita *Escovopsis* sp., os jardins de fungo das formigas Attini abrigam uma variedade de outros micro-organismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Embora estudos tenham revelado a diversidade microbiana associada aos jardins de fungo, poucos

avançaram no conhecimento do papel desses micro-organismos nesse substrato. Recentemente, um novo gênero de fungo filamentosso denominado *Escovopsioides* foi encontrado nos jardins de fungo das formigas cortadeiras (AUGUSTIN et al., 2013). Esse gênero apresenta características morfológicas semelhantes à de *Escovopsis* sp., entretanto, nada se conhece a respeito do papel ecológico desempenhado por este fungo.

Neste contexto, para avançar no entendimento da biologia dos micro-organismos associados aos jardins de formigas cortadeiras, este trabalho avaliou o mecanismo de ação envolvido no antagonismo de *Escovopsis* sp. e de *Escovopsioides* sp. frente ao fungo *L. gongylophorus*. O presente estudo tentou responder as seguintes perguntas: (i) *Escovopsis* sp. atua pela produção de compostos químicos ou por ação física?; (ii) fungos do gênero *Escovopsioides* podem ser considerados antagonistas do fungo mutualista? Para responder a essas questões, o presente estudo avaliou a inibição do fungo mutualista em ensaios de co-cultivo *in vitro* com linhagens de *Escovopsis* sp. e *Escovopsioides* sp., além de testar a ação antifúngica de extratos de meio de cultivo de ambos os fungos. Adicionalmente, ensaios de antagonismo aliados a análises com microscopia eletrônica de varredura foram realizados para observar as possíveis interações entre as hifas dos fungos teste com as hifas do fungo mutualista.

Os resultados demonstraram que a interação de *Escovopsis* sp. frente ao fungo mutualista é mediada pela (i) produção de metabólitos com ação antifúngica e (ii) o contato entre as hifas do parasita e do hospedeiro. *Escovopsioides* sp. também inibiu o crescimento do fungo mutualista em todos os testes realizados. Assim, tal fungo também pode ser considerado um antagonista do fungo das formigas cortadeiras, porém, não aparenta ser tão agressivo em comparação com *Escovopsis* sp., pois, em ensaios *in vitro*, proporcionou a menor inibição do crescimento micelial do fungo mutualista. Estudos adicionais para melhor compreender o papel ecológico desempenhado por *Escovopsioides* sp. nos ninhos dessas formigas devem ser realizados, além de futuros estudos para elucidar a natureza da(s) molécula(s) envolvida(s) na inibição do fungo mutualista.

2 ESTADO DA ARTE

2.1 Fungicultura praticada pelas formigas da tribo Attini

A tribo Attini compreende 16 gêneros com 256 espécies catalogadas (BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES; SANHUDO, 2011; SOSA-CALVO et al., 2013). As formigas dessa tribo compartilham a habilidade de cultivar fungos como alimento, sendo que essa associação de mutualismo entre os dois organismos, segundo uma hipótese, originou-se na bacia amazônica há cerca de 50 milhões de anos (SCHULTZ; BRADY, 2008; SOLOMON et al., 2008).

A maioria das espécies de formigas da tribo Attini apresenta ninhos inconspícuos, com casta de operárias monomórficas (i.e. um só tipo morfológico) e não promovem danos à agricultura. Por outro lado, as formigas cortadeiras são conhecidas por apresentarem ninhos notáveis, castas de operárias polimórficas (i.e. mais que um tipo morfológico) e por causarem prejuízos econômicos na agricultura e silvicultura, pois cortam grandes quantidades de folhas para o cultivo do fungo mutualista (BRANDÃO et al., 2011; DELLA LÚCIA; GANDRA; GUEDES, 2013). Devido a este comportamento, esses insetos são conhecidos os herbívoros dominantes do Neotrópico (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Apesar desse efeito danoso para o homem, as formigas cortadeiras são de extrema importância para o ecossistema, pois atuam na dispersão de sementes, aumentam a aeração e drenagem dos solos com suas construções subterrâneas, bem como favorecem o enriquecimento destes com material orgânico encontrado nas câmaras dos ninhos (DELLA LÚCIA; SOUZA, 2011).

Schultz e Brady (2008) e Mehdiabadi e Schultz (2009) relatam que durante a evolução da tribo Attini as formigas se associaram a diferentes fungos mutualistas, o que levou à formação de cinco tipos de fungicultura, a saber: a fungicultura (i) das Attini primitivas (“fungicultura inferior”) praticada pelos gêneros *Mycocepurus*, *Myrmicoipta*, *Apterostigma*, *Mycetophylax*, *Mycetarotes*, *Mycetosoritis*, *Mycetagroicus*, *Kalathomyrmex* e *Cyphomyrmex*. Essas formigas utilizam substrato vegetal seco, carcaças e fezes de invertebrados para o cultivo do seu parceiro fúngico (fungos pertencentes à família *Agaricaceae*, tribo *Leucocoprinae*), os quais também podem ser encontrados vivendo fora da associação com as formigas (i.e. “vida-livre”); (ii) de formigas do gênero *Apterostigma*, as quais cultivam fungos da família *Pterulaceae*; (iii) das formigas do grupo *Cyphomyrmex rimosus*, as quais também cultivam fungos da tribo *Leucocoprinae*, porém, na forma de levedura, os quais também podem ser encontrados em vida-livre; (iv) das formigas Attini derivadas do gênero *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex*, as quais utilizam material vegetal fresco e seco para o cultivo do seu parceiro fúngico. Os fungos dessas formigas aparentam ser “domesticados”, pois não foram encontrados representantes de vida-livre; (v) das formigas

cortadeiras (gêneros *Atta* e *Acromyrmex*), as quais mantêm uma relação mutualista com o fungo *L. gongylophorus* (Basidiomycota: Agaricales, Agaricaceae, SINGER, 1986; PAGNOCCA et al., 2001). Essas formigas cortam e coletam folhas e flores frescas, que servem como substrato para o desenvolvimento do fungo. Em contrapartida, o fungo cultivado serve como a principal fonte de nutrição das larvas desses insetos e das rainhas (SILVA et al., 2003).

Leucoagaricus gongylophorus é cultivado pelas formigas cortadeiras na forma micelial em uma estrutura denominada jardim de fungo. Esse substrato é composto pelo micélio do fungo mutualista e fragmentos de folhas e flores (Figura 1A). As hifas desse fungo apresentam na sua extremidade uma estrutura denominada gongilídio (Figura 1B), a qual acumula os nutrientes necessários para a alimentação das larvas (MARICONI, 1970; WEBER, 1972; QUINLAN; CHERRETT, 1979; SILVA et al., 2003; PAGNOCCA et al., 2011).

Figura 1. A: Jardim de fungo de *Atta sexdens rubropilosa*. Esta estrutura compreende o substrato vegetal forrageado pelas operárias e o micélio do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* (coloração branca). B: Imagem de microscopia de luz do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006 com 15 dias de crescimento, evidenciando a presença de gongilídios, vesículas ricas em nutrientes, nas extremidades das hifas do fungo.

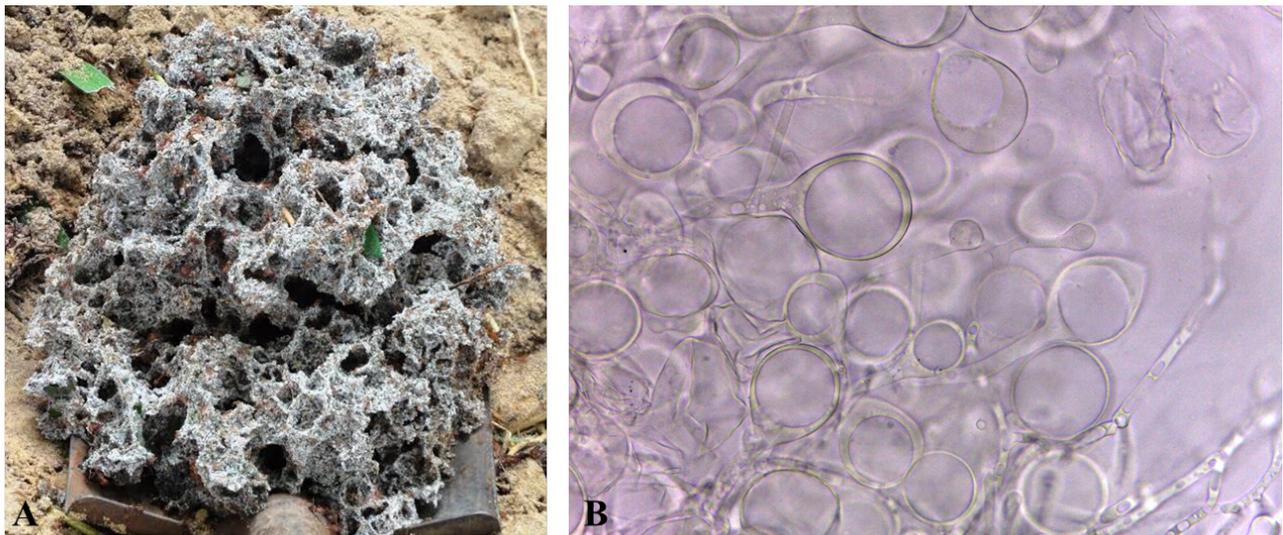


Imagem B: aumento 400x.

Fonte: A. Jaqueline Silva Pereira (discente do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos, IB, UNESP, Rio Claro); B. Sadala Schmidt Varanda Haifig.

Além dos nutrientes e proteção que as formigas oferecem para o fungo, este também tem sua dispersão proporcionada pelas formigas durante o voo nupcial e estabelecimento de novos formigueiros (WEBER, 1972; QUINLAN; CHERRETT, 1979). Durante o voo nupcial, fragmentos do fungo mutualista são carregados na cavidade infrabucal das fêmeas aladas. Após o acasalamento, as fêmeas fecundadas rapidamente voltam ao solo e fundam um novo ninho. No interior da colônia recém-fundada regurgitam os fragmentos de fungo e iniciam o desenvolvimento do jardim (WEBER, 1972).

Até o presente, raramente foi relatada a ocorrência da reprodução sexuada do fungo mutualista na natureza (MUELLER et al., 1998; MUELLER, 2002; PAGNOCCA; RODRIGUES; BACCI JR, 2011), o que contribui para sua baixa variabilidade genética e, conseqüentemente, a vulnerabilidade à infecções por outros competidores (CURRIE et al., 1999a; CURRIE, 2001).

Mueller et al. (2010) realizaram um estudo sobre as culturas do fungo mutualista nos jardins do gênero *Atta* e verificaram que na mesma colônia apenas uma única linhagem do fungo mutualista é mantida pelas operárias. Estes dados permitiram aos autores concluir que as culturas do fungo mutualista na natureza são, na realidade, monoculturas. Esta uniformidade genética das culturas de fungos constitui um problema quanto ao estabelecimento de parasitas, pois muitos aproveitam da baixa variabilidade genética do hospedeiro para se estabelecerem. De fato, nos últimos anos muitos micro-organismos competidores foram descobertos nos jardins de fungos desses insetos.

2.2 *Micro-organismos associados aos jardins das formigas da tribo Attini*

Devido ao intenso hábito de forrageamento das formigas cortadeiras é comum a entrada de diversos micro-organismos nos ninhos, que podem ser potenciais antagonistas para o fungo mutualista (PAGNOCCA; RODRIGUES; BACCI JR, 2011). Em razão disso, as formigas da tribo Attini desenvolveram medidas profiláticas para manter os jardins de fungos livres desses potenciais patógenos, dentre elas destacam-se: (i) a limpeza do material vegetal coletado (CURRIE; STUART, 2001; VAN BAEL et al., 2009; DINIZ; BUENO, 2010); (ii) a constante inoculação do micélio do fungo mutualista no substrato vegetal coletado e recém incorporado ao jardim (WEBER, 1972); (iii) o uso de secreções glandulares que contêm compostos antimicrobianos (MARSARO-JÚNIOR et al., 2001; FERNÁNDEZ-MARÍN et al., 2006; RODRIGUES et al., 2008a) e; (iv) a remoção de fragmentos dos jardins de fungos com a presença de esporos germinados de outros fungos (CURRIE; STUART, 2001).

Embora as formigas tenham desenvolvido tais estratégias para o controle do desenvolvimento de outros micro-organismos nos jardins de fungo, estudos indicam grande diversidade de leveduras, fungos filamentosos e bactérias (MÖLLER, 1896; BACCI et al., 1995; CARREIRO et al., 1997; RIBEIRO, 2000; RODRIGUES et al., 2005; RODRIGUES et al., 2008b; RODRIGUES et al., 2009; SUEN et al., 2010).

Rodrigues et al. (2005) realizaram um levantamento de fungos filamentosos associados às colônias de formigas *Atta sexdens rubropilosa*, após tratamento com iscas tóxicas. Em um total de 60 ninhos (40 de laboratório e 20 de áreas naturais) foi observada uma ocorrência de 54% do fungo *Syncephalastrum racemosum* e 21% de *Escovopsis weberi* em ninhos de laboratório. Por outro lado,

observou-se uma ocorrência de 38% de *Trichoderma harzianum* e 23 % para *Fusarium oxysporum* em ninhos encontrados no campo.

Em estudo posterior realizado por Rodrigues et al. (2008), um total de 37 ninhos de *Acromyrmex* spp. do sul do Brasil foi amostrado. Em 8% dos ninhos, foi identificado um fungo denominado como *Moniliella-like*; e em 40,5% e 27% dos ninhos, foram isolados *Fusarium oxysporum* e *Escovopsis* sp., respectivamente. Rodrigues et al. (2011) estudaram a diversidade de fungos associados a três espécies de formigas (*Atta texana*, *Cyphomyrmex wheeleri* e *Trachymyrmex septentrionalis*), durante o período de um ano, no sul dos Estados Unidos. Os autores isolaram 1435 fungos filamentosos. No geral, os fungos recuperados foram gêneros cosmopolitas¹, encontrados principalmente no solo e no substrato vegetal forrageado pelas operárias. Resultado interessante foi o fato desses autores não encontrarem *Escovopsis* sp. nos jardins amostrados para cada espécie de formiga avaliada.

O fungo identificado como *Moniliella-like* no estudo de Rodrigues et al. (2008) foi recentemente descrito como um gênero novo de fungo ascomiceto, denominado *Escovopsioides* (Figura 2A, AUGUSTIN et al., 2013). Este gênero é monotípico, ou seja, foi descrito baseado apenas em uma espécie. *Escovopsioides nivea* apresenta características morfológicas semelhantes às de *Escovopsis* sp., dentre elas, a formação de conidióforos com aspecto semelhantes à escova (*brush-like*) (Figuras 3B-C), com a presença de fiálides² sobre vesículas bem definidas (embora as fiálides são mais longas em *Escovopsioides* sp.) e a presença de clamidósporos³ (Figura 2B). Assim como *Escovopsis* sp. (ver item 2.4), tal fungo somente foi encontrado em jardins de formigas cortadeiras e nada se conhece sobre o papel ecológico desempenhado nos ninhos desses insetos.

¹ Ampla distribuição, encontrado em quase todo o mundo.

² Célula especializada na produção de esporos assexuados (conídios).

³ Esporo de resistência.

Figura 2. *Escovopsioides* sp. (Ascomycota: Hypocreales). A: aspecto morfológico da cultura de *Escovopsioides* sp. mantida a 25 °C, durante 7 dias. B: imagem de microscopia de luz de *Escovopsioides* sp., mostrando a presença de clamidósporos. C: imagem de microscopia de luz de *Escovopsioides* sp., evidenciando a formação de esporos de origem blástica (seta).



Imagem B-C: aumento 400x

Fonte: A. Sadala Schmidt Varanda Haifig; B-C. Bárbara Monique (discente do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos, IB, UNESP, Rio Claro).

Figura 3. *Escovopsis* sp., fungo parasita do jardim de fungo das formigas da tribo Attini. A: aspecto morfológico da cultura de *Escovopsis* sp. mantida a 25°C, com 7 dias. B-C: microscopia de luz das linhagens de *Escovopsis* sp. ES004 e NL005, respectivamente, mostrando conidióforos, estrutura de reprodução, em forma de “escova”.

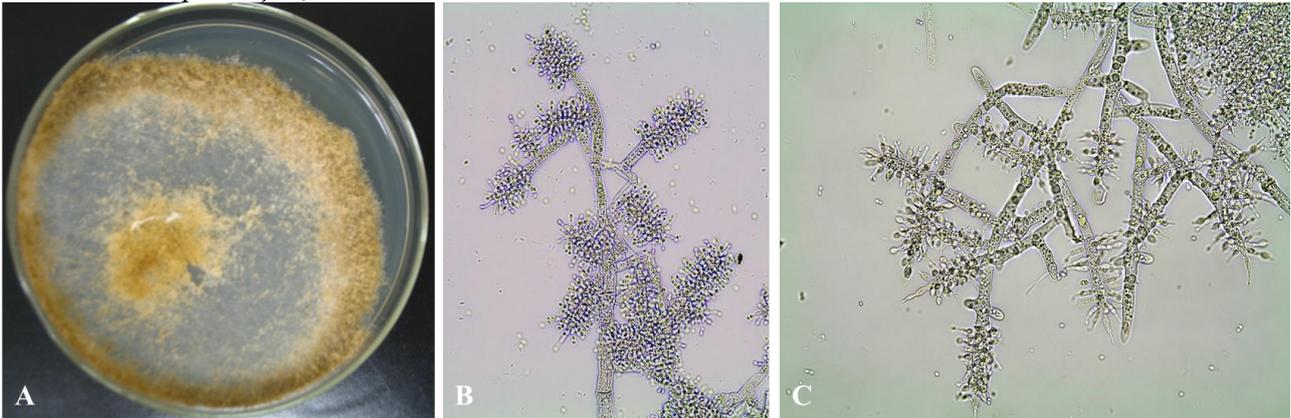


Imagem B-C: aumento 400x.

Fonte: A. Sadala Schmidt Varanda Haifig; B-C. Lucas Andrade Meirelles (discente do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos, IB, UNESP, Rio Claro).

Estudos sugerem que bactérias, leveduras e fungos filamentosos presentes nos jardins das formigas da tribo Attini podem desempenhar funções importantes. Leveduras promovem a degradação de material vegetal do jardim de fungos, possivelmente liberando açúcares simples que auxiliam no crescimento do fungo mutualista (CARREIRO, 2000; MENDES et al., 2012). Bactérias e leveduras também podem atuar na proteção das formigas e da colônia contra infecções fúngicas através da produção de compostos antimicrobianos (CARREIRO et al., 2002; SANTOS et al., 2004; RODRIGUES et al., 2009).

Poulsen e Currie (2006) sugeriram que fungos filamentosos encontrados nos jardins das formigas da tribo Attini são de ocorrência transitória nesse local. Contudo, a interação entre o fungo

mutualista e os demais fungos filamentosos presentes nos jardins ainda não é totalmente conhecida. Alguns autores sugerem que fungos filamentosos presentes nesse substrato podem ser considerados patógenos oportunistas (RODRIGUES et al., 2008b; PAGNOCCA ; MASIULIONIS; RODRIGUES, 2012).

Silva et al. (2006) avaliaram os efeitos de *T. harzianum*, *E. weberi* e *Acremonium kiliense* no crescimento do fungo mutualista de *Atta sexdens rubropilosa*. Os autores verificaram que todos os fungos testados afetaram negativamente o crescimento de *L. gongylophorus*, sendo que algumas linhagens de *E. weberi* foram capazes de degradar o micélio do fungo mutualista. Um estudo semelhante realizado por Folgarait e colaboradores (2011) avaliou a possível utilização de *Escovopsis* e *Leucanicillium lecani* como agentes no controle biológico das formigas cortadeiras. Os autores verificaram que todas as linhagens testadas sobrepujaram o crescimento do fungo mutualista em testes *in vitro*, comprometendo negativamente o crescimento do mesmo. O fungo entomopatogênico *L. lecani* também prejudicou o crescimento do fungo *L. gongylophorus*. Desta forma, os autores sugerem que ambos os fungos podem ser utilizados como agentes no controle biológico das formigas cortadeiras por serem antagonistas ao fungo cultivado por estes insetos. Contudo, estudos adicionais precisam ser realizados para comprovar a real utilidade desses micoparasitas no controle biológico dessas formigas pragas.

Uma associação benéfica para as formigas e bastante estudada é a relação entre *Pseudonocardia* e as formigas da tribo Attini. *Pseudonocardia* é um grupo de bactérias filamentosas que se encontra na cutícula desses insetos. Estudos sugerem que essas bactérias secretam compostos que podem inibir o crescimento do fungo parasita *Escovopsis* e estimular o crescimento do fungo das formigas (CURRIE et al., 1999b; CURRIE, 2001).

2.3 Fungos micoparasitas

Fungos micoparasitas são aqueles que apresentam a capacidade de interagir e utilizar outro fungo como fonte de nutrientes (BARNETT, 1963; GOH; VUJANOVIC, 2010). Segundo o modo de ação sobre o hospedeiro, os fungos parasitas são classificados como: micoparasitas necrotróficos e biotróficos. Micoparasitas necrotróficos matam as células do hospedeiro, através do contato físico e liberação de substâncias tóxicas; sendo, portanto, considerado um parasitismo destrutivo. Já os micoparasitas biotróficos são capazes de obter nutrientes a partir das células vivas do hospedeiro, causando um pequeno dano, porém, sem provocar a morte do hospedeiro (BARNETT, 1964; BARNETT; BINDER, 1973).

Muitos fungos micoparasitas do tipo necrotrófico são capazes de se desenvolver de modo saprofítico na natureza, utilizando uma ampla variedade de substratos como fonte de nutrientes.

Embora estes organismos não exijam obrigatoriamente nutrientes a partir de um hospedeiro, quando parasitam outros fungos, o seu crescimento é beneficiado à medida que se nutrem das células mortas. Esses micoparasitas podem ser facultativos ou oportunistas e secretam enzimas que facilitam a competir por espaço e nutrientes (BARNETT; BINDER, 1973). *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma deliquescens* (= *Trichoderma virens*) são exemplos clássicos de fungos micoparasitas necrotróficos, os quais também apresentam boa capacidade de crescer como competidores saprofiticos de outros fungos (JEFFRIES, 1995).

As relações antagonistas mediadas por micoparasitas necrotróficos são muito agressivas. A hifa do parasita entra em contato e cresce em associação com a hifa do hospedeiro, algumas vezes enrolando-se em volta da hifa do hospedeiro, na qual pode ocorrer penetração. Enzimas secretadas pelo parasita degradam a parede celular do hospedeiro e podem causar a morte citoplasmática do mesmo, antes mesmo do contato entre hifas, ou a morte do citoplasma só ocorre depois que o contato entre as hifas é estabelecido. Micoparasitas necrotróficos tendem a ter uma ampla gama de hospedeiros e o seu mecanismo de infecção não é especializado, ou seja, eles geralmente lançam enzimas líticas⁴ e toxinas no ambiente que são destrutivas e não possuem estruturas especializadas de infecção.

Micoparasitas biotróficos diferem por serem capazes de parasitar as células do hospedeiro sem causarem-lhe danos destrutivos, sendo uma relação fisiologicamente balanceada. Esta relação íntima entre o parasita e o hospedeiro, durante a evolução, fez com que alguns parasitas dependessem exclusivamente do seu hospedeiro para sobreviver, pois perderam a capacidade de sintetizar nutrientes (JEFFRIES, 1995). Com isso, parasitas biotróficos possuem uma faixa restrita de hospedeiros e possuem estruturas especializadas de infecção, como os haustórios⁵ (BARNETT; BINDER, 1973; JEFFRIES, 1995). Por exemplo, o fungo filamentosso *Gliocephalis hyalina* foi reportado desde 1899 em associação com outros fungos. Este fungo é incapaz de crescer em cultura sem a associação com outros fungos (JACOBS; HOLTZMAN; SEIFERT, 2005). Esses mesmos autores estudaram a interação do parasita *G. hyalina* frente a várias espécies de fungos filamentosos: *Fusarium sporotrichioides*, *F. oxysporum*, *F. poae*, *F. verticillioides*, *F. merismoides*, *F. culmorum*, *F. tumidum*, *F. sambucinum*, *F. venenatum*, *F. solani*, *F. torulosum*, *Epicoccum purpurascens*, *Cladosporium cladosporioides*, *Botrytis cinerea*, *Trichoderma viride* e *Alternaria alternata*. Os autores verificaram que *G. hialina*, nos ensaios de culturas pareadas, cresceu e esporulou na presença de todas as espécies de *Fusarium*. Por outro lado, *G. hialina* não se desenvolveu na presença dos fungos filamentosos *E. purpurascens*, *C. cladosporioides*, *B. cinerea*, *T. viride* e *A. alternata*. Nos experimentos realizados por Jacobs et al. (2005), o fungo *G. hialina*

⁴ Enzimas degradadoras de parede celular.

⁵ Estrutura fúngica especializada na absorção de nutrientes a partir da célula do fungo hospedeiro.

mostrou ser um micoparasita biotrófico, exibindo preferência por infectar espécies de *Fusarium*, além de ter sido observada a presença de haustórios nos experimentos de microscopia.

Outro exemplo de micoparasitismo biotrófico é aquele mediado por *Sphaerodes quadrangulares* sobre *Fusarium avenaceum* (GOH; VUJANOVIC, 2010). Através de ensaios de cultura em lâmina, os autores observaram a produção de estruturas de contato em forma de gancho sobre as hifas de *F. avenaceum*. Por outro lado, Goh e Vujanovic (2010) classificaram *S. quadrangulares* como um micoparasita biotrófico de contato facultativo, pois este fungo foi capaz de crescer na ausência de *F. avenaceum*, diferentemente de *G. hialina*, que só foi capaz de se desenvolver quando inoculado juntamente com espécies de *Fusarium* (JACOBS; HOLTZMAN; SEIFERT, 2005).

Os fungos micoparasitas necrotróficos mais estudados pertencem ao gênero *Trichoderma* (*Ascomycota: Hypocreales*) e vários estudos abordando sua fisiologia no ataque ao hospedeiro (DRUZHININA et al., 2011; GRUBER et al., 2011; MARCELLO et al., 2010) e a utilização no controle biológico foram realizados (FERRE; SANTAMARINA, 2010; LOGUERCIO et al., 2009). É sabido que o ataque por *Trichoderma* sp. é realizado em quatro eventos sequenciais: (i) quimiotropismo, (ii) reconhecimento, (iii) ataque e enrolamento na hifa hospedeira e, por último, (iv) a penetração e digestão da parede celular do hospedeiro (STEYAERT, 2009).

Kubicek et al. (2011) analisaram sequências do genoma de três espécies de *Trichoderma* (*T. atroviride*, *T. deliquescens* e *T. reesei*). Segundo os autores, o micoparasitismo em *Trichoderma* sp. depende de uma série de eventos que incluem a lise da parede celular do fungo hospedeiro pela ação de enzimas (quitinases, glicosídeos hidrolases e β -1,3-glucanases) capazes de degradar os carboidratos que compõem a parede celular das hifas. A família GH18 (família de proteínas fúngicas, incluindo as endo-b-N-acetilglucosaminidases) compreende enzimas envolvidas na degradação da quitina, sendo que as espécies micoparasitas *T. atroviride* e *T. deliquescens* apresentam uma elevada diversidade de genes envolvidos na biossíntese de quitinases (KUBICEK et al., 2011). Por outro lado, genes que codificam para a família de enzimas envolvida na degradação de componentes da parede celular vegetal (como a pectina e xilana) são reduzidos em comparação a genomas de outros fungos considerados saprofitos. Outra classe de genes importantes ao micoparasitismo é a de genes que codificam as proteínas para a síntese de metabólitos secundários (policetídeo sintases – PKS e peptídeo sintases não ribossomais - NRPS), que também são abundantes, porém não são significativamente mais expandidos no genoma de *Trichoderma* sp. em relação ao de outros fungos não micoparasitas. Essas evidências demonstram que *Trichoderma* sp. apresenta adaptações voltadas para o micoparasitismo, muitas das quais têm uma base genética.

Outros exemplos de micoparasitas conhecidos são os fungos invasivos *Nectria inventa*, *Pythium acanthicum*, *Rhizoctonia solani*, *Syncephalis californicus* que parasitam as hifas de *Aternaria brassicae*, *Phycomyces blakesleeanus* e fungos da ordem *Mucorales*, respectivamente (JEFFRIES, 1995).

2.4 *Escovopsis*: fungo micoparasita do jardim das formigas da tribo Attini

Dentre os fungos filamentosos encontrados nos jardins das formigas Attini, fungos anamórficos (i.e. assexuados) do gênero *Escovopsis* (*Ascomycota: Hypocreales*) são considerados parasitas especializados do fungo cultivado pelas formigas (Figura 3) (CURRIE et al., 1999a; BOT et al., 2001). Tal parasita ocorre em elevada frequência nos jardins desses insetos (CURRIE et al., 1999c). Estudos epidemiológicos levantam a estimativa que cerca de 33 a 75% dos ninhos estão infectados com *Escovopsis*, especialmente na América Central (CURRIE, 2001). Entretanto, tais estimativas são variáveis e dependem da região geográfica. Por exemplo, a incidência do parasita parece ser menor em algumas regiões do Brasil, pois Rodrigues et al. (2008b) determinaram que a prevalência de *Escovopsis* em ninhos de 10 espécies de *Acromyrmex* localizadas no sul do Brasil era de 27%. O fato dos diferentes estudos realizarem os isolamentos de *Escovopsis* sp. em diferentes intervalos de tempo após a coleta do jardim, também pode explicar as diferenças observadas na frequência de ocorrência do parasita.

Ainda não se sabe como ocorre a transmissão deste parasita entre os ninhos. Alguns autores sugerem que *Escovopsis* sp. seja transmitido por vetores mecânicos, ou seja, através da veiculação dos esporos assexuados aderidos ao corpo de artrópodes que visitam os ninhos (CURRIE, 2001; LITTLE et al., 2006). Por outro lado, Augustin e colaboradores (2013) apontam que a transmissão de *Escovopsis* entre os ninhos está relacionada com o lixo do ninho. *Atta colombica* e *Atta mexicana* e algumas espécies do gênero *Acromyrmex*, depositam o lixo fora dos ninhos. Nesse substrato é possível encontrar partes contaminadas do jardim de fungo e *Escovopsis* sp. é capaz de esporular nesse substrato fora dos ninhos (HART, 2002). Segundo Augustin et al. (2013), a esporulação em lixos externos pode contaminar as operárias forrageadoras de outras colônias, ou dispersar os esporos de *Escovopsis* sp. pela chuva ou outros intempéries.

A presença de *Escovopsis* sp. nos ninhos das formigas foi primeiramente relatada por Möller, em 1893, e atualmente muitas pesquisas com esse fungo estão em curso (PAGNOCCA; MASIULIONIS; RODRIGUES, 2012). O gênero *Escovopsis* sp. compreende cinco espécies descritas, sendo uma isolada de *Atta* sp. (*Escovopsis weberi*, MUCHOVEJ; DELLA LUCIA, 1990), uma de *Trachymyrmex ruthae* (*Escovopsis aspergilloides*; SEIFERT et al., 1995) e três isoladas de

Acromyrmex spp. (*Escovopsis lentecrescens*, *Escovopsis microspora* e *Escovopsis moelleri*; AUGUSTIN et al. 20013).

Estudos sugerem que *Escovopsis* sp. compartilha uma história evolutiva com as formigas e o fungo mutualista, de modo que o parasita coevoluiu com os outros organismos desta associação (CURRIE et al., 2003). Tal diversificação conjunta com as formigas e seu parceiro fúngico proporcionou o aparecimento de grupos específicos de *Escovopsis* sp. que parasitam diferentes fungos mutualistas (CURRIE et al., 2003; GERARDO et al., 2006; TAERUM et al., 2007).

Utilizando análises moleculares e experimentos *in vitro*, Gerardo et al. (2004) apoiou a hipótese de que *Escovopsis* é seletivo para as diferentes linhagens do fungo mutualista no sistema *Cyphomyrmex*. Já as formigas cortadeiras compartilham espécies semelhantes ou as mesmas de *Escovopsis* (TAERUM et al., 2007), pois essas formigas apresentam o mesmo tipo de fungo.

Apesar do entendimento da história evolutiva de *Escovopsis*, pouco se conhece a respeito do modo de ação do parasitismo frente ao hospedeiro *L. gongylophorus*. Sabe-se que *Escovopsis* não pode ser considerado um competidor por nutrientes do fungo mutualista. No único estudo que tentou elucidar a natureza do parasitismo (Reynolds e Currie 2004), *Escovopsis* obteve o melhor crescimento na presença do fungo mutualista. Além disso, os mesmos autores mostraram que o fungo *Escovopsis* sp. não obteve um bom desenvolvimento quando inoculado em placas de Petri contendo material vegetal como fonte de nutrientes. Adicionalmente, por meio de ensaios de micoparasitismo, estes autores demonstraram que ocorre a quebra da hifa do fungo mutualista antes da interação física com a hifa de *Escovopsis* sp.

Reynolds e Currie (2004) classificaram *Escovopsis* sp. como um fungo micoparasita necrotrófico de contato, o que foi evidenciado também nos experimentos *in vitro* com jardins de fungos ocorrendo a descoloração e a degeneração do micélio do fungo mutualista (CURRIE, 1999a). O estudo de Reynolds e Currie (2004) foi importante para elucidar o papel desempenhado por *Escovopsis* nos jardins de fungos, contudo, faltam informações de como ocorre o parasitismo e o modo de ação do parasita.

Neste sentido, para um melhor entendimento da biologia do parasita, o presente estudo procurou elucidar os mecanismos de ação envolvidos no parasitismo de *Escovopsis* frente ao fungo das formigas. Além disso, avaliando o potencial de *Escovopsioides* como antagonista de *L. gongylophorus*, o presente trabalho levantou os primeiros indícios da relação desse novo fungo com o cultivar das formigas cortadeiras.

3 OBJETIVOS

Geral

Avaliar a natureza das interações entre os fungos filamentosos *Escovopsis* sp. e *Escovopsioides* sp. frente a *Leucoagaricus gongylophorus*, fungo cultivado pelas formigas cortadeiras.

Específicos

1. Avaliar em ensaios de co-cultivo as interações entre diferentes linhagens de *Escovopsis* sp. e *Escovopsioides* sp., no crescimento micelial do fungo mutualista;
2. Avaliar a ação inibitória de extratos de cultivo de diferentes linhagens de *Escovopsis* sp. e *Escovopsioides* sp., no crescimento micelial do fungo mutualista;
3. Avaliar se ocorrem interações físicas entre as linhagens de *Escovopsis* sp. e *Escovopsioides* sp., frente ao fungo mutualista das formigas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens avaliadas

O presente trabalho avaliou dez linhagens de *Escovopsis* sp. e duas de *Escovopsioides* sp. frente a *L. gongylophorus*, fungo cultivado pelas formigas cortadeiras.

As linhagens foram obtidas a partir do isolamento de fragmentos de jardim de fungo ou do material de refugio (lixo) de diferentes espécies de formigas cortadeiras (Tabela 1) e foram identificadas através de análises morfológicas e moleculares (RODRIGUES, 2004). Todas as linhagens estão preservadas em glicerol 10%, a -80 °C, e depositadas no acervo da Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM – UNESP), Rio Claro, SP.

Os fungos foram reativados em meio batata-dextrose ágar (BDA, Acumedia) suplementado com 150 µg mL⁻¹ de cloranfenicol (Sigma) e incubados a 25 °C, durante 10 dias (no escuro). Após incubação, todas as linhagens foram avaliadas quanto à pureza através de observações das características macro e microscópicas das colônias. Uma vez confirmada à pureza das culturas, uma coleção de trabalho foi criada, mantendo os fungos a 4 °C, em tubos com o meio BDA inclinado. A coleção de trabalho foi mantida através da transferência dos fungos para novos tubos de BDA a cada seis meses.

A linhagem do fungo mutualista utilizada nesse estudo, *L. gongylophorus* FF2006, foi isolada e cedida pelo Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca. O fungo mutualista foi obtido de um ninho de laboratório de *A. sexdens rubropilosa*, mantido no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), UNESP, Rio Claro. Para o isolamento desse fungo, fragmentos do jardim, sem a presença de operárias, foram inoculados em meio BDA suplementado com 150 µg mL⁻¹ de cloranfenicol (Sigma) e incubados a 25 °C, durante 20 dias (no escuro). Os fragmentos foram monitorados diariamente e aqueles que não apresentaram nenhuma contaminação por outros fungos, foram considerados como a cultura pura de *L. gongylophorus*. A linhagem FF2006 está mantida no Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF) e no Laboratório de Microbiologia do CEIS, UNESP, Rio Claro, SP.

A coleção de trabalho da linhagem FF2006 foi mantida em meio A suplementado com aveia (em g L⁻¹: 10 glicose, 5 NaCl, 5 peptona, 10 extrato de malte (DIFCO), 15 Bacto ágar granulado, 50 aveia) (PAGNOCCA et al., 1990), a 25 °C, com transferências a cada 20 dias. Como critério de seleção de culturas vigorosas, somente fungos com a presença de estáfilas (conjuntos de gongilídios observados com o auxílio de microscópio estereoscópio) foram mantidos na coleção. Durante o experimento observou-se que muitas vezes o micélio do fungo mutualista adquiria um aspecto

“flocoso”, representando a não formação das vesículas nutritivas (Fernando C. Pagnocca, comunicação pessoal).

Ensaio de co-cultivo foram realizados para avaliar a interação das linhagens de *Escovopsis* sp. e *Escovopsioides* sp. frente ao fungo mutualista. Todas as linhagens dos fungos filamentosos também foram avaliadas quanto a dois tipos específicos de interação frente ao fungo *L. gongylophorus*: (i) interação química, o que incluiu a avaliação da ação antifúngica de diferentes extratos e; (ii) interação física, avaliada através de ensaios de antagonismo aliados à microscopia eletrônica de varredura.

Tabela 1. Origem dos isolados dos fungos utilizados nos experimentos e mantidos na Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM – UNESP).

Código	Fungo	Substrato	Formiga	Cidade	Estado
ES002	<i>Escovopsis</i> sp.	Jardim	<i>Atta sexdens</i>	Rio Claro	SP
ES004	<i>Escovopsis</i> sp.	Jardim	<i>Acromyrmex</i> sp.	– ¹	BA
ES005	<i>Escovopsis</i> sp.	Jardim	<i>Atta cephalotes</i>	Alta Floresta	MT
NL001	<i>Escovopsis</i> sp.	Lixo	<i>Atta capiguara</i>	Botucatu	SP
NL005	<i>Escovopsis</i> sp.	Jardim	<i>Atta sexdens</i>	Botucatu	SP
RS019	<i>Escovopsis</i> sp.	Jardim	<i>Acromyrmex ambiguus</i>	Nova Petrópolis	RS
RS020	<i>Escovopsis</i> sp.	Jardim	<i>Acromyrmex laticeps</i>	Nova Petrópolis	RS
RS030	<i>Escovopsis</i> sp.	Jardim	<i>Acromyrmex lundii</i>	São Marcos	RS
RS046	<i>Escovopsioides</i> sp.	Jardim	<i>Acromyrmex heyeri</i>	Sentinela do Sul	RS
RS054	<i>Escovopsioides</i> sp.	Jardim	<i>Acromyrmex</i> sp.	Chувиска	RS
RS055	<i>Escovopsis</i> sp.	Jardim	<i>Acromyrmex heyeri</i>	Chувиска	RS
RS076	<i>Escovopsis</i> sp.	Jardim	<i>Acromyrmex coronatus</i>	Vacaria	RS

¹ sem dado.

4.2 Ensaio de co-cultivo *in vitro*

4.2.1 Procedimento

Para avaliar a ação dos fungos filamentosos (*Escovopsis* sp. e *Escovopsioides* sp.) sobre o fungo mutualista, ensaios de culturas pareadas (co-cultivo) *in vitro* foram realizados seguindo o método proposto por Silva et al. (2006). Discos (5 mm de diâmetro) de micélio do fungo mutualista, previamente crescido em meio A suplementado com aveia a 25 °C, foram cortados e colocados a 1,5 cm de distância da borda de placas de Petri contendo meio BDA. As placas foram incubadas a 25 °C, durante 15 dias, no escuro, período de incubação necessário para permitir o crescimento do fungo mutualista nas placas experimentais.

Todas as linhagens de *Escovopsis* sp. e *Escovopsioides* sp. foram cultivadas previamente em meio BDA e incubadas a 25 °C, durante sete a dez dias. Após incubação, discos de 5 mm de

diâmetro foram removidos do micélio e colocados a 3,0 cm de distância da borda da colônia do fungo mutualista. Para o experimento controle, disco de 5 mm de micélio do fungo mutualista foi colocado no lugar dos fungos filamentosos. As placas foram incubadas a 25 °C, durante 14 dias, no escuro.

Todos os confrontos entre o fungo mutualista e as 12 linhagens elencadas na Tabela 1 foram realizados em seis réplicas, incluindo o experimento controle. Portanto, os ensaios de co-cultivo totalizaram 78 confrontos.

4.2.2 Avaliação e análise dos dados

O efeito de cada linhagem de *Escovopsis* sp. e *Escovopsioides* sp. no crescimento do fungo mutualista foi monitorado e registrado diariamente. Para tanto, as placas foram digitalizadas em *scanner* (HP Deskjet F2050, impressora multifuncional). Após a digitalização, as imagens das placas com 0, 3, 5, 7, 10 e 14 dias de incubação foram analisadas no *software* Image J v. 1.38 (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012), para realizar a medição da área da colônia do fungo mutualista (em cm²).

As áreas de crescimento micelial de *L. gongylophorus* frente aos fungos filamentosos e em relação ao controle foram analisadas utilizando ANOVA dois fatores. Os dados foram verificados quanto à normalidade e a homogeneidade de variância, utilizando os testes de Shapiro-Wilk e de Bartlett, respectivamente. Os dados foram transformados por raiz quadrada ou logaritmo para atingir normalidade e homocedasticidade, quando necessário. As análises foram realizadas no programa R (versão 2.12.1, The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2011).

Adicionalmente, foi calculada a porcentagem de inibição do fungo mutualista frente aos fungos filamentosos. A eficiência de crescimento (E) do fungo foi calculada dividindo-se a área de crescimento médio das colônias após 14 dias (AF), pela área de crescimento médio inicial das colônias (AI), conforme a fórmula: $E = AF/AI$. Além disso, a eficiência relativa do crescimento das colônias de *L. gongylophorus* na presença de diferentes fungos filamentosos foi expressa em relação ao controle do fungo mutualista, pela fórmula: $ER = E/EC$, sendo EC a eficiência do crescimento do controle do mutualista.

4.3 Ensaaios com extratos

4.3.1 Testes utilizando extratos brutos

Para verificar a produção de compostos químicos com ação antifúngica por parte dos fungos filamentosos, dois tipos de extratos foram gerados neste estudo: (i) extrato bruto na ausência (EBA) e (ii) o extrato bruto na presença (EBP) do fungo *L. gongylophorus*. A estratégia de acrescentar o fungo mutualista no meio de cultivo para os fungos filamentosos nesses ensaios foi realizada para avaliar se *Escovopsis* sp. e *Escovopsioides* sp. produzem algum composto com atividade inibitória somente na presença do fungo mutualista.

No caso dos EBA, as linhagens de *Escovopsis* sp. e *Escovopsioides* sp. foram inoculadas em meio BDA e incubadas durante sete a dez dias, a 25 °C, no escuro. A partir dessas culturas, suspensões com aproximadamente 10^6 esporos mL⁻¹ (padronizada em câmara de Neubauer) de *Escovopsis* sp. foram inoculadas em Erlenmeyers (de 125 mL) contendo 90 mL de caldo batata-dextrose (Himedia). Os frascos foram incubados a 25 °C, durante 14 dias, sob agitação (120 rpm). Devido à baixa esporulação das linhagens de *Escovopsioides* sp., cinco discos (5 mm de diâmetro) foram removidos do micélio e inoculados em Erlenmeyers e incubados nas mesmas condições.

Já para EBP, discos de micélio de *L. gongylophorus* FF2006 (5 mm de diâmetro) foram inoculados previamente em Erlenmeyers (125 mL) contendo 90 mL de caldo batata-dextrose (Himedia). Os frascos foram incubados a 25 °C, durante três dias, sob agitação (120 rpm). Após este período, uma suspensão de aproximadamente 10^6 esporos mL⁻¹ dos fungos filamentosos foi inoculada nos Erlenmeyers e posteriormente incubados a 25 °C, durante 14 dias, sob a mesma agitação.

Após incubação, as culturas (EBA e EBP) foram verificadas quanto à pureza (preparação de lâminas e observação ao microscópio, para confirmar se não ocorreu contaminação durante o período de incubação). Uma vez confirmada a pureza, as culturas foram filtradas (membrana filtrante de 0,45µ - Millipore) e incorporadas no meio A suplementado com aveia duplamente concentrado na proporção de 1:1 (v/v).

4.3.2 Testes utilizando as frações acetato de etila e butanol

Na tentativa de se obter frações com ação antifúngica, foram realizadas extrações utilizando os solventes acetato de etila e butanol. Os isolados de *Escovopsis* sp. e *Escovopsioides* sp. foram inoculados em meio BDA e incubados durante sete a dez dias, a 25 °C, no escuro. Após incubação, uma suspensão de aproximadamente 10^6 esporos mL⁻¹ de *Escovopsis* sp. foi inoculada em frascos

Erlenmeyers (de 125 mL) contendo 90 mL de caldo batata-dextrose (Himedia). Os frascos foram incubados a 25 °C, durante 14 dias, sob agitação (120 rpm). No caso dos dois isolados de *Escovopsioides* sp., cinco discos de micélio (5 mm de diâmetro cada) foram inoculados em frascos Erlenmeyers e incubados nas mesmas condições.

Após a incubação, foi realizada uma extração (líquido-líquido) utilizando acetato de etila 1:1 (v/v) e butanol 1:1 (v/v) como solventes imiscíveis. Após o processo de extração, o solvente da fase orgânica foi evaporado a 40 °C à secura utilizando rotaevaporador (Rotaevapor R200; banho Buchi B-490 e recirculador refrigerado Neslab Thermoflex 900). Os resíduos (extratos) obtidos no processo de extração foram incorporados em meio A suplementado com aveia na concentração de 1 mg mL⁻¹. Para os extratos que não foram completamente solúveis em água, dimetil-sulfóxido (DMSO) foi utilizado para solubilizar os mesmos. A concentração de DMSO variou para os extratos obtidos das diferenças linhagens.

4.3.3 Avaliação e análise dos dados dos ensaios com extratos

A ação dos extratos de *Escovopsis* sp. e *Escovopsioides* sp. no crescimento micelial de *L. gongylophorus* FF2006 foi avaliada através da técnica de incorporação em meio de cultivo. Em placas de Petri esterilizadas, pipetou-se a quantidade desejada de extrato (5 mL para os extratos brutos e 1 mL para as frações acetato e butanol), e em seguida, o meio A suplementado com aveia foi adicionado (5 mL para os extratos brutos e 9 mL para as frações) e homogeneizado. Nos ensaios em que foi necessária a utilização do DMSO, foi realizado um experimento controle para saber se o solvente interferia no crescimento de *L. gongylophorus*. O experimento utilizou a mesma concentração de DMSO utilizada na solubilização do extrato (seguindo o método de MENDES, 2010). Após o preparo das placas, um disco de 5 mm de diâmetro do fungo mutualista, previamente crescido em meio A suplementado com aveia (15 a 20 dias), foi inoculado no centro das placas experimentais solidificadas.

O crescimento do fungo mutualista foi registrado digitalizando-se as placas após 3, 7, 14 e 21 dias de crescimento, utilizando *scanner* HP Deskjet F2050. Após a digitalização, as imagens das colônias foram analisadas no *software* Image J v. 1.38 (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012), para realizar a medição da área de crescimento do fungo (em cm²). Para cada extrato foram realizadas sete réplicas.

As médias da área de crescimento micelial de *L. gongylophorus* frente aos diferentes extratos foram avaliadas utilizando-se ANOVA dois fatores. As comparações múltiplas entre as médias foram realizadas pelo teste de Tukey HSD. Os dados foram verificados quanto à normalidade e a homogeneidade de variância, utilizando os testes de Shapiro-Wilk e de Bartlett,

respectivamente. Os dados foram transformados por raiz quadrada ou logaritmo para atingir normalidade e homocedasticidade, quando necessário. As análises foram realizadas no programa R.

4.4 Análise por HPLC

Por apresentar ação inibitória frente ao fungo mutualista nas frações acetato e butanol, a linhagem *Escovopsis* sp. RS076 foi selecionada para análise de cromatografia líquida (HPLC), visando determinar o perfil de metabólitos produzidos por esse fungo. Para a realização deste experimento foram obtidos quatro tipos de preparações: (i) extrato bruto na presença e na ausência do fungo mutualista (conforme descrito no item 4.3.1); (ii) as frações acetato e butanol (conforme descrito no item 4.3.2); (iii) filtrado do meio de cultivo (caldo batata-dextrose) do fungo mutualista após três dias de crescimento e; (iv) filtrado do meio de cultivo (caldo batata-dextrose).

Para se efetuar a análise, as amostras foram injetadas em uma coluna cromatográfica (com fase C18) e foi utilizada uma fase móvel constituída de dois solventes (água e acetonitrila), na qual a proporção de acetonitrila aumentou com o tempo (eluição gradiente).

O cromatógrafo líquido de alta eficiência utilizado apresenta as seguintes especificações: modelo 1260, equipado com bomba quaternária G1311C, desgaseificador G1322A, amostrador automático G1329B, detector de Ultravioleta G1314B e compartimento termostaticado de coluna G1316A (Agilent Technologies).

4.5 Estudo das interações físicas entre os fungos antagonistas e o fungo mutualista das formigas cortadeiras

Neste trabalho foram realizados ensaios de antagonismo para avaliar a interação física entre *Escovopsis* sp. isolados de diferentes espécies de formigas cortadeiras (NL005 – *Atta sexdens*, RS055 – *Acromyrmex heyeri* e RS076 – *Acromyrmex coronatus*) e *Escovopsioides* sp. RS046 e RS054 (Tabela 1), frente ao fungo *L. gongylophorus*. Em uma placa de Petri contendo ágar água, um disco de micélio do fungo filamentos teste foi inoculado a uma distância de 1,5 cm de um disco de micélio do fungo mutualista (5 mm de diâmetro). As placas foram incubadas a 25 °C e monitoradas a cada 12 horas, para se determinar o momento em que as hifas do fungo teste estabelecessem contato com as hifas de *L. gongylophorus*.

No momento do encontro das hifas, as placas foram fixadas com tetróxido de ósmio e, após quatro dias, com o auxílio de um bisturi e uma pinça, o fragmento do fungo mutualista foi destacado da placa e transferido para um suporte de alumínio. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em banhos de acetona com concentração gradativa de 50, 75, 90, 95 e 100%. Após a

desidratação em ponto crítico (Balzers CPD030), o material foi colado com fita adesiva dupla face em suportes de alumínio (*stubs*) e metalizado com ouro em *Sputtering* (Balzers SCD050). Após banho de ouro, o material foi examinado em microscópio eletrônico de varredura (Hitachi TM300). O método empregado no preparo das amostras foi adaptado de Mello et al. (2008).

Além dos experimentos de antagonismo, para efeitos de comparação durante as análises microscópicas, o fungo mutualista e os fungos filamentosos foram cultivados separadamente (controles) e, posteriormente, foram tratados conforme descrito acima. Para cada ensaio foram realizadas cinco réplicas.

5 RESULTADOS

5.1 Ensaios de co-cultivo in vitro

Os ensaios de antagonismo foram realizados para avaliar os efeitos de *Escovopsis* sp. e *Escovopsioides* sp. no crescimento do fungo *L. gongylophorus*. Todas as 12 linhagens avaliadas inibiram significativamente o crescimento do fungo mutualista, quando comparadas ao controle (ANOVA 2 fatores, $P < 0,01$, Tabelas 2 e A1).

Avaliando-se a porcentagem de inibição, todos os fungos filamentosos afetaram negativamente o crescimento micelial de *L. gongylophorus* (Tabela 2). A linhagem *Escovopsis* sp. NL001 proporcionou a maior inibição (78%) do crescimento do fungo *L. gongylophorus*. Já os isolados de *Escovopsioides* sp. apresentaram as menores porcentagens de inibição (45% para RS046 e 56% para RS054), em relação aos isolados de *Escovopsis* sp.

Tabela 2. Crescimento (área \pm erro padrão em cm^2) e porcentagem de inibição do fungo cultivado pelas formigas cortadeiras, *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006, na presença de diferentes fungos filamentosos.

Código	Espécie	AI ¹	AF ²	E ³	ER ⁴	% de inibição
Controle	<i>L. gongylophorus</i>	6,35 \pm 0,33	14,76 \pm 0,56	2,32	1,00 ^{EC}	0
ES002	<i>Escovopsis</i> sp.	5,93 \pm 0,11	5,26 \pm 0,11	0,88	0,38	62
ES004	<i>Escovopsis</i> sp.	6,49 \pm 0,16	6,24 \pm 0,10	0,96	0,41	59
ES005	<i>Escovopsis</i> sp.	6,88 \pm 0,36	7,09 \pm 0,33	1,03	0,44	56
NL001	<i>Escovopsis</i> sp.	6,10 \pm 0,23	3,21 \pm 0,17	0,52	0,22	78
NL005	<i>Escovopsis</i> sp.	5,68 \pm 0,23	4,82 \pm 0,14	0,84	0,36	64
RS019	<i>Escovopsis</i> sp.	5,68 \pm 0,21	4,68 \pm 0,11	0,82	0,35	65
RS020	<i>Escovopsis</i> sp.	5,76 \pm 0,21	5,61 \pm 0,20	0,97	0,42	58
RS030	<i>Escovopsis</i> sp.	5,52 \pm 0,18	4,15 \pm 0,21	0,75	0,32	68
RS055	<i>Escovopsis</i> sp.	6,71 \pm 0,31	4,78 \pm 0,45	0,71	0,30	70
RS076	<i>Escovopsis</i> sp.	5,77 \pm 0,11	5,20 \pm 0,16	0,90	0,39	61
RS046	<i>Escovopsioides</i> sp.	6,013 \pm 0,30	7,78 \pm 0,22	1,29	0,55	45
RS054	<i>Escovopsioides</i> sp.	6,04 \pm 0,16	6,016 \pm 0,27	1,02	0,44	56

¹AI – Área inicial média

²AF – Área final média

³E – Eficiência de crescimento: $E = AF/AI$

⁴ER – Eficiência relativa: $ER = E/EC$

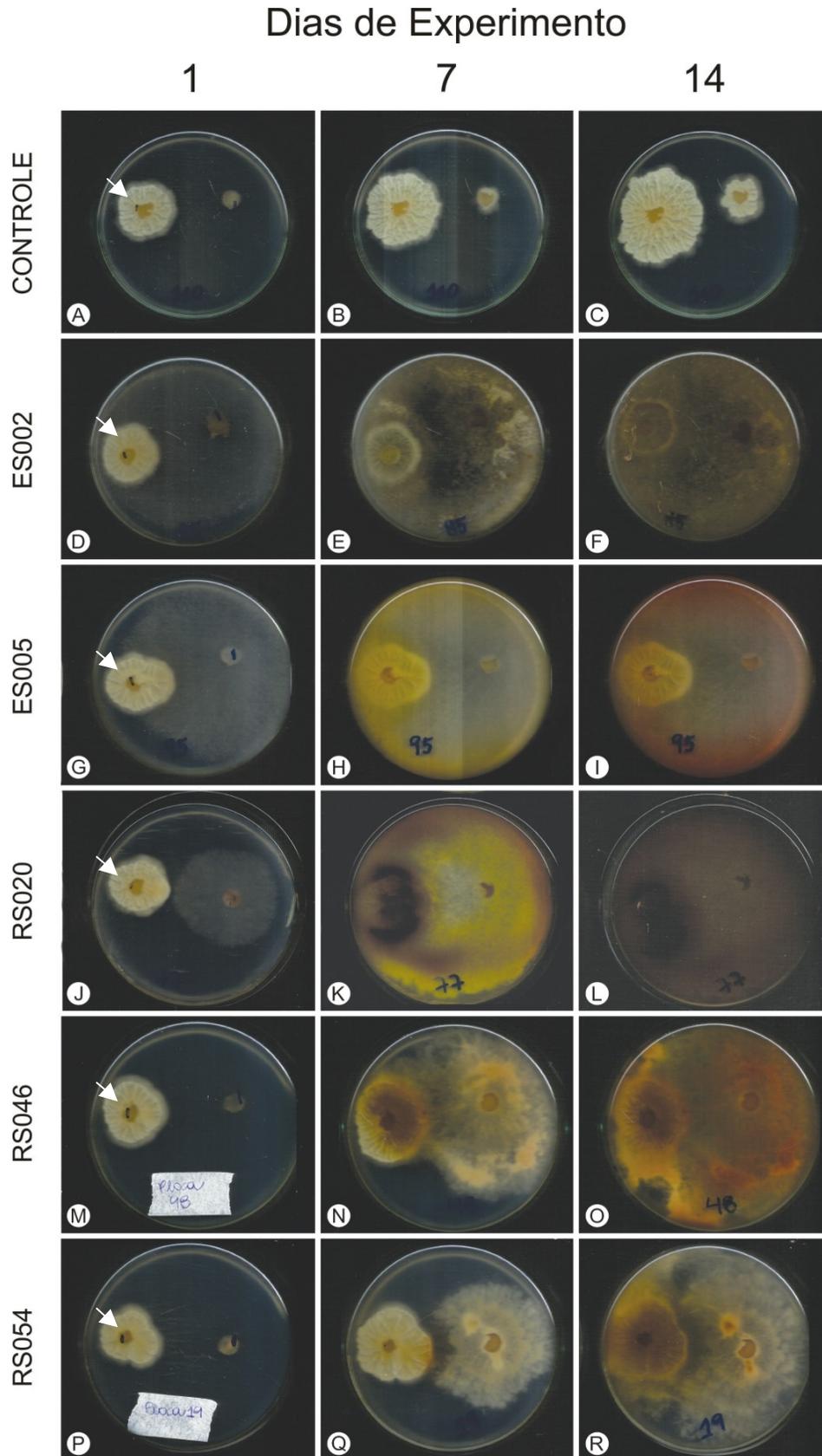
Alterações morfológicas foram observadas em todos os ensaios de co-cultivo (Figura 4). No geral, três tipos de respostas de *L. gongylophorus* foram observadas frente ao antagonismo de *Escovopsis* sp.: (i) mudança de coloração do meio de cultivo de amarelo claro para marrom escuro nos bioensaios utilizando as linhagens ES002, ES004, NL001, NL005, RS019, RS055 e RS076. Ainda nessa categoria, observou-se um leve escurecimento da borda da colônia de fungo *L.*

gongylophorus (ES002, ES004 e RS019) e a ocorrência da degeneração do micélio de forma gradativa (Figuras 4D-F), sendo possível observar apenas vestígios do mesmo no 14º dia de experimento; (ii) as linhagens RS020 e RS030, além da alterarem a cor do meio de cultivo, também proporcionaram a alteração na coloração da colônia do fungo mutualista para preta e também ocorreu a degeneração do micélio do fungo mutualista (Figura 4J-L); e (iii) para a linhagem ES005 alterações maiores não foram evidentes, o meio adquiriu coloração avermelhada apenas. Alterações morfológicas no micélio do fungo *L. gongylophorus* não foram observadas frente à linhagem ES005 (Figura 4G-I).

As linhagens de *Escovopsioides* sp. (RS046 e RS054) também proporcionaram o escurecimento do micélio do fungo *L. gongylophorus*, especialmente nas regiões em que houve contato entre as hifas dos dois fungos. Também foi observado mudanças na coloração do meio de cultivo de amarelo claro para alaranjado (Figura 4O e 4R). O fungo mutualista aparentemente apresentou uma leve antibiose frente a linhagem *Escovopsioides* sp. RS054, contudo, esta foi sobrepujada pelo crescimento do fungo filamentosos (Figura 4Q-R).

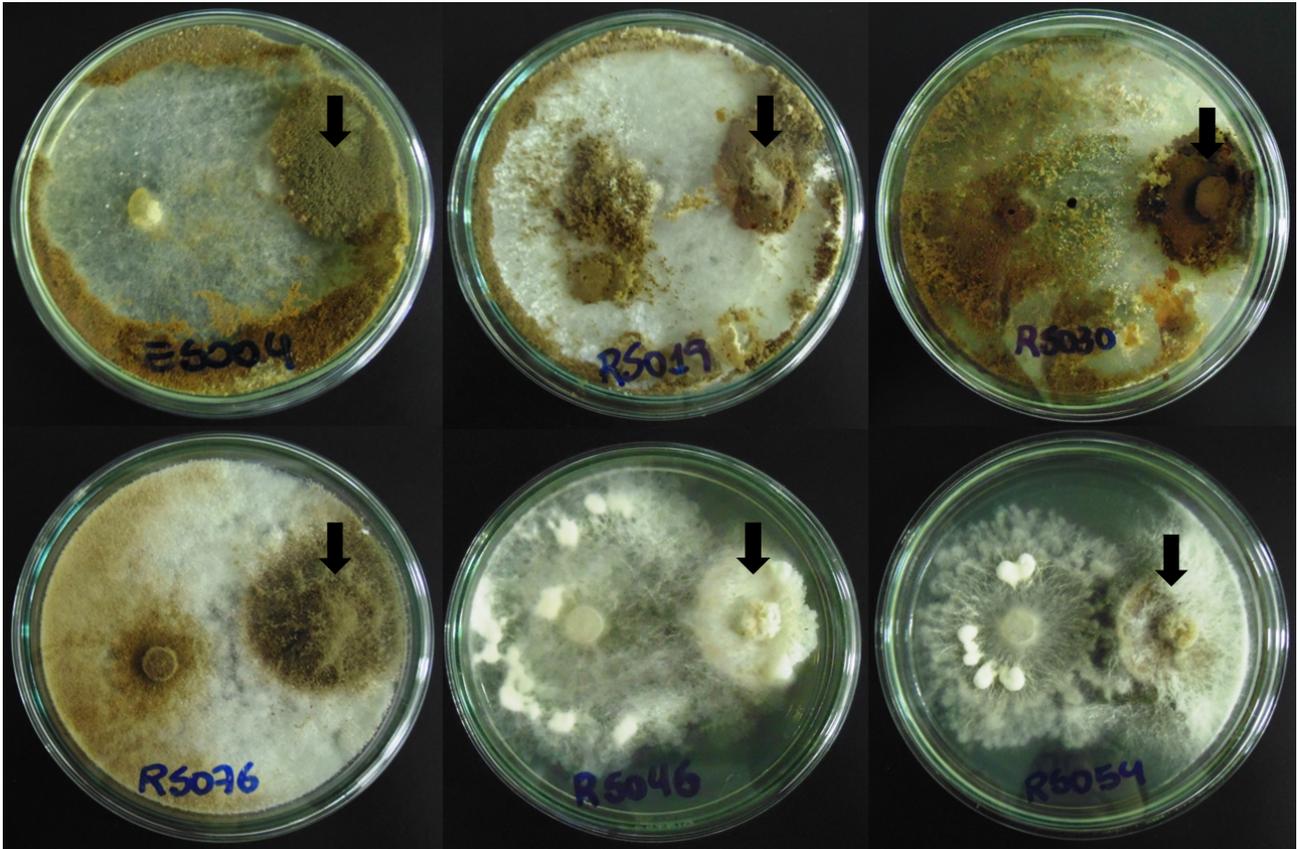
Todas as linhagens de *Escovopsis* sp. cresceram rapidamente por toda a extensão da placa, sobrepujando o crescimento do fungo *L. gongylophorus*. As linhagens de *Escovopsioides* sp. também cresceram de forma rápida em sentido ao fungo mutualista (Figura 5). Regiões de esporulação sobre a colônia do fungo mutualista foram detectadas em todas as placas, tanto para *Escovopsis* sp., quanto para *Escovopsioides* sp. (Figura 5).

Figura 4. Ensaios de co-cultivo *in vitro* entre o fungo mutualista das formigas cortadeiras (*Leucoagaricus gongylophorus* FF2006) e fungos filamentosos *Escovopsis* sp. (ES002, ES005 e RS020) e *Escovopsioides* sp. (RS046 e RS054) isolados dos jardins dessas formigas.



Em cada placa: à esquerda (*L. gongylophorus*); à direita (*Escovopsis* sp. ou *Escovopsioides* sp.). Seta branca aponta a posição do fungo mutualista nas placas experimentais.

Figura 5. Placas de co-cultivo com seis dias de crescimento de diferentes linhagens de *Escovopsis* sp. (ES004, RS019, RS030 e RS076) e *Escovopsioides* sp. (RS046 e RS054) frente ao fungo cultivado pelas formigas cortadeiras, *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006. As setas escuras apontam regiões de esporulação sobre a colônia do fungo mutualista.



Em cada placa: à esquerda (*Escovopsis* sp. ou *Escovopsioides* sp.); à direita (*L. gongylophorus*).

5.2 Ensaio para avaliação da ação antifúngica das linhagens

Para se averiguar a ação antifúngica das linhagens de *Escovopsis* sp. e *Escovopsioides* sp. foram realizados testes com o extrato bruto dos meios de cultivo dos fungos filamentosos na ausência (EBA) e na presença (EBP) do fungo *L. gongylophorus*.

Todos os extratos brutos EBA inibiram significativamente o crescimento do fungo mutualista, quando comparados ao controle (ANOVA 2 fatores, $P < 0,05$, Tabelas 3 e A2, Figura 6). Em adição, todos os extratos EBP também inibiram significativamente o crescimento deste (ANOVA 2 fatores, $P < 0,05$, Tabelas 3 e A2, Figura 6); com exceção da linhagem *Escovopsis* sp. RS030, a qual não inibiu o crescimento do fungo mutualista, quando comparado ao controle do meio (Tabelas 3 e A2).

Comparando os resultados obtidos no tratamento com os EBA e EBP para cada linhagem de fungo filamentosos, cinco linhagens (*Escovopsis* sp. ES005, NL005, RS030, RS055 e RS076) apresentaram diferenças significativas (Tabela 3 e A3), sendo que o crescimento do fungo mutualista nos tratamentos com EBP foram mais inibidos por *Escovopsis* sp. ES005, NL005 e

RS055 (Tabela 3). As linhagens *Escovopsis* sp. RS030 e RS076 proporcionaram a maior inibição de *L. gongylophorus* nos ensaios utilizando o extrato bruto na ausência (Tabela3). Não houve diferença significativa entre os extratos brutos na ausência (EBA) e na presença (EBP) das linhagens de *Escovopsioides* sp. (Tabela 3).

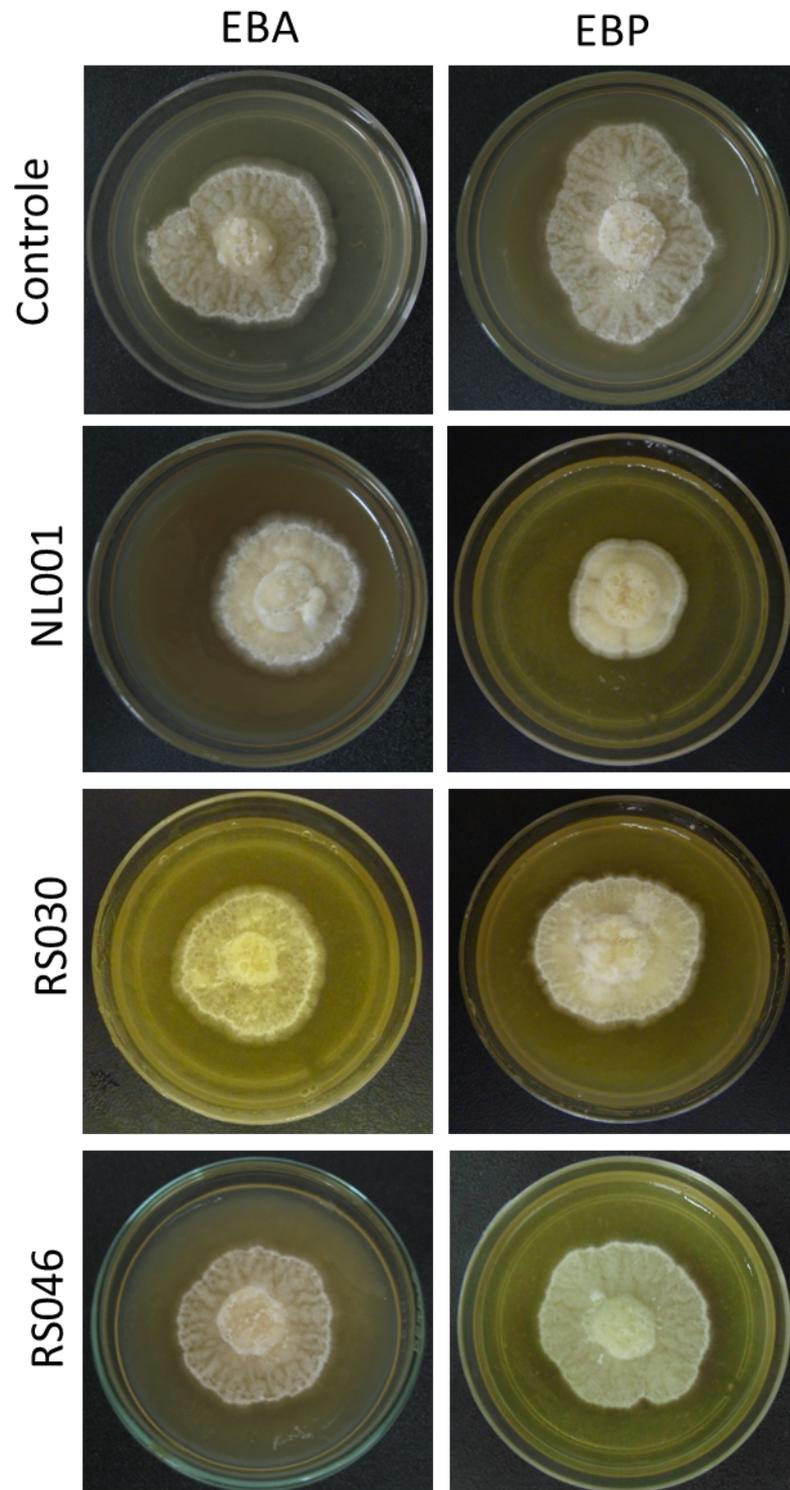
Tabela 3. Crescimento micelial (área média \pm erro padrão, em cm²) de *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006, após 21 dias na presença dos extratos brutos de fungos filamentosos cultivados na ausência (EBA) e na presença (EBP) do fungo mutualista.

Tratamentos	Fungo	EBA ²	EBP ²
Controle Meio ¹		6,35 \pm 0,43 aA	6,35 \pm 0,43 aA
ES002	<i>Escovopsis</i> sp.	2,80 \pm 0,72 bA	2,10 \pm 0,55 bA
ES004	<i>Escovopsis</i> sp.	2,08 \pm 0,36 bA	1,37 \pm 0,11 bA
ES005	<i>Escovopsis</i> sp.	4,80 \pm 0,14 bA	3,96 \pm 0,11 bB
NL001	<i>Escovopsis</i> sp.	3,62 \pm 0,62 bA	2,02 \pm 0,17 bA
NL005	<i>Escovopsis</i> sp.	4,49 \pm 0,07 bA	3,50 \pm 0,19 bB
RS019	<i>Escovopsis</i> sp.	4,04 \pm 0,19 bA	3,50 \pm 0,12 bA
RS020	<i>Escovopsis</i> sp.	4,67 \pm 0,19 bA	3,38 \pm 0,57 bA
RS030	<i>Escovopsis</i> sp.	4,11 \pm 0,78 bA	5,15 \pm 0,20 aB
RS046	<i>Escovopsioides</i> sp.	4,27 \pm 0,14 bA	4,50 \pm 0,32 bA
RS054	<i>Escovopsioides</i> sp.	3,97 \pm 0,53 bA	4,15 \pm 0,74 bA
RS055	<i>Escovopsis</i> sp.	4,35 \pm 0,28 bA	3,63 \pm 0,08 bB
RS076	<i>Escovopsis</i> sp.	2,25 \pm 0,47 bA	3,92 \pm 0,68 bB

¹ Controle do meio: *L. gongylophorus* em meio A com aveia e caldo batata-dextrose.

² Médias seguidas por letras iguais, na coluna (EBA x Controle, letras minúsculas) e na linha (EBA x EBP, letras maiúsculas), não diferem estatisticamente ($\alpha = 0,05$), segundo ANOVA (2 critérios).

Figura 6. Crescimento de *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006 nos extratos EBA e EBP provenientes de linhagens de *Escovopsis* sp. (NL001 e RS030) e *Escovopsioides* sp. (RS046), após 28 dias de incubação. Controle: meio A com aveia suplementado com caldo batata-dextrose.



5.3 Ensaio para avaliação da ação antifúngica das frações

As frações acetato e butanol dos meios de cultivo dos fungos filamentosos foram testadas quanto à ação antifúngica no crescimento do fungo *L. gongylophorus*. Dentre as 12 linhagens de *Escovopsis* sp. avaliadas nos ensaios da fração acetato, apenas cinco (linhagens *Escovopsis* sp. ES004, RS020, RS030, RS055 e RS076) inibiram significativamente o crescimento de *L. gongylophorus*, quando comparado aos controles (ANOVA – 2 fatores, $P < 0,05$, Tabelas 4 e A4). As frações acetato do meio de cultivo das duas linhagens de *Escovopsioides* sp. não inibiram significativamente o crescimento do fungo mutualista (ANOVA – 2 fatores, $P < 0,05$, Tabela 4).

Considerando a fração butanólica, somente quatro linhagens de *Escovopsis* sp. (RS019, RS020, RS030 e RS076) e uma linhagem de *Escovopsioides* sp. (RS054) inibiram significativamente o crescimento do fungo *L. gongylophorus*, quando comparadas aos seus respectivos controles (Tabelas 5 e A4). Portanto, tanto as linhagens de *Escovopsis* sp. quanto as de *Escovopsioides* sp. inibiram significativamente o crescimento do fungo mutualista, considerando a fração butanólica (Tabela 5).

Nos ensaios envolvendo as linhagens *Escovopsis* sp. ES002, ES004 (Tabela 4) e NL005 (Tabela 5), o fungo mutualista apresentou um maior crescimento micelial no controle do solvente (DMSO), em relação ao controle do meio. Apesar da fração acetato da linhagem *Escovopsis* sp. ES004 inibir significativamente o fungo mutualista, em relação aos controles (Tabela 4), pode-se notar um crescimento significativo do fungo na presença de DMSO, quando comparado ao controle do meio de cultivo ($P < 0,05$, Tabela 4). Contudo, a utilização de DMSO não interferiu nesse ensaio, pois o crescimento do fungo mutualista na presença da fração acetato foi significativamente menor tanto no controle do meio, quanto no controle com o solvente.

A fração acetato da linhagem *Escovopsis* sp. ES002 e a fração butanol da linhagem *Escovopsis* sp. NL005 não apresentaram atividade inibitória quando comparada aos controles do meio e do solvente ($P > 0,05$). Entretanto, o controle na presença de DMSO estimulou significativamente o crescimento do fungo mutualista, quando comparado ao controle na ausência do solvente ($P < 0,05$, Tabelas 4 e 5).

Tabela 4. Crescimento micelial (média \pm erro padrão, em cm²) de *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006, após 21 dias na presença da fração acetato (FA) de cultivos de fungos filamentosos associados às formigas cortadeiras.

Linhagem	Fungo	Controle Meio ¹	Controle DMSO ¹	FA
ES002	<i>Escovopsis</i> sp.	4,50 \pm 0,18 a ²	4,85 \pm 0,15 b	4,74 \pm 0,19 a b
ES004	<i>Escovopsis</i> sp.	5,73 \pm 0,26 a	7,33 \pm 0,49 b	4,50 \pm 0,27 c
ES005	<i>Escovopsis</i> sp.	4,57 \pm 0,17 a	4,59 \pm 0,17 a	4,38 \pm 0,18 a
NL001	<i>Escovopsis</i> sp.	5,73 \pm 0,26 a	6,50 \pm 0,34 a	5,35 \pm 0,91 a
NL005	<i>Escovopsis</i> sp.	4,65 \pm 0,17 a	4,92 \pm 0,39 a	4,21 \pm 0,23 a
RS019	<i>Escovopsis</i> sp.	6,04 \pm 0,19 a	6,93 \pm 0,27 a b	5,62 \pm 0,14 a c
RS020	<i>Escovopsis</i> sp.	6,04 \pm 0,19 a	5,20 \pm 0,14 a	4,41 \pm 0,14 b
RS030	<i>Escovopsis</i> sp.	6,04 \pm 0,19 a	5,85 \pm 0,14 a	4,82 \pm 0,24 b
RS046	<i>Escovopsioides</i> sp.	4,50 \pm 0,18 a	- ³	5,09 \pm 0,74 a
RS054	<i>Escovopsioides</i> sp.	5,83 \pm 0,26 a	4,94 \pm 0,28 a	4,87 \pm 0,11 a
RS055	<i>Escovopsis</i> sp.	5,49 \pm 0,31 a	-	4,90 \pm 0,12 b
RS076	<i>Escovopsis</i> sp.	5,73 \pm 0,26 a	4,85 \pm 0,30 a	2,61 \pm 0,93 b

¹ Controle do meio: *L. gongylophorus* em meio A com aveia; Controle DMSO: *L. gongylophorus* em meio A com aveia e 1 mL de solução com a mesma concentração de DMSO utilizada para solubilizar a fração acetato

² Médias seguidas por letras iguais, na linha, não diferem estatisticamente ($\alpha = 0,05$), segundo o teste de Tukey.

³ -: Frações solubilizadas em água.

Além de proporcionar um aumento no crescimento micelial observado em alguns ensaios, também foram observadas alterações morfológicas macroscópicas do fungo mutualista submetido aos tratamentos com DMSO (Figura 7). Escurecimento e aspecto “flocoso” da colônia foram as alterações observadas nesses tratamentos. Analisando as características microscópicas desses fungos, foi possível notar a ausência de gongilídios (Figuras 8). O escurecimento da colônia também foi observado nos ensaios com os extratos brutos de algumas linhagens de *Escovopsis* sp. (Figura 9, **EBA**: ES002, ES004, RS019, NL005 e RS055; **EBP**: ES002, ES005, NL005, RS019, RS030 e RS055).

Tabela 5. Crescimento micelial (média \pm erro padrão, em cm²) de *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006, após 21 dias na presença da fração butanol (FB) de cultivos de fungos filamentosos associados às formigas cortadeiras.

Linagem	Fungo	Controle Meio ¹	Controle DMSO ¹	FB
ES002	<i>Escovopsis</i> sp.	5,33 \pm 0,14 a ²	5,66 \pm 0,14 a	5,67 \pm 0,15 a
ES004	<i>Escovopsis</i> sp.	6,04 \pm 0,19 a	- ³	6,03 \pm 0,41 a
ES005	<i>Escovopsis</i> sp.	4,65 \pm 0,17 a	-	4,85 \pm 0,19 a
NL001	<i>Escovopsis</i> sp.	5,83 \pm 0,26 a	-	5,95 \pm 0,51 a
NL005	<i>Escovopsis</i> sp.	4,75 \pm 0,15 a	5,66 \pm 0,14 b	6,46 \pm 0,20 b
RS019	<i>Escovopsis</i> sp.	5,83 \pm 0,26 a	-	4,30 \pm 0,24 b
RS020	<i>Escovopsis</i> sp.	5,73 \pm 0,26 a	-	4,67 \pm 0,19 b
RS030	<i>Escovopsis</i> sp.	5,73 \pm 0,26 a	-	4,53 \pm 0,25 b
RS046	<i>Escovopsioides</i> sp.	4,50 \pm 0,17 a	-	5,52 \pm 0,41 b
RS054	<i>Escovopsioides</i> sp.	6,04 \pm 0,17 a	-	5,40 \pm 0,25 b
RS055	<i>Escovopsis</i> sp.	5,63 \pm 0,31 a	-	5,10 \pm 0,09 a
RS076	<i>Escovopsis</i> sp.	5,83 \pm 0,26 a	-	4,51 \pm 0,16 b

¹ Controle do meio: *L. gongylophorus* em meio A com aveia; Controle DMSO: *L. gongylophorus* em meio A com aveia e 1 mL de solução com a mesma concentração de DMSO utilizada para solubilizar a fração butanol.

² Médias seguidas por letras iguais, na linha, não diferem estatisticamente ($\alpha = 0,05$), segundo o teste de Tukey.

³ -: Frações solubilizadas em água.

Figura 7. Alterações morfológicas observadas no fungo *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006 nos tratamentos com o solvente DMSO. A e B: reverso e obverso de uma colônia do fungo mutualista no controle do meio (sem DMSO). C e D: reverso e obverso de uma colônia do fungo mutualista na presença do solvente. Placas com 28 dias de crescimento.

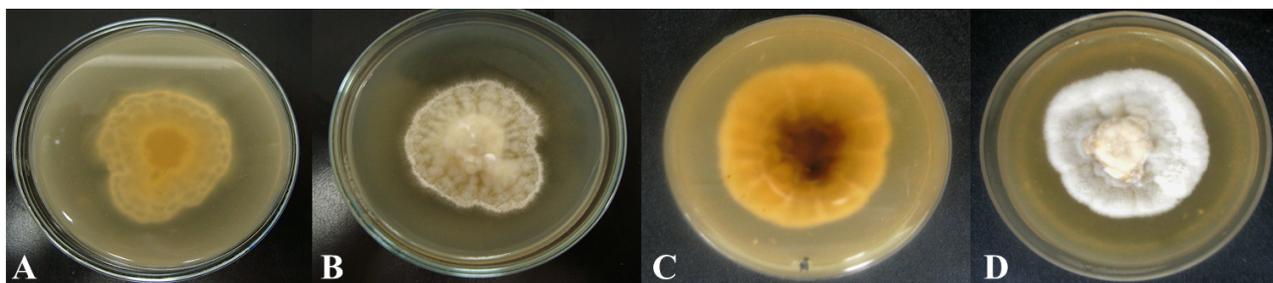
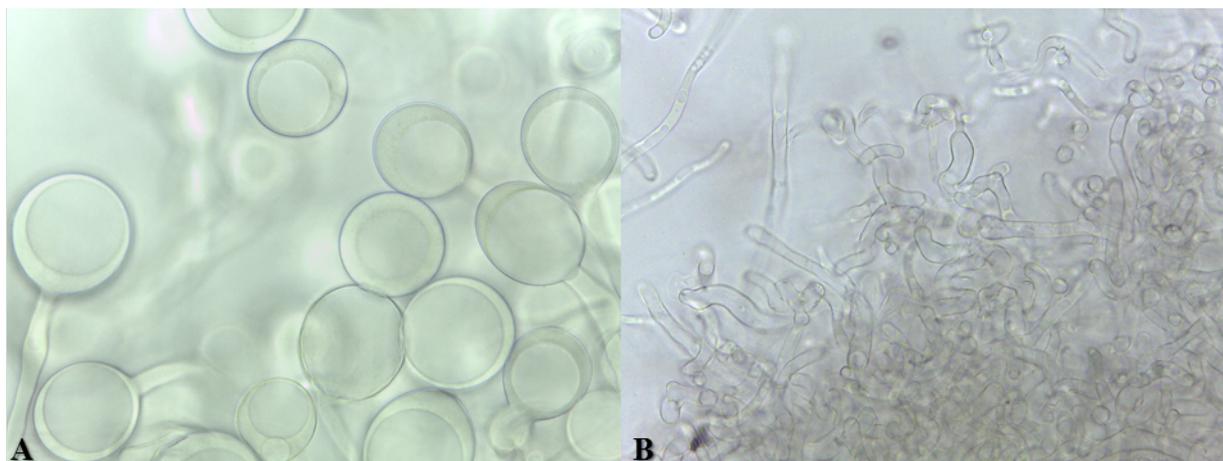
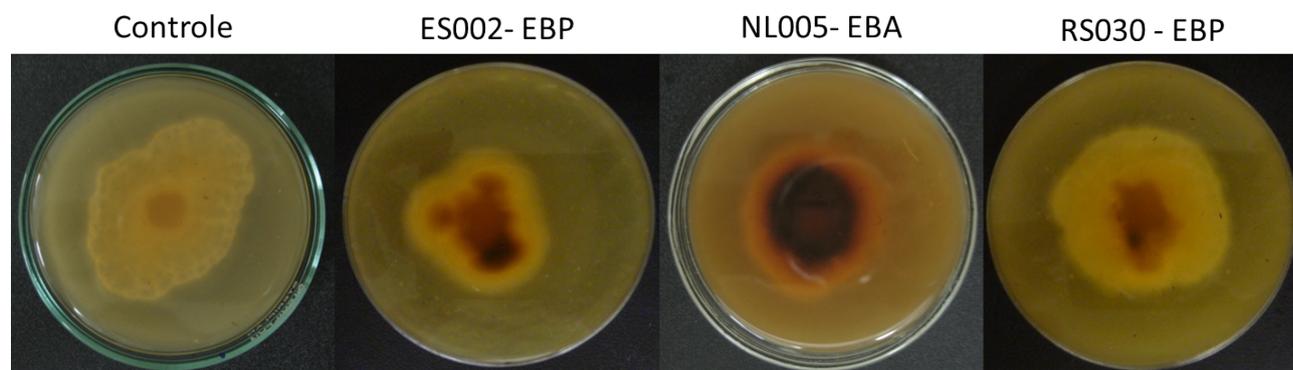


Figura 8. Fungo cultivado pelas formigas cortadeiras, *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006. A: hifas com a presença de gongilídios nas suas extremidades (controle sem DMSO). B: ausência de gongilídios nas hifas do fungo cultivado no controle com DMSO.



Imagens: aumento 400x

Figura 9. *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006 na presença dos extratos EBA e EBP provenientes das linhagens de *Escovopsis* sp. (ES002, NL005 e RS030), após 28 dias de incubação a 25 °C. Note o escurecimento do reverso da colônia de *L. gongylophorus* quando em contato com os extratos. Controle: meio com aveia, suplementado com caldo batata-dextrose.



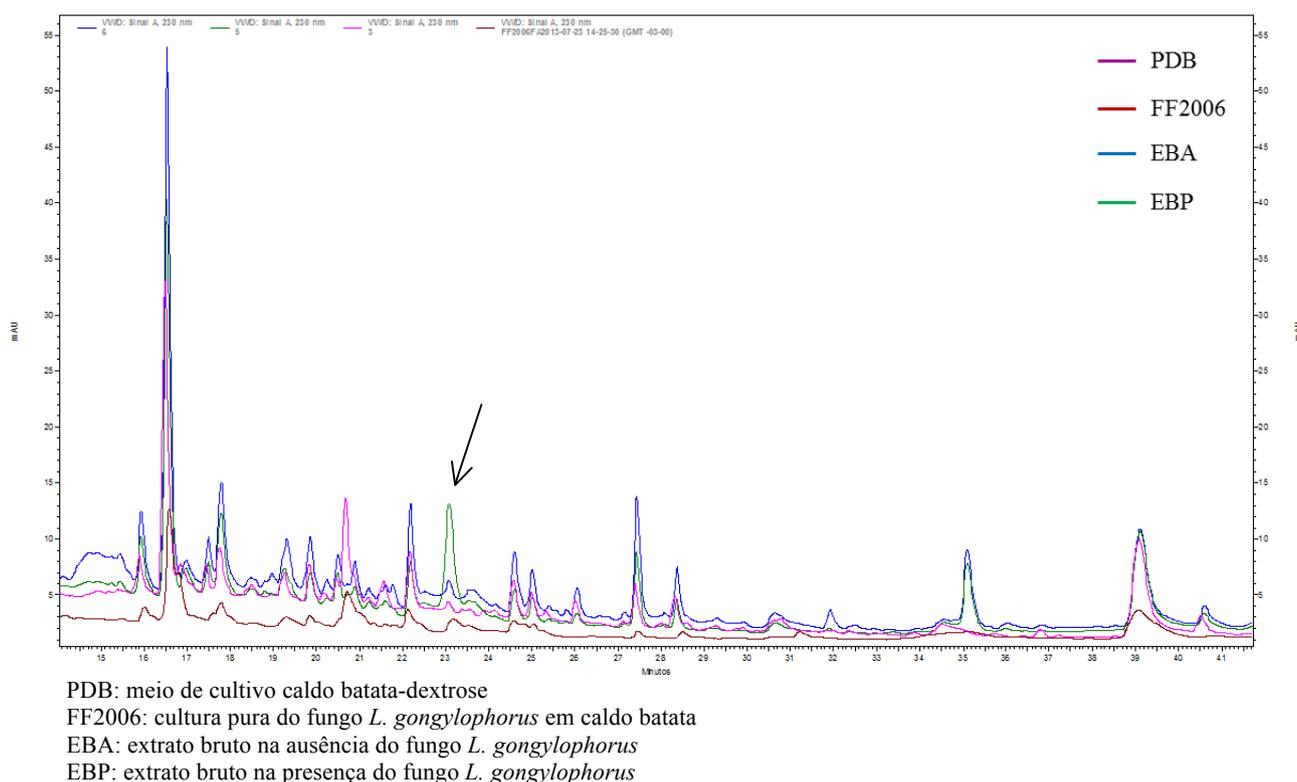
5.4 Avaliação das frações por HPLC

Embora poucas linhagens tenham sido capazes de inibir o fungo *L. gongylophorus* nos ensaios com as frações acetato e butanol, a linhagem *Escovopsis* sp. RS076 foi a que proporcionou a inibição do fungo mutualista em ambas as frações. Por esse motivo, essa linhagem foi selecionada para investigar o perfil de compostos químicos produzidos em diferentes situações.

Subtraindo os espectros obtidos na análise por HPLC (i) das frações acetato, dos espectros do (ii) meio de cultivo PDB (caldo batata-dextrose), (iii) FF 2006, (iv) EBA e (v) EBP, pode-se observar que a linhagem *Escovopsis* sp. RS076 produziu um composto tanto na presença, quanto na ausência do fungo mutualista (Figura 10), sendo que na presença do fungo mutualista o composto

foi produzido em maior quantidade. Esse composto foi obtido após 23 minutos de eluição na coluna cromatográfica. Nos espectros da fração butanol não foram observadas diferenças em relação aos espectros do meio de cultivo PDB, FF2006, EBA e EBP.

Figura 10. Espectro obtido por HPLC da fração acetato da linhagem de *Escovopsis* sp. RS076. A seta evidencia uma maior produção de um composto no extrato bruto na presença do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006 (EBP).



5.5 Avaliação da interação física entre os fungos filamentosos e o fungo mutualista

Após a montagem dos experimentos em placas de Petri, as linhagens de *Escovopsis* sp. cresceram rapidamente em direção ao fungo mutualista (em menos de 24 horas, Figura 11A). As linhagens de *Escovopsioides* sp. (RS046 e RS054), diferentemente de *Escovopsis* sp., cresceram mais lentamente em direção ao fungo mutualista (Figura 11B), levando aproximadamente de 3 a 7 dias para estabelecer contato com o fungo *L. gongylophorus*. *Escovopsioides* sp. demonstrou crescer em direção ao fungo mutualista assim como *Escovopsis* sp., entretanto, também apresentou crescimento radial (Figura 11).

Resultado interessante foi encontrado durante o período de incubação das placas do ensaio controle (fungos filamentosos inoculados em ágar água, na ausência do fungo mutualista). Foi possível observar que todas as linhagens de *Escovopsis* sp. não cresceram nas placas com ágar água

(Figura 12A), enquanto que, as linhagens de *Escovopsioides* sp. cresceram normalmente nas placas do ensaio controle (Figura 12B).

L

L

Figura 11. Ensaio de antagonismo em ágar água. A: Seta aponta micélio de *Escovopsis* sp. RS076 crescendo em direção a *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006 (L). Placa com dois dias de incubação a 25 °C. B: Seta aponta micélio de *Escovopsioides* sp. RS054, crescendo em direção ao fungo mutualista. Placa com cinco de incubação a 25 °C.

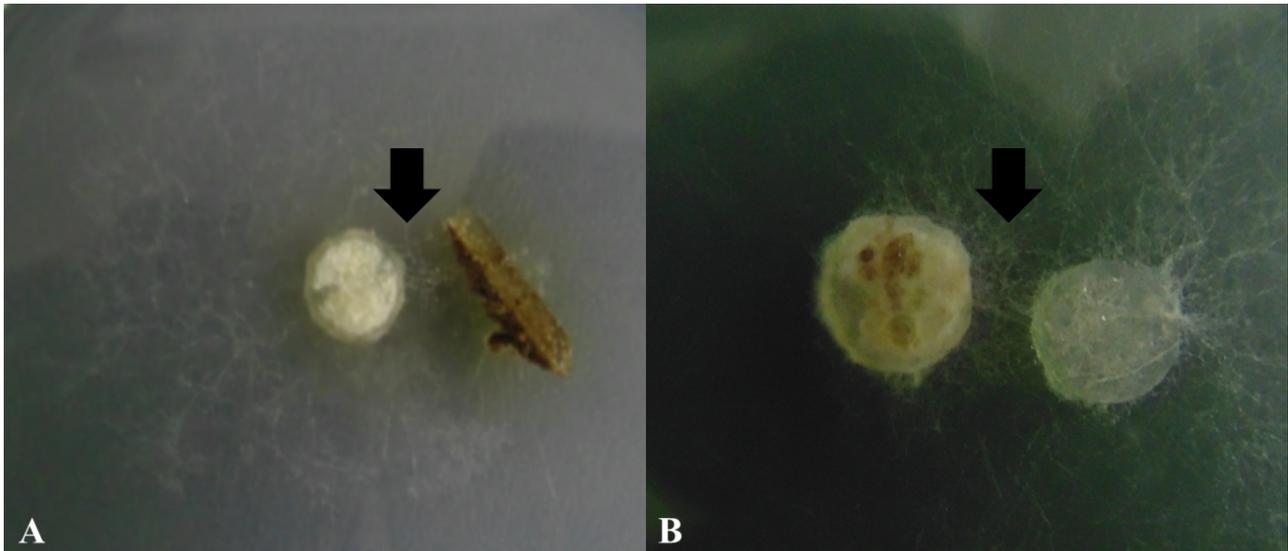
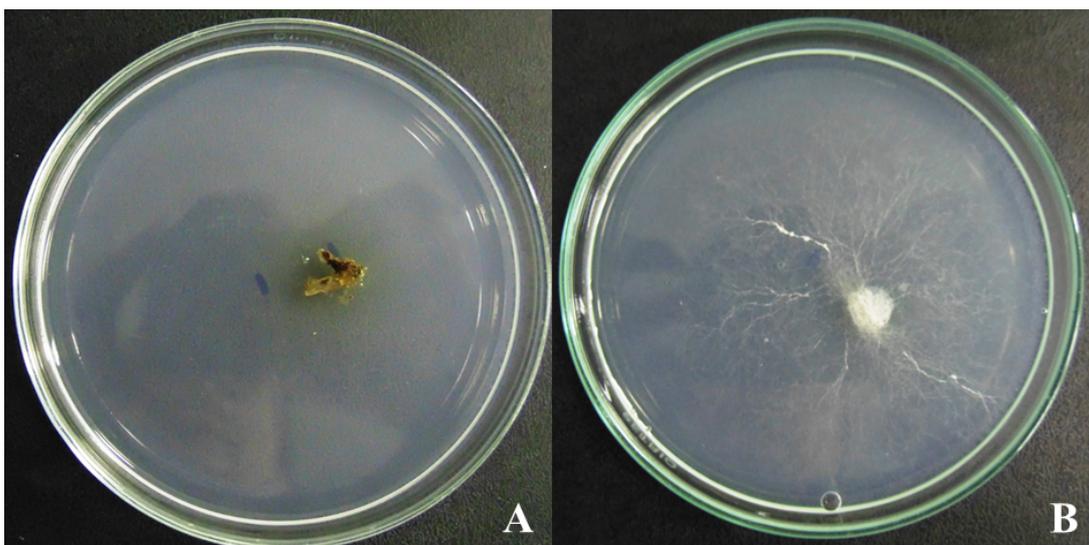


Figura 12. Placas controle dos fungos filamentosos *Escovopsis* sp. RS076 e *Escovopsioides* sp. RS046 nos ensaios de antagonismo em ágar água com quatro dias de experimento. Os fungos foram inoculados nas placas e após quatro dias de incubação: A. Fragmento de *Escovopsis* sp. RS076 não apresentando crescimento micelial. B. Fragmento de *Escovopsioides* sp. RS046 apresentado crescimento micelial.



Após o procedimento de fixação e preparo das amostras para microscopia eletrônica de varredura, foi possível avaliar a ação de três linhagens de *Escovopsis* sp. (NL005, RS055 e RS076) e duas de *Escovopsioides* sp. (RS046 e RS054) sobre *L. gongylophorus*.

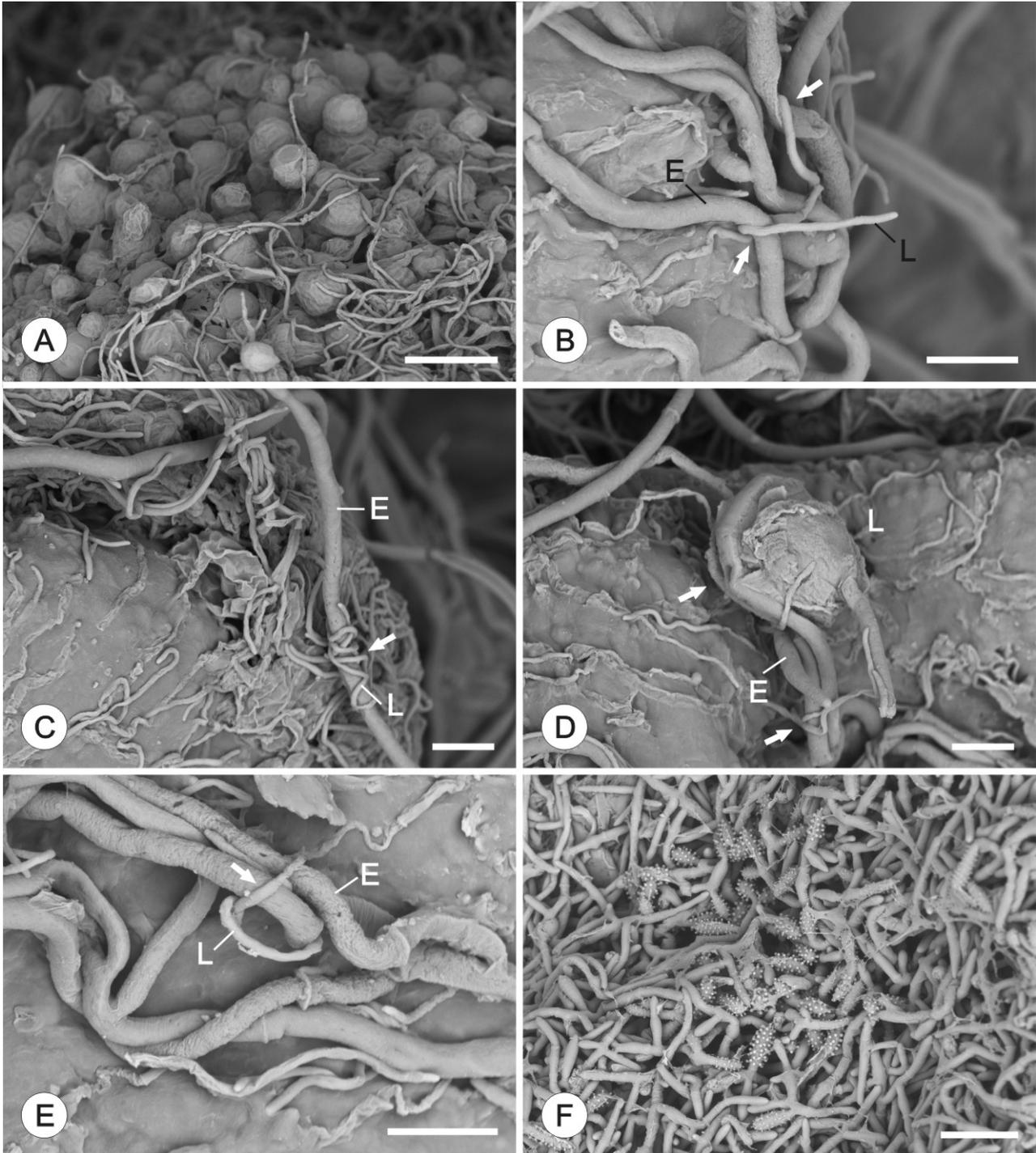
Na figura 13A é possível observar a presença de gongílios na cultura pura do fungo mutualista, a qual foi utilizada como base para a distinção entre as hifas dos fungos filamentosos e de *L. gongylophorus*. Para todas as linhagens de *Escovopsis* sp. avaliadas, foi observado que o parasita mantém contato físico com as hifas do fungo mutualista nas primeiras 24 horas (Figura 13B). Entretanto, nenhuma estrutura especializada (por exemplo, apressório) ou o “enrolamento” das hifas do parasita nas hifas do hospedeiro foi observada (Figura 13C-E). É importante salientar que, durante esse contato, não foi observado qualquer degeneração das hifas do hospedeiro. Após 24 horas de crescimento, o disco de micélio do fungo mutualista apresentou crescimento expressivo de *Escovopsis* sp., com a presença de esporulação do parasita (Figura 13F). Nesse ponto, as hifas do hospedeiro já não podiam ser observadas nas preparações.

Outra característica importante observada nas preparações é o tamanho das hifas do fungo mutualista, quando comparada às hifas do parasita. As hifas de *Escovopsis* sp. apresentam em média, $5,38 \pm 0,43$ μm de diâmetro, e as hifas do fungo mutualista $1,81 \pm 0,15$ μm de diâmetro. Nas imagens 13B-E é possível visualizar o contato físico das hifas de *L. gongylophorus* com as hifas de *Escovopsis* sp., este evento foi observado em várias preparações. Por exemplo, na figura 13D, nota-se a hifa de *Escovopsis* sp. em contato físico com um gongílio e nas figuras 13C e 13E, é possível observar o enrolamento da hifa de *L. gongylophorus* na hifa do *Escovopsis* sp.

Em relação às diferenças entre as hifas de *Escovopsioides* sp. e o fungo mutualista, *Escovopsioides* sp. apresentou hifas com $3,24 \pm 0,25$ μm de diâmetro, em média. Enquanto que as hifas do fungo *L. gongylophorus* mediam aproximadamente $1,81 \pm 0,15$ μm de diâmetro (Figura 14).

Na figura 14A é possível observar o micélio de *Escovopsioides* sp. RS046 com aproximadamente 12 dias de incubação. Nesta imagem é possível visualizar a presença de clamidósporos e conidiogênese blástica dos esporos. Nenhuma estrutura especializada entre as hifas de ambos os fungos (mutualista e *Escovopsioides* sp.) foi observada; apenas foi observado o crescimento micelial de *Escovopsioides* sp. sobre o fungo *L. gongylophorus*, sem causar-lhe danos aparentes (Figuras 14B-D).

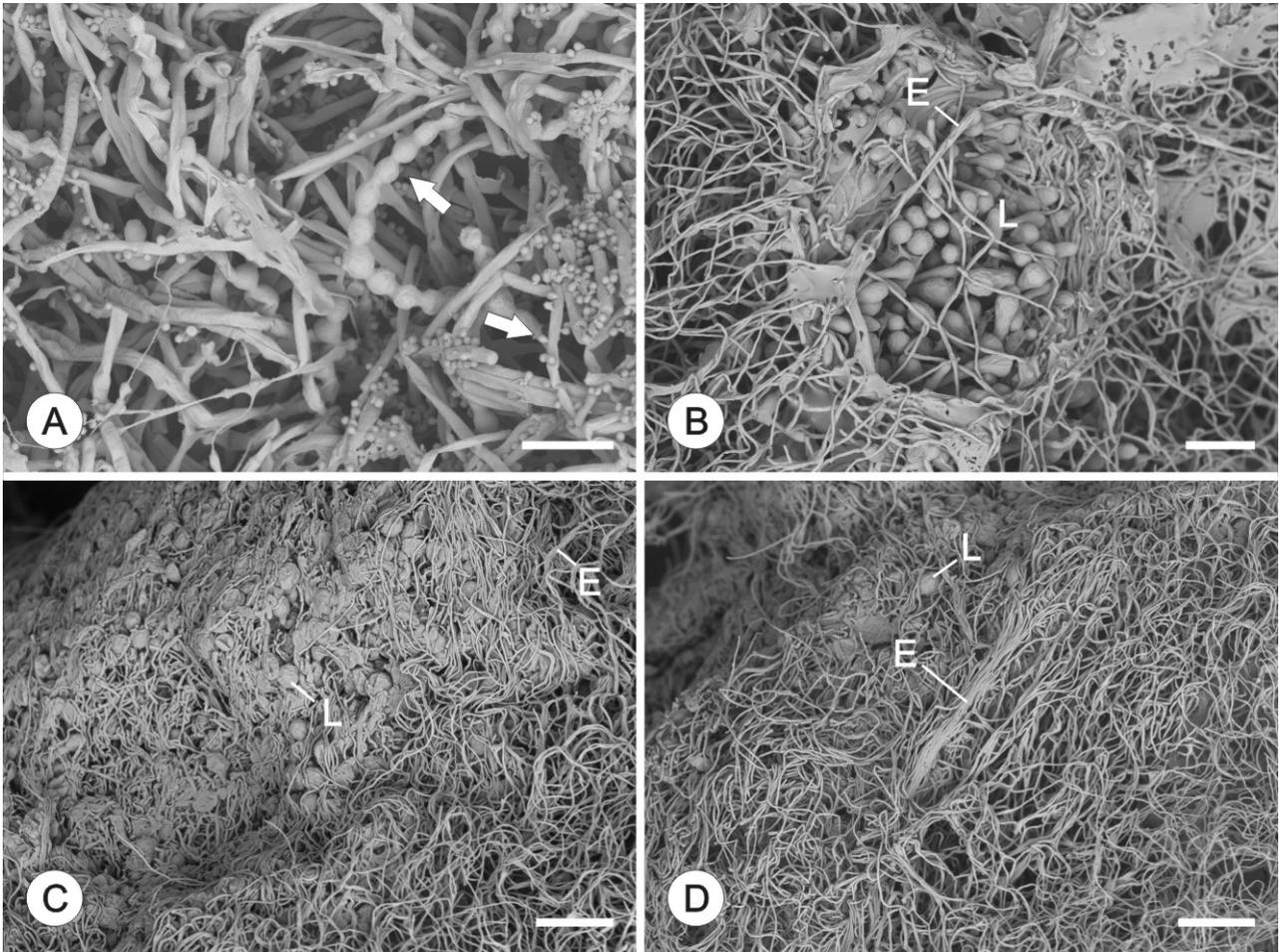
Figura 13. Micrografias eletrônicas de varredura dos ensaios de antagonismo realizados com *Escovopsis* sp. NL005 e RS055 frente à *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006. A. Gongilídios e hifas do fungo mutualista com 20 dias de crescimento (barra: 100 μ m). B. Contato físico da hifa do fungo mutualista com a hifa de *Escovopsis* sp. NL005, evidenciado pelas setas (barra: 50 μ m). C-E: enrolamento da hifa do fungo *L. gongylophorus* na hifa de *Escovopsis* sp. NL005 (barras: 100 – 50 μ m). D: contato físico da hifa de *Escovopsis* sp. NL005 sobre um gongilídio, contato físico da hifa de *L. gongylophorus* com a hifa do *Escovopsis* sp (barra: 100 μ m). F: Crescimento expressivo de *Escovopsis* sp. RS055 e formação de conidióforos, ausência do fungo mutualista (barra: 100 μ m).



L: *Leucoagaricus gongylophorus*; E: *Escovopsis* sp.

Imagens: B-E: Ensaios com um dia de incubação; F: ensaio com dois dias de incubação.

Figura 14. Micrografias eletrônicas dos ensaios de antagonismo realizados com *Escovopsioides* sp. RS046 frente à *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006. A. Controle da linhagem RS046 com doze dias de crescimento (barra: 100 μ m). Setas indicam presença de clamidósporos. B. Hifas da linhagem RS046 de *Escovopsioides* sp. sobre gongilídios (barra: 300 μ m). C-D. Hifas da linhagem RS046 de *Escovopsioides* sp. sobre gongilídios (barra: 500 μ m).



L: *Leucoagaricus gongylophorus*; E: *Escovopsioides* sp.
Imagens: B-E Ensaio com 4 dias de incubação.

6 DISCUSSÃO

O estudo realizado por Currie e colaboradores (1999a) demonstrou que jardins de *Atta colombica* sucumbiram 72 horas após infecção intencional com esporos de *Escovopsis* sp. Esse trabalho foi pioneiro, pois mostrou a patogenicidade de *Escovopsis* sp. frente ao fungo cultivado pelas formigas cortadeiras. A partir desse estudo, várias janelas de pesquisa foram abertas para entender a biologia desse parasita e visualizar um controle biológico das formigas cortadeiras. No entanto, uma questão permaneceu em aberto: seria *Escovopsis* sp. um parasita específico do jardim de fungo ou um mero competidor por nutrientes? Para responder essa pergunta, Reynolds e Currie (2004) utilizaram ensaios *in vitro* aliados à microscopia de luz, os quais levaram esses autores a classificarem *Escovopsis* sp. como um fungo micoparasita necrotrófico de contato (especializado) e não apenas um competidor por nutrientes. Contudo, o estudo desses autores não apresentou dados concretos sobre quais mecanismos estariam envolvidos no modo de ação do parasitismo. Por sua vez, fungos do gênero *Escovopsioides* sp. apresentam características similares às de *Escovopsis* sp. e são encontrados nos jardins de fungo das formigas cortadeiras e de outros gêneros da tribo Attini (André Rodrigues, comunicação pessoal). Ao contrário de *Escovopsis* sp., pouco se conhece a respeito da biologia desse fungo. Nesse contexto, o presente trabalho avaliou a natureza das interações entre fungos filamentosos encontrados nos jardins de formigas cortadeiras e o fungo cultivado por esses insetos. O potencial antifúngico de extratos do meio de cultivo de várias linhagens de *Escovopsis* sp. e *Escovopsioides* sp. foi analisado. Na tentativa de compreender se o antagonismo desses fungos envolve contato físico entre as hifas foram realizados ensaios *in vitro* aliados a estudos de microscopia eletrônica.

Os resultados obtidos nos ensaios de co-cultivo *in vitro* mostraram que tanto *Escovopsis* sp., quanto *Escovopsioides* sp. inibiram significativamente o crescimento micelial do fungo *L. gongylophorus*. Silva e colaboradores (2006) também realizaram ensaios de culturas pareadas com o fungo mutualista da mesma espécie de formiga utilizada no presente estudo. Os autores estudaram os efeitos de três linhagens de *Escovopsis weberi* e observaram que ambas inibiram o desenvolvimento do fungo *L. gongylophorus*. Assim como no trabalho de Silva et al. (2006), no presente estudo foram verificadas diferenças na agressividade de *Escovopsis* sp., refletidas pelas diferentes porcentagens de inibição entre os isolados, variando de 56% a 78%, e também nas alterações morfológicas (coloração do meio e degeneração do micélio do fungo mutualista). Nos ensaios realizados por Folgarait et al. (2011) também foram detectadas diferenças significativas na inibição do fungo mutualista dependendo da linhagem de *Escovopsis* sp. avaliada. Os autores atribuem os resultados observados ao fato das linhagens serem isoladas de diferentes espécies de

formigas. Esses resultados corroboram com as observações de Currie (2001) que demonstrou haver diferenças na agressividade em diferentes linhagens de *Escovopsis* sp.

As linhagens de *Escovopsioides* sp. também inibiram significativamente o fungo mutualista nos ensaios de co-cultivo e, assim como *Escovopsis* sp., foram observadas diferenças nas porcentagens de inibição (56% para RS054 e 45% para RS046). Como não existem estudos do potencial antagonista desse fungo, o presente trabalho é o primeiro a demonstrar o efeito desse fungo frente a *L. gongylophorus*. Trabalhos anteriores relataram a presença desse fungo nos jardins de formigas cortadeiras, porém o fungo foi identificado como *Moniliella-like* (RODRIGUES et al., 2005; 2008b). Os autores demonstraram que o jardim de fungo de ninhos de laboratório de *A. sexdens rubropilosa* pode ser recoberto pelo crescimento desse fungo, após tratamento do ninho com inseticidas (RODRIGUES et al., 2008b). Esse fenômeno é semelhante ao que ocorre com o parasita *Escovopsis* sp., indicando o provável papel desse fungo como antagonista do fungo das formigas.

Com os resultados obtidos na avaliação antifúngica dos diferentes extratos frente ao fungo mutualista foi possível observar que *Escovopsis* sp. e *Escovopsioides* sp. inibiram o crescimento de *L. gongylophorus*. Com exceção do EBP da linhagem *Escovopsis* sp. RS030, todos os extratos brutos na ausência (EBA) e na presença (EBP) inibiram significativamente o crescimento de *L. gongylophorus*. Esses resultados indicam a produção de compostos químicos tóxicos por parte de *Escovopsis* sp. e *Escovopsioides* sp. comprovando a ação química de *Escovopsis* sp. proposta por Currie et al. (1999a) e Reynolds e Currie (2004), além de demonstrar a ação química de *Escovopsioides* sp. Algumas das frações acetato e butanol, dependendo da linhagem de *Escovopsis* sp. e *Escovopsioides* sp., não inibiram significativamente o crescimento do fungo mutualista (Tabelas 4 e 5), sugerindo que (i) o princípio ativo não foi extraído durante o processo, (ii) o princípio foi degradado durante a extração ou (iii) o princípio ativo não foi produzido por essas linhagens durante o período de incubação.

Pesquisas semelhantes avaliaram compostos inibitórios produzidos por fungos micoparasitas (INBAR; CHET, 1995; MENENDEZ; GODEAS, 1998; NICOLETTI et al., 2004; LOGUERCIO et al., 2009; FERRE; SANTAMARINA; 2010; DÍAZ et al., 2013; QUALHATO et al., 2013). Por exemplo, Díaz et al. (2013) analisaram a produção de metabólitos antifúngicos de várias espécies de *Trichoderma* frente ao fungo *Ophiostoma novo-ulmi*, causador da doença do olmo holandês (doença responsável pela murcha e morte de árvores do gênero *Ulmus* sp., no continente Europeu). Os filtrados dos meios de cultivo de *T. harzianum* e *T. atroviride* apresentaram um efeito tóxico significativo sobre o crescimento de todas as linhagens de *O. novo-ulmi*.

Qualhato e colaboradores (2013) avaliaram a interação de quatro espécies do gênero *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. tomentosum*, *T. asperellum* e *T. ghanense*) frente a três espécies de

fungos patógenos do feijão (*Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*) para possível aplicação no controle biológico. As espécies micoparasitas *T. harzianum* e *T. asperellum* apresentaram atividade antagonista eficiente contra as três linhagens de fitopatógenos, enquanto que *T. ghanense* mostrou antagonismo contra *F. solani* e antagonismo moderado contra *S. sclerotiorum* e *R. solani*. Já *T. tomentosum* mostrou antagonismo eficiente contra *S. sclerotiorum* e *R. solani*. Os resultados demonstram que a atividade antagonista de *Trichoderma* sp. varia quando este é confrontado com diferentes patógenos. As espécies avaliadas por Qualhato et al. (2013) produziram compostos voláteis sendo os efeitos significativos no crescimento dos patógenos. Outra vertente abordada foi a produção de enzimas líticas de parede celular, sendo que as linhagens de *Trichoderma* secretaram glucanases, quitinases e proteases entre outras enzimas.

O gênero *Trichoderma* pertence à ordem *Hypocreales*, a qual é conhecida por reunir fungos parasitas de plantas, de insetos e de outros fungos; muitos deles produtores de uma variedade de metabólitos ativos. É sabido que fungos micoparasitas necrotróficos apresentam uma ampla gama de hospedeiros e utilizam de enzimas líticas para degradar as hifas do fungo alvo. Assim, como os gêneros *Escovopsis* e *Escovopsioides* pertencem à ordem *Hypocreales*, é possível supor que utilizem enzimas que atuem na inibição do fungo mutualista. De fato, Inglis e Kawchuk (2001) estudando a ação de enzimas líticas de diversos micoparasitas frente ao patógeno *R. solani*, observaram que uma linhagem de *Escovopsis* sp. produz quitinases que possivelmente degradam a parede celular desse patógeno.

Nos ensaios de antagonismo em ágar água, nos quais o fungo mutualista foi utilizado como única fonte de nutrientes para os fungos filamentosos avaliados, *Escovopsis* sp. cresceu rapidamente em direção ao seu hospedeiro (após 24 horas), como também observado por Reynolds e Currie (2004). O fato de todas as linhagens de *Escovopsis* sp. não terem crescido nas placas controle, mas terem crescido em direção ao fungo mutualista é explicado devido a *Escovopsis* ser atraído por sinais químicos secretados pelo fungo mutualista, corroborando com a hipótese de especificidade desta interação (GERARDO et al., 2004; 2006). Em menos de 48 horas, *Escovopsis* sp. sobrepujou o crescimento do fungo mutualista, tanto nos ensaios de co-cultivo, quanto nos ensaios de antagonismo para microscopia de varredura. Por outro lado, *Escovopsioides* sp. cresceu no ágar água na ausência do hospedeiro e, na presença deste as hifas entraram em contato com a colônia de *L. gongylophorus* somente após três a sete dias (Figura 11B). Nesse sentido, é provável que *Escovopsioides* sp. não seja estimulado pelos metabólitos produzidos pelo fungo mutualista, os quais estimulam o crescimento de *Escovopsis* sp. (GERARDO et al., 2006). Contudo, experimentos adicionais são necessários para avaliar a especificidade da interação *L. gongylophorus*-*Escovopsioides* sp.

Micoparasitas necrotróficos não apresentam estruturas físicas especializadas para a infecção do hospedeiro, ao contrário do que geralmente observa-se para os parasitas biotróficos, os quais apresentam apressórios e haustórios (JEFFRIES, 1995). Nos experimentos realizados no presente estudo, foi observado contato entre as hifas de *Escovopsis* sp. e as hifas do fungo mutualista (Figura 13), porém, não foram observadas estruturas especializadas de adesão durante a interação. Nesse sentido, *Escovopsis* sp. pode ser considerado um micoparasita necrotrófico de contato que ocasiona a morte do fungo mutualista, conforme observado a degeneração do micélio nos ensaios de co-cultivo (Figura 2).

Reynolds e Currie (2004) sugerem que *Escovopsis* sp. é capaz de degradar a hifa do fungo mutualista sem antes haver contato entre os organismos (especificamente à uma distância de 25 µm, conforme consta na página 957 de REYNOLDS; CURRIE, 2004). As suposições realizadas por esses autores foram baseadas em estudos realizados com microscopia de campo claro. Entretanto, utilizando microscopia de varredura é evidente o contato físico entre *Escovopsis* sp. e o fungo mutualista (Figura 13); porém, não foram encontradas evidências de degeneração da hifa do fungo mutualista mesmo após 1 dia em contato com o parasita (Figura 13). Essa observação sugere que os mecanismos químicos e físicos devem atuar em conjunto para ocasionar a morte de *L. gongylophorus*. De fato, quando o fungo é cultivado na presença dos extratos de *Escovopsis* sp., verificou-se somente inibição do crescimento (Tabela 3), porém, quando existe o contato físico entre os dois fungos é possível observar a degeneração do micélio (ver experimento de co-cultivo, Figura 4).

Nesse contexto, a exemplo de muitos parasitas necrotróficos (BARNETT; BINDER, 1973; JEFFRIES, 1995; ORTIZ; ORDUZ, 2000), o contato de *Escovopsis* sp. com o hospedeiro deve estimular a produção de metabólitos bioativos durante a interação com o fungo mutualista. De fato, na análise de HPLC realizada com a fração acetato da linhagem *Escovopsis* sp. RS076, pode-se verificar a produção de um composto químico por parte de *Escovopsis* sp. A produção desse composto aumentou quando *Escovopsis* sp. RS076 foi inoculado em meio líquido juntamente com o fungo *L. gongylophorus*, evidenciando assim, uma resposta metabólica do parasita na presença do seu hospedeiro. Para afirmar se tal composto é o responsável pela inibição, ensaios utilizando essa substância pura devem ser realizados.

Com relação aos ensaios de antagonismo com as linhagens de *Escovopsioides* sp. não foram observadas estruturas especializadas de parasitismo, somente o contato físico entre as hifas de ambos os fungos (Figura 14). Entretanto, devido à dificuldade de se distinguir as hifas de ambos os fungos, não é possível afirmar que *Escovopsioides* sp. forme estruturas especializadas para parasitismo.

Interessante foi notar a interação da hifa do hospedeiro *L. gongylophorus* com a hifa do parasita *Escovopsis* (Figuras 13C-E). Aparentemente houve um enrolamento das hifas do fungo cultivado pelas formigas nas hifas de *Escovopsis* sp. Esse tipo de evento é comumente observado no ataque do parasita ao seu hospedeiro, e não o contrário (BARNETT, 1964; STEYAERT; RIDGWAY; ELAD, 2003). Embora os resultados do nosso trabalho sejam contrários aos resultados encontrados na literatura para a maioria dos fungos micoparasitas, talvez a interação observada seja um mecanismo do fungo mutualista para evitar a ação de *Escovopsis* sp. Por exemplo, Butler (1957) estudou o parasitismo de *R. solani* frente a diversos fungos e observou que o hospedeiro *Rhizopus nigricans* apresentou dois tipos de resistência ao parasita: (i) a lise da hifa do parasita e (ii) a oclusão da hifa invasora. É sabido que hospedeiros na tentativa de controlar infecções podem apresentar diferentes respostas como a produção de compostos antimicrobianos, ativação da resposta imune e a remoção física do parasita (CLAYTON et al., 2003). Além disso, soma-se aos mecanismos de defesa do fungo mutualista o relato de Hervey e colaboradores (1977), os quais demonstraram que o fungo das formigas é capaz de secretar compostos que inibem o crescimento de certos fungos filamentosos. Apesar desses autores considerarem que o fungo das formigas secrete substâncias bioativas, também é provável que outras formas de interação possam ocorrer. Nesse contexto, avaliar a interação de outras linhagens de *Escovopsis* sp. e de outros fungos não associados aos jardins das formigas, frente ao fungo mutualista, poderá auxiliar na compreensão se *L. gongylophorus* apresenta mecanismos de resistência frente à patógenos.

Ortiz e Odus (2000) estudaram a interação antagonista (química e física) de dois fungos da ordem *Hypocreales* (*Trichoderma* sp. e *Gliocladium* sp.) frente ao fungo mutualista de *Atta cephalotes*, visando o controle biológico dessa espécie de formiga cortadeira. Ensaios *in vitro* demonstraram que ambas as linhagens inibiram o fungo mutualista. Os autores sugerem que o efeito inibitório pode ser atribuído a enzimas extracelulares ou a metabólitos voláteis ou não voláteis. Na análise da interação física, não foi observada a penetração das hifas de *Trichoderma* sp. e *Gliocladium* sp. nas hifas do fungo mutualista. Com base nessas evidências, os autores caracterizaram esses isolados como micoparasitas necrotróficos. Levando em consideração os dados obtidos no presente estudo, pode-se sugerir que *Escovopsis* sp. é um parasita necrotrófico de contato, pois provavelmente inibi o crescimento do hospedeiro através da produção de compostos químicos (toxinas e/ou enzimas), aliado ao o contato com as hifas do hospedeiro.

Escovopsis sp. é considerado um fungo parasita especializado dos jardins de fungo das formigas da tribo Attini (CURRIE et al., 1999a; BOT et al., 2001). Estudos apontam que *Escovopsis* sp. compartilha uma antiga história evolutiva com as formigas e o fungo mutualista, provavelmente datando de 50 milhões de anos (CURRIE et al., 2003). Durante a evolução dessa interação, do ponto de vista do parasita, não é interessante que este mate seu hospedeiro. De fato, na

natureza, são poucos os registros de ninhos mortos devido à ação de *Escovopsis* sp. (CURRIE et al., 1999a; RODRIGUES, 2004). Portanto, se esse parasita aparentemente não ocasiona danos severos em ninhos em condições naturais, então, por que *Escovopsis* sp. apresenta um modo de parasitismo agressivo? Provavelmente, o modo de vida necrotrófico de *Escovopsis* sp. foi herdado do ancestral comum entre *Escovopsis* sp. e os demais fungos da ordem *Hypocreales*. Esse modo de vida, portanto, foi mantido durante a evolução devido ao comportamento das formigas utilizarem diversas estratégias de profilaxia para proteger o fungo mutualista de organismos invasores. Por exemplo, partes do jardim de fungo infectadas com *Escovopsis* sp. são rapidamente eliminadas pelas operárias (CURRIE; STUART, 2001), o que torna necessário para *Escovopsis* sp. um rápido crescimento e esporulação para disseminar-se no ninho (CURRIE et al., 1999a). Nesse sentido, devido às barreiras impostas pelas formigas é provável que esse modo de vida necrotrófico de *Escovopsis* sp. seja mantido durante a evolução. Soma-se ainda, o fato das operárias de formigas cortadeiras apresentarem em suas cutículas bactérias do gênero *Pseudonocardia* e outros actinomicetos que atuam na secreção de compostos antimicrobianos que inibem o parasita (CURRIE et al., 1999a; SEN et al., 2009).

Levando em consideração os resultados obtidos para as duas linhagens de *Escovopsioides* sp., foi possível notar que esse fungo apresenta antagonismo frente a *L. gongylophorus*, detectado nos ensaios de co-cultivo e nos testes de cultivo na presença dos extratos brutos. Contudo, as interações observadas sugerem que *Escovopsioides* sp. não seja um antagonista agressivo, quando comparado à *Escovopsis* sp. Contudo, ensaios *in vivo* utilizando colônias mantidas em laboratório são essenciais para determinar se *Escovopsioides* sp. ocasiona o mesmo impacto negativo nas colônias desses insetos.

7 CONCLUSÕES

- Ao contrário de outros trabalhos da literatura, a natureza do parasitismo de *Escovopsis* sp. frente a *L. gongylophorus* envolve a produção de compostos com ação antifúngica, com um aparente contato físico entre as hifas desses organismos.
- *Escovopsioides* sp. é um fungo de natureza antagonista frente a *L. gongylophorus*, o qual possivelmente apresenta mecanismos de ação semelhantes aos de *Escovopsis* sp. Entretanto, os resultados do presente estudo sugerem que *Escovopsioides* sp. não é tão agressivo, quando comparado ao parasita especializado do fungo cultivado pelas formigas cortadeiras.

8 PERSPECTIVAS

Com os resultados obtidos no presente estudo, algumas perguntas foram respondidas; entretanto, novos questionamentos surgiram, abrindo novas janelas para pesquisas envolvendo as interações do fungo mutualista com fungos prejudiciais ao seu desenvolvimento.

Estudos adicionais devem ser realizados para averiguar a natureza química das moléculas envolvidas na inibição do fungo mutualista por *Escovopsis* sp e *Escovopsioides* sp. Por exemplo, seria interessante averiguar se a inibição química do crescimento do fungo mutualista está relacionada a enzimas líticas que atuam na parede celular de *L. gongylophorus* (por exemplo, quitinases e glucanases). Nesse contexto, estudos de metaproteômica também são interessantes no intuito de verificar quais são as proteínas expressas durante o cultivo de *Escovopsis* sp. na presença de *L. gongylophorus*.

Em relação ao fungo *Escovopsioides* sp., experimentos *in vivo* são necessários para confirmar se esse fungo também pode ser considerado um parasita do fungo cultivado pelas formigas (ou seja, verificar se este ocasiona impactos significativos no desenvolvimento da colônia). Estudos seguintes, também poderão avaliar as relações evolutivas de *Escovopsioides* sp. para entender se este fungo também compartilha uma história de co-evolução com as formigas e com o fungo mutualista. Nesse sentido, coletas adicionais devem ser realizadas focando em gêneros de formigas que representem os cinco tipos de fungicultura da tribo Attini.

REFERÊNCIAS

- AUGUSTIN, J.O.; GROENEWALD, J. Z.; NASCIMENTO, R. J.; MIZUBUTI, E. S. G.; BARRETO, R. W.; ELLIOT, S. L.; EVANS, H. C. Yet more “weeds” in the garden: fungal novelties from nests of leaf-cutting ants. **PLoS One**, São Francisco, v. 8, n. 12, p. 1-17, 2013.
- BACCI JR., M.; RIBEIRO, S. B.; CASAROTTO, M. E. F.; PAGNOCCA, F. C. Biopolymer-degrading bacteria from nest of leaf-cutting ant *Atta sexdens rufopilosa*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 28, n. 1, p. 79-82, 1995.
- BARNETT, H. L. The nature of mycoparasitism by fungi, **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 17, p. 1-14, 1963.
- BARNETT, H. L. Mycoparasitism. **Mycologia**, Lawrence, v. 56, p. 1-19, 1964.
- BARNETT, H. L.; BINDER, F. L. The fungal host-parasite relationship. **Annu. Rev. Phytopathol.**, Palo Ato, v. 11, p. 273-292, 1973.
- BERTO, P.; HAISSAM, J. I. J; AKLI, M. LEPROIV, P. Possible role of colonization and cell wall degrading enzymes in the differential ability of three *Ulocladium atrum* strain to control *Botrytis cinerea* on necrotic strawberry leaves. **Phytopatology**, St. Paul, v. 91, p. 1030-1036, 2001.
- BOT, A. N. M.; REHNER, S. A.; BOOMSMA, J. J. Partial incompatibility between ants and symbiotic fungi in two sympatric species of *Acromyrmex* leaf-cutting. **Evolution**, Hoboken, v. 55, n. 10, p. 1980-1991, 2001.
- BRANDÃO, C. R. F.; MAYHÉ-NUNES, A. J.; SANHUDO, C. E. D. Taxonomia e filogenia das formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (org) **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Editora UFV, 2011, p.27-48.
- BUTLER, E. E. *Rhizoctonia solani* as a parasite of fungi. **Mycologia**, Lawrence, v. 49, p. 354-373, 1957
- CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; BACCI JR., M.; HEBLING, M. J. A.; DA SILVA, O. A. Yeast associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rufopilosa* Forel, 1908. **Anton. Leeuw. Int. J. G.**, Dordrecht, v. 71, n. 3, p. 243-248, 1997.
- CARREIRO, S. C. **Pesquisa do fator killer e análise da degradação de polissacarídeos vegetais por leveduras associadas aos ninhos de *Atta sexdens***. 2000. 153 f. Tese (Doutorado em Ciências Bilógicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP: 2000.
- CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI JR., M.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; MIDDELHOVEN, W. J. Occurrence of killer yeast in leaf-cutting ant nests. **Folia Microbiol.**, Dordrecht, v. 47, v. 3, p. 259-262, 2002.
- CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 96, n. 7, p. 7998-8002, 1999a.
- CURRIE, C. R.; JAMES, A. SCOTT.; SUMMERBELL, R. C.; MALLOCH, D. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, Londres, v. 398, p. 701-704, 1999b.

- CURRIE, C. R. A community of ants, fungi, and bacteria: a multilateral approach to studying symbiosis. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 55, [s.n.], p. 357-80, 2001.
- CURRIE, C. R.; STUART, A. E. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. **Proc. R. Soc. Lond. B.**, London, v. 268, n. 1471, p. 1033-1039, 2001.
- CURRIE, C. R.; WONG, B.; STUART, A. E.; SCHULTZ, T. R.; REHNER, S. A.; MULLER, 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.
- DELLA LUCIA, T. M. C.; SOUZA, D. J. Importância e história de vida das formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (org) **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Editora UFV, 2011, p.27-48.
- DÍAZ, G.; CÓRCOLES, A. I.; ASECIO, A. D.; TORRES, M. P. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* and naturally occurring fungi from elms against *Ophiostoma novo-ulmi*. **For. Path.**, Hoboken, v. 43, p. 51-58, 2013.
- DINIZ, E. A.; BUENO, O. C. Evolution of substrate preparation behaviors for cultivation of symbiotic fungus in Attine ants (Hymenoptera: Formicidae). **J. Insect Behav.**, New York, v. 23, n. 3, p. 205-214, 2010.
- DRUZHININA, I. S.; SEIDL-SEIBOTH, V.; HERRERA-ESTRELLA, A.; HORWITZ, B. A.; KENERLEY, C. M.; MONTE, E.; MUKHERJEE, P. K.; ZEILINGER, S.; GRIGORIEV, I. V.; KUBICEK, C. P. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature**, London, v. 9, p. 749-758, 2011.
- FERNÁNDEZ-MARÍN, H.; ZIMMERMAN, J. K.; REHNER, S. A.; WCISLO, W. T. Active use of the metapleural glands by ants in controlling fungal infection. **Proc. R. Soc. Lond. B.**, London, v. 273, n. 1594, p. 1689-1695, 2006.
- FERRE, F. S.; SANTAMARINA, M. P. Efficacy of *Trichoderma harzianum* in suppression of *Fusarium culmorum*. **Ann. Microbiol.**, New York, v. 60, p. 335–340, 2010.
- GERARDO, N. M.; MUELLER, U.; PRICE, S. L.; CURRIE, C. R. Exploiting a mutualism: parasite specialization on cultivars within the fungus-growing ant symbiosis. **Proc. R. Soc. Lond. B.**, London, v. 1550, n. 271, 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 Biol.**, São Francisco, v. 4, p. e235, 2006.
- GOH, Y. K.; VUJANOVIC, V. *Sphaerodes quadrangularis* biotrophic mycoparasitism on *Fusarium avenaceum*. **Mycologia**, Lawrence v. 102, n. 4, p. 757–762, 2010.
- GRUBER, S.; KUBICEK, C. P.; SEIDL-SEIBOTH, V. Differential regulation of orthologous chitinase genes in mycoparasitic *Trichoderma* species. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 77, n. 20, p. 7217-7226, 2011.
- HART, A. G. Does disease threat cause colony emigrations in the leafcutting ant (Guerin)? **Entomologist's, Mon Mag**, v, 128, p. 41–42, 2002.

- HERVEY, A. et al. Studies on fungi cultivated by ants. **Brittonia**, Nova York, v. 29, p. 606-619, 1977.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The Ants**. Cambridge: Harvard University Press, 1990. 737p
- INBAR, J.; CHET, I. The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. **Microbiology** +, Nova York, v. 141, p. 2823-2829, 1995.
- INGLIS, G. D.; KAWCHUK, L. M. Comparative degradation of oomycete, ascomycete, and basidiomycete cell walls by mycoparasitic and biocontrol fungi. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 48, p. 60-70, 2002.
- JACOBS, K.; HOLTZMAN, K.; SEIFERT, K. A. Morphology, phylogeny and biology of *Gliocephalis hyalina*, a biotrophic contact mycoparasite of *Fusarium* species. **Mycologia**, Lawrence, v. 97, n. 1, p. 111-120, 2005.
- JEFFRIES, P. Biology and ecology of mycoparasitism. **Can. J. Bot.**, Ottawa, v. 73, n.1, p.S1284-s1290, 1995.
- KUBICEK, C. P. et al. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. **Genome Biol.**, Londres, v. 12, p. 1-15, 2011.
- KLINGENBERG, C.; BRANDÃO, R. F. Revision of the fungus-growing ant genera *Mycetophylax* Emery and *Paramycetophylax* Kusnezov rev. stat., and description of *Kalathomyrmex* n. gen. (Formicidae: Myrmicinae: Attini). **Zootaxa**, Auckland, v. 2052, p. 1- 31, 2009.
- LITTLE, A. E. F.; MURAKAMI, T.; MUELLER, U. G.; CURRIE, C. R. Defending against parasites: fungus-growing ants combine specialized behaviours and microbial symbionts to protect their fungus gardens, **Biol. Lett.**, London, v. 2, n.5, p. 12-16, 2006.
- LOGUERCIO, L. L.; CARVALHO, A. C.; NIELLA, G. R.; DE SOUZA, J. T.; POMELLA, A. W. V. Selection of *Trichoderma stromaticum* isolates for eficiente biological control of witches' broom disease in cacao. **Biol. Control**, San Diego, v. 51, p. 130-139, 2009.
- MARCELLO, C. M.; STEINDORFF, A. S.; SILVA, S. P.; SILVA, R. N.; BATAUS, L. A. M.; ULHOA, C. J. Expression analysis of the exo- β -1,3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. **Microbiol. Res.**, Jena, v. 165, p. 75-81, 2010.
- MARICONI, F. A. M. **As saúvas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1970. 167 p.
- MARSARO-JÚNIOR, A. L.; DELLA LUCIA, T. M. C.; BARBOSA, L. C. A.; MAFFIA, L. A.; MORANDI, M. A. B. Efeito de secreções da glândula mandibular de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) sobre a germinação de conídios de *Botrytis cinerea* Pers. Fr. **Neotrop. Entomol.**, Piracicaba, v. 30, n. 3, p. 403-406, 2001.
- MEHDIABADI, N. J.; SCHULTZ, T. R. Natural history and phylogeny of fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini). **Myrmecol. News**, Vienna, v.13, p. 37-55, 2010.
- MELLO, S. C. M.; ESTEVANATO, C. E.; BRAÚNA, L. M.; CAPDEVILLE, G.; QUEIROZ, P.R.; LIMA, L. H. C. Antagonistic process of *Dicyma pulvinata* against *Fusicladium macrosporum* on rubber tree. **Trop. Plant Pathol.**, Brasília, v. 33, n. 1, p. 005-008, 2008.

- MENDES, T. D. **Atividade antimicrobiana de actinobactérias isoladas de formigas Attini (Hymenoptera: Formicidae)**. 2010. 92f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.
- MENENDEZ; A. B.; GODEAS, A. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* attacking soybean plants. Degradation of the cell walls of this pathogen by *Trichoderma harzianum* (BAFC 742). **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 142, p. 153–160, 1998.
- MÖLLER, A. Die Pilzgärten einiger südamerikanischer Ameisen. **Botanische Mitteilungen aus den Tropen**, Jena, v.6, p. 1–127, 1893.
- MUCHOVEJ, J. J.; DELLA LUCIA, T. M. C. E. *Escovopsis*, a new genus from leaf-cutting ant nests to replace *Phialocladus* nomem invalidum. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 37, n. 1, p. 191-195, 1990.
- MUELLER, U. G.; SCOTT, J. J.; ISHAK, H. D.; COOPER, M.; RODRIGUES, A. Monoculture of leafcutter ant gardens. **PLoS One**, San Francisco, v. 5, n. 9, p. e12668, 2010.
- MUELLER, U. G. Ant versus fungus versus mutualism: ant-cultivar conflict and the deconstruction of the attine ant-fungus symbiosis. **The American Naturalist**, Chicago, v. 160, p. S67-S98, 2002.
- MUELLER, U. G.; REHNER, S. A.; SCHULTZ, T. R. The evolution of agriculture ants. **Science**, Washington, v. 281, n. 5385, p. 2034-2038, 1988.
- NICOLETTI, R.; DE STEFANO, M.; DE STEFANO, S.; TRINCONE, A.; MARZIANO, F. Antagonism against *Rhizoctonia solani* and fungitoxic metabolite production by some *Penicillium* isolates. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 158, p. 465-474, 2004.
- ORTIZ, A.; ORDUZ, S. *In vitro* evaluation of *Trichoderma* and *Gliocladium* antagonism against the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 150, p. 53–60, 2000.
- PAGNOCCA, F. C.; MASIULIONIS, V. E.; RODRIGUES, A. Specialized fungal parasites and opportunistic fungi in gardens of attine ants. **Psyche**, New York, v. 12, p. 1-9, 2012.
- PAGNOCCA, F. C.; RODRIGUES, A.; BACCI JR., M. Micro-organismos associados às formigas cortadeiras. . In: DELLA LUCIA, T. M. C. (org) **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Editora UFV, 2011, p. 262-283.
- PAGNOCCA, F. C.; CARREIRO, S. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; SANTANNA, A.; CAPELARI, M. RAPD analysis of the sexual state and sterile mycelium of the fungus cultivated by the leaf-cutting ant *Acromyrmex hispidus fallax*. **Mycol. Res.**, Oxford, v. 105, n. 2, p. 173-176, 2001.
- PAGNOCCA, F. C. ; SILVA, O. A. ; BERALDO, M. J. A. H. ; BUENO, O. C. . Toxicity of sesame extracts to the leaf-cutting ants symbiotic fungus. **B. Entomol. Res.**, Cambridge, v. 80, p. 349-352, 1990
- 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, 2006. v. 2, p. 57-77.
- QUALHATO, T. F.; LOPES, F. A. C.; SEINDORFF, A. S.; BRANDÃO, R.S.; JESUÍNO, R. S. A.; ULHOA, C. J. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi:

evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. **Biotechnol. Lett.**, Dordrecht, v. 35, p. 1461–1468, 2013.

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

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.

RIBEIRO, S. M. B. **Caracterização de espécies bacterianas encontradas em ninhos de *Atta sexdens* L. e isolamento de *Streptomyces* de formigas da Tribo Attini.** 2000. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 2000.

RODRIGUES, A. **Ocorrência de fungos filamentosos em ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) submetidos a tratamentos com iscas tóxicas.** 2004. 84 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2004.

RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI JR., M.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PENNING, L. H. Variability of non-mutualistic fungi associated with *Atta sexdens rubropilosa* nests. **Folia Microbiol.**, Dordrecht, 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. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 39, n.1, p. 64-67, 2008a.

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

RODRIGUES, A.; CABLE, R. N.; MUELLER, U. G.; BACCI JR., M.; PAGNOCCA, F. C. Antagonistic interactions between garden yeast and microfungi garden pathogens of leaf-cutting ants. **Anton. Leeuw. Int. J. G.**, Dordrecht, v. 96, n.3, p. 331-342, 2009.

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

SANTOS, A. V.; DILLON, R. J.; DILLON, V. M.; REYNOLDS, S. E.; SAMUELS, R. J. Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **FEMS Microbiol. Lett.**, Hoboken, v. 239, n. 2, p. 319-323, 2004.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH image to imageJ: 25 years of image analysis. **Nat. Methods**, Londres, v. 9, p. 671-675, 2012.

SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **P. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 105, n. 14, p. 5435-5440, 2008.

SEN, R.; ISHAK, H. D.; ESTRADA, D.; DOWD, S. E.; HONG, E.; MUELLER, U. G. Generalized antifungal activity and 454- screening of *Pseudonocardia* and *Amycolatopsis* bacteria in nests of fungus-growing ants. **P. Natl. Acad. Sci. USA.**, Washington, v.106, p.17805–17810, 2009.

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, p. 115-119, 2006.

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

SILVA, A.; BACCI JR., M.; SIQUEIRA, C. G.; BUENO, O. C; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. **J. Insect Physiol.**, Kidlington, v. 49, p. 307–313, 2003.

SILVA-PINHATI, A. C. O.; BACCI JR., 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). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 37, p. 1463-1472, 2004.

SOLOMON, S. E.; BACCI JR., M.; MARTINS Jr., J.; VINHA, G. G.; 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. 3, n. 7, 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**, São Francisco, v. 8, n. 11, p. 1-20, 2013.

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

STEYAERT, J. M.; RIDGWAY, H. J.; STEWART, A. Genetic basis of mycoparasitism: A mechanism of biological control by species of *Trichoderma*. **New Zeal. J. Crop. Hort.**, Oxon, v. 31, p. 281-291, 2003.

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.; LI, L.; OSTERBERGER, J.; HARKINS, T. T.; SLATER, S. C.; DONOHUE, T. J.; CURRIE, C. R. An insect herbivore microbiome with high plant biomass-degrading capacity. **PloS Genet.**, São Francisco, v. 7, n. 2, 2010.

TAERUM, S. J.; CAFARO, M. J. LITTLE, A. E. F.; SCHULTZ, T. R.; CURRIE, C. R. Low host-pathogen specificity in the leaf-cutting ant-microbe symbiosis. **Proc. R. Soc. Lond. B.**, London, v. 274, p. 1971-1978, 2007.

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. **Proc. R. Soc. Lond. B.**, London, v. 276, p. 2419–2426, 2009.

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

APÊNDICE

Tabela A1. Estatísticas obtidas do teste ANOVA (2 critérios) para os experimentos de crescimento micelial do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* a partir dos ensaios de co-cultivo frente a diferentes linhagens de fungos filamentosos.

Linhagens	F	P
ES002	192,562	<0,01
ES004	104,590	<0,01
ES005	61,82	<0,01
NL001	157,370	<0,01
NL005	198,84	<0,01
RS019	184,122	<0,01
RS020	92,238	<0,01
RS030	228,094	<0,01
RS046	44,48	<0,01
RS054	45,41	<0,01
RS055	86,962	<0,01
RS076	108,55	<0,01

¹ Para cada linhagem, os valores de F e P correspondem ao teste de ANOVA considerando os ensaios de co-cultivo.

Tabela A2. Estatísticas obtidas do teste ANOVA (2 critérios) para os experimentos de crescimento micelial de *Leucoagaricus gongylophorus* frente aos extratos brutos de linhagens *Escovopsis* sp. e *Escovopsioides* sp. cultivados na ausência (EBA) e na presença (EBP) do fungo mutualista.

Linhagens	EBA ¹		EBP	
	F	P	F	P
ES002	16,80	0,000143	20,43	<0,01
ES004	30,54	<0,01	75,86	<0,01
ES005	12,44	0,000876	34,85	<0,01
NL001	17,75	<0,01	50,22	<0,01
NL005	18,66	<0,01	25,88	<0,01
RS019	37,62	<0,01	34,64	<0,01
RS020	13,58	0,000538	21,53	<0,01
RS030	7,537	0,00824	3,079	0,0851
RS046	31,63	<0,01	11,33	0,001
RS054	16,46	0,000164	12,93	0,000711
RS055	14,25	0,000407	39,16	<0,01
RS076	30,70	<0,01	14,74	0,00342

¹ Para cada linhagem, os valores de F e P correspondem ao teste de ANOVA considerando os tratamentos teste e controle do meio.

Tabela A3. Estatísticas obtidas do teste ANOVA (2 critérios) para os experimentos de crescimento micelial do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* a partir da comparação dos extratos brutos na ausência (EBA) com os extratos brutos na presença (EBP) do fungo mutualista das linhagens *Escovopsis* sp. e *Escovopsioides* sp.

EBA x EBP ¹	F	P
ES002	0,274	0,60278
ES004	0,209	0,65
ES005	24,41	>0,01
NL001	0,446	0,507
NL005	17,54	0,000107
RS019	1,892	0,175
RS020	0,211	0,647
RS030	4,406	0,0406
RS046	3,079	0,0851
RS054	2,208	0,143
RS055	21,82	>0,01
RS076	4,116	0,0475

¹ Para cada linhagem, os valores de F e P correspondem ao teste de ANOVA considerando os tratamentos: EBA e EBP.

Tabela A 4. Estatísticas obtidas do teste ANOVA (2 critérios) para os experimentos de crescimento micelial de *Leucoagaricus gongylophorus* frente as frações acetato e butanol de extratos de cultivo de linhagens de *Escovopsis* sp. e *Escovopsioides* sp.

Teste	Fração Acetato ¹		Fração Butanol	
	F	P	F	P
ES002	5,238	0,00728	1,444	0,245
ES004	28,91	<0,01	0,271	0,605
ES005	2,496	0,0888	1,556	0,219
NL001	2,154	0,123	0,495	0,501
NL005	3,079	0,0525	11,32	<0,01
RS019	4,394	0,0169	9,492	<0,01
RS020	12,69	<0,01	12,85	<0,01
RS030	5,725	0,00547	20,84	<0,01
RS046	0,675	0,415	7,347	0,00903
RS054	3,021	0,0554	7,758	0,00838
RS055	5,26	0,0258	0,285	0,596
RS076	8,118	<0,01	12,75	0,000861

¹ Para cada linhagem, os valores de F e P correspondem ao teste de ANOVA considerando os tratamentos: teste, controle do meio e controle do solvente (DMSO).