
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ISABELA CALEGARI MOIA

**NATUREZA DO ANTAGONISMO ENTRE
FUNGOS OPORTUNISTAS E O FUNGO
CULTIVADO PELAS FORMIGAS
CORTADEIRAS**

ISABELA CALEGARI MOIA

NATUREZA DO ANTAGONISMO ENTRE FUNGOS OPORTUNISTAS
E O FUNGO CULTIVADO PELAS FORMIGAS CORTADEIRAS

Orientador: ANDRÉ RODRIGUES

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

Rio Claro
2014

595.796 Moia, Isabela Calegari
M712n Natureza do antagonismo entre fungos oportunistas e o
fungo cultivado pelas formigas cortadeiras / Isabela Calegari
Moia. - Rio Claro, 2014
44 f. : il., figs., gráfs., tabs.

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

1. Formiga. 2. Ecologia microbiana. 3. Interação. 4.
Inibição. 5. Attini. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Força Maior que me trouxe até aqui e me protegeu em todos os momentos. Agradeço aos meus pais. Minha mãe Amélia, uma pessoa que amo e admiro muito, guerreira, atenciosa, que fez com que eu não desistisse, sempre preocupada com meu futuro e meu bem estar. Mãe, você é meu porto seguro e minha paz. Meu pai Wilson, brincalhão e afetuoso, que também amo e admiro, que me ensinou a ser independente, a ir em busca dos meus objetivos, a me apoiar nas minhas escolhas, a confiar em mim durante a minha luta e se preocupar com meu futuro. Aos meus irmãos, Edgar e Renan, meus companheiros e protetores, pelas risadas e momentos de descontração, tenho que concordar, sempre serei a “irmãzinha”. Aos meus avós, Elza, João (*in memorian*), Nena (*in memorian*) e Felipe pelos “mimos” e carinhos. Estes que partiram para o céu, como queria que estivessem vendo meus agradecimentos. E à toda minha família, minha base, sem a qual eu não vivo.

Ao CBI10, em especial, ao Perdigão, meu companheiro, obrigada pelas conversas e pelas risadas durante esses anos de graduação, pois não foi fácil nossa luta, pelas festas e pela ida ao teatro em São Paulo assistir o melhor espetáculo de todos. Re e Nath, pelo companheirismo, pelas festas, risadas, pelas horas e horas estudando e fazendo trabalho.

À Bio Logus Jr., sem a qual não seria o que sou até hoje, pela experiência que pude adquirir, pelo crescimento pessoal e profissional, por aprender a ver as coisas de outra forma, pelo incentivo à seguir meus sonhos, pelo trabalho em equipe, por me fazer enxergar que nos problemas podemos ver as oportunidades e, em especial, a Diretoria de RH, Chapinha, Renata, Dani, obrigada pelo companheirismo.

Ao meu namorado Danilo, meu amor, meu melhor amigo, meu companheiro, aquele que esteve ao meu lado nos momentos de desespero, que fez com que eu não desistisse, que me deu força, pela prontidão em ajudar no meu trabalho no laboratório, pela paciência, pelo carinho, por comemorar junto comigo as minhas vitórias e por me apoiar nas minhas escolhas.

À República Fervo (Helena, Laís, Gabi, Ana, Sheeva, Bruna, Pati, Dri), pelo companheirismo, pelas conversas, pela convivência durante esses quatro anos, pelas tardes comendo bolo que a Gabi sempre fazia, pelos finais de semana sagrados que assistimos filme, pelas risadas, pelas viagens e pela paciência.

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Rodrigues, que admiro muito pelo seu trabalho e dedicação, por estar sempre presente quando precisamos dele, por me dar a oportunidade de trabalhar em seu laboratório, por me orientar e por transmitir seu conhecimento.

Ao Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos, onde realizei meus experimentos, (Danilo, Sadala, Renata, Rafa, Jaque, Tássio, Quimi, Lucas) e todos os outros pela prontidão, por me ajudarem de alguma forma na realização do meu trabalho.

Ao Laboratório de Formigas Cortadeiras, coordenado pelo Prof. Dr. Odair Correa Bueno (CEIS/UNESP), por disponibilizar amostras dos jardins de fungo para a realização dos experimentos e ao Laboratório de Microbiologia no CEIS, pelos meses iniciais que trabalhei durante a minha iniciação científica.

Ao CNPq (INCT – Controle Biorracional de Insetos Pragas) pelo financiamento deste trabalho e pela bolsa de iniciação científica concedida.

E à todas as pessoas que ajudaram de alguma forma e estiveram sempre comigo. Muito obrigada!

*“Estamos todos conectados: uns aos outros,
biologicamente; à Terra, quimicamente; ao resto
do Universo, atomicamente.”*

(Neil deGrasse Tyson)

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a interação entre o fungo cultivado pelas formigas cortadeiras e microfungos provenientes de diversas origens. Um total de 15 isolados de microfungos foi utilizado em experimentos de co-cultivo *in vitro* frente ao fungo mutualista da formiga *Atta sexdens rubropilosa*. A partir das medições do crescimento radial do fungo cultivado pelas formigas na presença e ausência dos microfungos, foi possível avaliar os efeitos da interação. Do total de microfungos, 11 inibiram significativamente o crescimento do fungo mutualista (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$). Os microfungos *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma spirale* apresentaram as maiores porcentagens de inibição. Ao contrário do esperado, tais microfungos inibiram o fungo mutualista em maiores proporções, quando comparado ao parasita especializado *Escovopsis* sp. Por outro lado, o fungo mutualista das formigas não inibiu o crescimento de nenhum microfungo (Mann-Whitney, $P < 0,05$), mas estimulou o crescimento de *Sarocladium kiliense*, *Escovopsis* sp., *Fusarium equiseti*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Clonostachys* sp. e *T. harzianum*. Em um segundo experimento, no qual fragmentos de jardins de fungo desprovidos de operárias foram inoculados com esporos dos diferentes microfungos, este revelou que todos os isolados testados foram capazes de colonizar e esporular nos fragmentos de jardins em cinco dias. Finalmente, foram realizados testes de antagonismo com os filtrados de cultivo de todos os microfungos. Um total de 13 filtrados inibiu significativamente o fungo mutualista (ANOVA 1-fator, $P < 0,05$), demonstrando que este é suscetível aos compostos químicos produzidos pelos microfungos. Os resultados indicaram que microfungos encontrados tanto no solo próximo aos ninhos das formigas, quanto presentes também em outros ambientes são capazes de inibir o crescimento do fungo mutualista das formigas cortadeiras. Em especial, fungos do gênero *Trichoderma* constituem em um potencial agente para o desenvolvimento de métodos alternativos de controle desses insetos pragas.

PALAVRAS CHAVE: Tribo Attini. Antagonismo. *Leucoagaricus*, Microfungo. Interação

SUMÁRIO

Página

1 INTRODUÇÃO	7
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1 <i>Formigas da tribo Attini e o cultivo de fungos</i>	9
2.2 <i>Interações entre os microfungos e o fungo mutualista das formigas cortadeiras</i>	10
2.3 <i>Compostos bioativos produzidos por fungos.....</i>	12
3 OBJETIVOS	14
3.1 <i>Geral.....</i>	14
3.2 <i>Específicos.....</i>	14
4 MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 <i>Origem dos isolados de fungos e manutenção das culturas.....</i>	15
4.2 <i>Bioensaios.....</i>	17
4.2.1 <i>Co-cultivo in vitro.....</i>	17
4.2.2 <i>Cultivo direto no jardim de fungo</i>	18
4.2.3 <i>Ensaios utilizando filtrados de cultivo</i>	19
5 RESULTADOS	20
5.1 <i>Efeitos dos microfungos no crescimento do fungo mutualista</i>	20
5.2 <i>Efeitos do fungo mutualista no crescimento dos microfungos</i>	23
5.3 <i>Colonização dos microfungos nos fragmentos de jardim de fungo.....</i>	24
5.4 <i>Efeitos dos filtrados de cultivo no crescimento do fungo mutualista</i>	31
6 DISCUSSÃO	33
7 CONCLUSÕES.....	38
8 PERSPECTIVAS.....	39
REFERÊNCIAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

As formigas cortadeiras (gêneros *Atta* e *Acromyrmex*) mantêm um mutualismo com um fungo basidiomiceto denominado, *Leucoagaricus gongylophorus*. Esses insetos alimentam suas larvas com gongilídeos, estruturas semelhantes a vesículas, presentes nas extremidades das hifas do fungo. Este é cultivado pelas operárias no interior de câmaras subterrâneas, nas quais as formigas acumulam folhas e flores frescas utilizadas como substrato para o crescimento do fungo. Fragmentos desse substrato vegetal juntamente com o micélio do fungo mutualista constituem o “jardim de fungo”. Devido ao fato de promoverem o desfolhamento de cultivares, as formigas cortadeiras são consideradas pragas agrícolas e ocasionam prejuízos significativos na economia dos países da América Latina.

Além do fungo mutualista, outros micro-organismos podem ser encontrados nos jardins desses insetos, tais como bactérias, fungos filamentosos e leveduras (os dois últimos denominados de microfungos). Alguns microfungos podem ser considerados indesejáveis à cultura do fungo mutualista, pois são considerados antagonistas frente ao fungo cultivado pelas formigas. No entanto, poucos estudos exploraram o papel desses microfungos como agentes antagonistas de *L. gongylophorus*.

Nesse contexto, o presente projeto avaliou as interações de microfungos isolados de diferentes ambientes (ninhos de formigas cortadeiras, solo e folhas) e seu potencial de inibição frente ao fungo mutualista de *Atta sexdens rubropilosa* (espécie de formiga cortadeira amplamente distribuída no Brasil), com a finalidade de entender se este fungo é um bom competidor ou apresenta suscetibilidade frente aos microfungos, independente da origem destes.

Para avaliar as interações entre os fungos foram conduzidos três experimentos: (i) co-cultivo *in vitro* entre os microfungos e o fungo mutualista de *A. sexdens rubropilosa*, (ii) cultivo direto dos microfungos em fragmentos de jardins de fungo desprovidos de operárias e (iii) cultivo *in vitro* do fungo mutualista na presença de filtrados de cultivo dos microfungos. O último experimento foi realizado no sentido de entender se o antagonismo observado nos testes de co-cultivo apresentam uma natureza química.

Os resultados obtidos sugerem que os microfungos são antagonistas frente o fungo das formigas, mesmo aqueles que não são encontrados em ambientes associados aos ninhos desses insetos. Isso demonstra a suscetibilidade do fungo mutualista frente a microfungos considerados saprofíticos e indica que algumas linhagens de microfungos (especialmente

aquelas do gênero *Trichoderma*) podem ser, eventualmente, empregadas no controle biológico das formigas cortadeiras.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Formigas da tribo Attini e o cultivo de fungos

A tribo Attini (Hymenoptera: Formicidae) compreende formigas que apresentam a característica de cultivarem fungos como alimento. Considerada um grupo monofilético, a tribo Attini compreende 16 gêneros e aproximadamente 297 espécies (BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES; SANHUDO, 2011; SOSA-CALVO et al., 2013), distribuídas na região neotropical, desde o sudeste dos EUA até a América do Sul (MEHDIABADI; SCHULTZ, 2010). As formigas dessa tribo ocupam diferentes biomas, tais como a Floresta Amazônica até regiões extremas, como desertos (WEBER, 1972). Dentre as várias espécies de formigas Attini, destacam-se as formigas cortadeiras, insetos que utilizam folhas e flores frescas para o cultivo do fungo *L. gongylophorus* e sua utilização como alimento para suas larvas.

De acordo com análises moleculares, estima-se que a fungicultura na tribo Attini surgiu há 50 milhões de anos (SCHULTZ; BRADY, 2008). Segundo Mueller et al. (2001) duas hipóteses podem explicar a origem do cultivo de fungos por esses insetos: (i) as formigas se alimentavam de fungos que cresciam acidentalmente nos ninhos, e estas, posteriormente, desenvolveram a capacidade de cultivá-lo e transmiti-lo para as próximas gerações; ou (ii) os fungos utilizavam as formigas para dispersão, e estas, posteriormente, desenvolveram a capacidade de cultivá-lo, transmiti-lo, além de utilizá-los na alimentação.

A filogenia do fungo mutualista está associada com os sistemas agrícolas realizados pelas formigas, indicando uma co-evolução entre esses dois organismos (MEHDIABADI; SHULTZ, 2010). Segundo esses autores, apesar das diferenças nos sistemas agrícolas, as formigas da tribo Attini apresentam algumas características em comum. As rainhas armazenam na sua cavidade infrabucal um “pellet” do fungo mutualista e saem para acasalar. Após o acasalamento, as rainhas da tribo Attini estabelecem um local de nidificação, onde regurgitam o “pellet” e iniciam uma nova colônia.

Segundo Schultz e Brady (2008), os diferentes fungos basidiomicetos cultivados pelas formigas da tribo Attini, possibilitou ordená-la em cinco grupos, de acordo com o grau de evolução da fungicultura: (i) Attini basais, como *Cyphomyrmex*, *Mycocepurus* e *Myrmicocrypta*, que utilizam um substrato mais diversificado, como partes mortas de plantas e carcaças de outros insetos; (ii) composto por formigas do gênero *Apterostigma*, que cultivam um fungo pertencente a família Pterulaceae; (iii) composto por formigas do grupo *Cyphomyrmex rimosus*, que cultivam nódulos de leveduras, formando “jardins de leveduras”;

(iv) representado pelas Attini “derivadas” dos gêneros *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex*, que cultivam fungos que dependem exclusivamente dessas formigas, pois não apresentam vida livre, estabelecendo relações simbióticas benéficas, oferecendo às formigas o “gongilídeo” para sua alimentação; (v) representado pelas formigas mais derivadas da tribo, os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* cortam folhas e flores frescas para o cultivo do fungo mutualista. O micélio desse fungo e o substrato vegetal processado pelas operárias compõem o “jardim de fungo”, estrutura geralmente localizada em câmaras subterrâneas, construídas pelas formigas (RODRIGUES et al., 2011).

Poulsen e Boomsma (2005) demonstraram que formigas cortadeiras do mesmo gênero, porém de espécies diferentes, cultivam fungos que apresentam incompatibilidade micelial. Segundo os autores, quando os fungos mutualistas de *Acromyrmex echinator* e *Acromyrmex octospinosus* foram inoculados na mesma placa de Petri, observou-se incompatibilidade micelial, visualizada através de zonas de demarcação. Assim, os autores demonstraram que em cada ninho existe uma linhagem particular do fungo. A incompatibilidade vegetativa significa que os fungos não são da mesma linhagem, embora sejam da mesma espécie, portanto, apenas uma se estabelecerá no jardim. Além disso, Mueller et al. (2010) demonstraram através de sequenciamento genético de diversas regiões de microssatélites, que nas diversas câmaras subterrâneas que compõem um único ninho de *Atta texana*, estas são preenchidas pelo mesmo clone de fungo. Assim, em um único ninho desses insetos, pode ser encontrado apenas um único clone do fungo mutualista; fato que levou os pesquisadores a considerarem que as formigas cultivam o fungo em uma monocultura.

2.2 Interações entre os microfungos e o fungo mutualista das formigas cortadeiras

O fungo cultivado pelas formigas cortadeiras é conhecido como *L. gongylophorus* (Basidiomycota: Agaricales; SINGER, 1986; FISCHER et al., 1994). Tal fungo produz enzimas despolimerases (BACCI et al., 1995; SIQUEIRA et al., 1998; SILVA et al., 2006a,b) capazes de degradar os polissacarídeos do substrato vegetal presente no jardim de fungo. Outros micro-organismos auxiliam nessa hidrólise, eventualmente possibilitando o acesso do fungo mutualista aos nutrientes no interior das células vegetais (PAGNOCCA; RODRIGUES; BACCI, 2011).

É sabido que existe uma diversidade de outros micro-organismos presentes nos jardins de fungo das formigas cortadeiras (RODRIGUES et al., 2008, 2011), tais como leveduras e fungos filamentosos, para os quais ainda não se conhece o real papel na simbiose.

Rodrigues et al. (2011) coletaram jardins de fungo de três espécies de formigas no estado do Texas (EUA) e demonstraram que microfungos foram mais frequentemente encontrados em jardins de *Cyphomyrmex wheeleri*, do que em jardins de fungo de *Trachymyrmex septentrionalis* e *Atta texana*, confirmando que os jardins das Attini inferiores apresentam maior prevalência de microfungos, quando comparado com os jardins de fungo de Attini superiores, conforme também demonstrado por Currie et al. (1999). Isso pode estar associado ao fato de que as Attini inferiores utilizam uma maior variedade de substratos, além de um processo mais simples para prepará-lo, antes de incorporá-lo no jardim. Já as Attini superiores, apresentam um preparo de substrato mais elaborado, removendo micro-organismos contaminantes, antes de incorporá-lo ao jardim de fungo (RODRIGUES et al., 2011).

Foi descoberto que fungos do gênero *Escovopsis* são parasitas específicos do fungo mutualista e somente foram encontrados nos jardins de fungo das formigas Attini (CURRIE et al., 1999). *Escovopsis* sp. é responsável por inibir o crescimento do fungo mutualista, atuando como um fungo micoparasita de *L. gongylophorus*. Aparentemente, o parasita é capaz de detectar substâncias químicas secretadas por *L. gongylophorus* e provocar a morte da hifa do hospedeiro sem a necessidade de contato direto (REYNOLDS; CURRIE, 2004; FOLGARAIT et al., 2011).

Rodrigues et al. (2005a,b) estudando colônias de *A. sexdens rubropilosa* no campo e no laboratório, e as quais foram tratadas com inseticidas, identificaram os microfungos presentes nos jardins de fungo nessa situação. *Sarocladium kiliense* (= *Acremonium kiliense*), *Escovopsis weberi*, *Fusarium solani* e *Trichoderma harzianum* são algumas das espécies encontradas nos jardins de ambos os tipos de ninhos (RODRIGUES et al., 2005a,b). As espécies *Penicillium citrinum*, *Penicillium janthinellum*, *Penicillium* sp. subgen. *Furcatum*, *Piptocephalis* sp., *Trichothecium roseum*, *Arthrobotrys cladodes*, *Aspergillus flavus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cunninghamella elegans*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium verticillioides* e *Syncephalastrum racemosum* foram encontradas em jardins de fungos de colônias de laboratório (RODRIGUES et al., 2005a). Já *S. kiliense* (15%), *E. weberi* (15%), *Fusarium oxysporum* (23%), *Mucor hiemalis* (15%) e *T. harzianum* (38%) foram as espécies prevalentes em jardins de fungos de colônias de campo (RODRIGUES et al., 2005a). Esse estudo sinalizou que outros fungos filamentosos podem ocorrer nos ninhos, além do fungo mutualista e de *Escovopsis* sp. Os autores sugerem que tais microfungos poderiam ser oportunistas, de modo a se aproveitar dos ninhos quando estes entram em algum estado de desequilíbrio (i.e. no caso, provocado pelo inseticida).

Rodrigues et al. (2008a) demonstraram que a taxa de infecção por *Escovopsis* em ninhos de algumas espécies de *Acromyrmex* (do sul do Brasil) são menores que as taxas de infecção encontradas na América Central. Contudo, não se sabe ao certo se isso ocorre devido ao fato dos hábitos alimentares, ou a idade dos ninhos serem diferentes entre as duas regiões. Além disso, esses autores determinaram que *F. oxysporum* foi isolado de 40,5% dos ninhos de *Acromyrmex* do sul do Brasil, enquanto que em ninhos de *A. sexdens rubropilosa* foi isolado de 23% no sudeste do Brasil. Os gêneros *Cunninghamella* e *Fusarium* foram encontrados, respectivamente, em 19% e 26% dos jardins de fungos originados a partir do substrato de folhas de monocotiledôneas (RODRIGUES et al., 2008a). Os gêneros *Fusarium*, *Mucor* e *Escovopsis* foram encontrados em 18,5%, 14,8% e 13%, respectivamente, em jardins de fungos de espécies que cortam folhas de dicotiledôneas (RODRIGUES et al., 2008a).

Fungos endofíticos e epifíticos estão presentes nos tecidos das folhas trazidas para dentro dos ninhos, bem como esporos e micélio de outros fungos também podem ser trazidos no corpo das formigas (FISHER et al., 1996; VAN BAEL et al., 2012). Os estudos destes mesmos autores demonstraram que leveduras são carregadas junto às formigas e apresentam, portanto, grande dispersão dentro dos ninhos.

Com tamanha diversidade de microfungos presentes nos jardins de fungo, acredita-se que muitos podem ser antagonistas do fungo mutualista. Contudo, não descarta-se a possibilidade que algumas espécies de microfungos sejam benéficas para esses insetos. É sabido que as formigas cortadeiras desenvolveram mecanismos para promover o desenvolvimento do fungo mutualista em detrimento dos outros microfungos. Por exemplo, Rodrigues et al. (2008b), estudaram os efeitos do fluido fecal e da glândula mandibular na germinação dos esporos de microfungos. Foi demonstrado que a glândula mandibular apresentou maior inibição da germinação de *Fusarium solani*, *T. harzianum*, *C. elegans* e *S. racemosum* do que o fluido fecal. No entanto, a germinação dos esporos de *E. weberi* e *Metarhizium anisopliae* (fungo entomopatogênico) não foi afetada; sugerindo que as formigas cortadeiras apresentam outros mecanismos para se defender contra esses microfungos.

2.3 Compostos bioativos produzidos por fungos

Pelo fato de uma diversidade de micro-organismos interagir com as formigas e o fungo mutualista, sabe-se que muitos metabólitos podem mediar essa interação (SCHOENIAN et al., 2011). Por exemplo, segundo Rodrigues et al. (2013), a tribo Attini mantém uma associação com actinobactérias que secretam antibióticos. A comunidade

microbiana associada com as formigas cortadeiras e a secreção de compostos sugerem que modificações químicas e físicas ocorrem nos ninhos (RODRIGUES et al., 2013).

Uma diversidade de fungos antagonistas apresenta grande potencial para realizar atividade de biocontrole. Tal atividade geralmente está relacionada à produção de compostos químicos (STEYAERT; RIDGWAY; STEWART, 2003).

Dentre os fungos mais estudados em relação à produção de compostos com atividade biológica, incluem os fungos endofíticos. Virtualmente, todas as plantas em ecossistemas naturais mantêm uma simbiose com esses organismos (RODRIGUEZ et al., 2008). Segundo esses autores, os diferentes grupos de fungos endofíticos apresentam uma variedade de hospedeiros, desempenhando funções ecológicas muitas vezes desconhecidas.

Fungos endofíticos utilizam muitos mecanismos para se adaptar aos ambientes em que vivem e depois de coexistirem por um longo tempo com suas plantas hospedeiras, estes fungos podem produzir, *in vitro*, substâncias bioativas (WANG; DAI, 2010). Segundo esses autores, os fungos endofíticos e suas plantas hospedeiras podem apresentar vias semelhantes para a síntese de compostos secundários, devido a troca de material genético, ocasionada pelo longo tempo de convivência. Os fungos endofíticos podem produzir metabólitos, substâncias reguladoras, antimicrobianas, antivirais ou inseticidas, de importância farmacêutica, industrial e agrícola (CABEZAS et al., 2012).

Entretanto, a atividade antimicrobiana também é encontrada em outros grupos de fungos. Por exemplo, fungos do gênero *Trichoderma* representam um terço de todas as preparações produzidas e vendidas como biocontrole de fitopatógenos (STEYAERT; RIDGWAY; STEWART, 2003). Esses fungos apresentam grande potencial para se adaptar a diferentes condições ecológicas e são considerados grandes oportunistas (DRUZHININA et al., 2011).

Devido aos fungos serem produtores de diversos compostos com atividade antimicrobiana, o presente trabalho procurou estudar se o antagonismo entre microfungos e o fungo cultivado pelas formigas cortadeiras pode ser mediado por compostos bioativos.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar as interações entre fungos filamentosos (microfungos) frente ao fungo mutualista cultivado pelas formigas cortadeiras.

3.2 Específicos

- Avaliar e comparar o potencial antagonista dos fungos filamentosos utilizando três abordagens diferentes: (i) co-cultivo *in vitro*; (ii) cultivo direto nos jardins de fungos e (iii) ensaios utilizando filtrados de cultivo.
- Comparar o potencial antagonista dos fungos filamentosos associados aos ninhos de formigas cortadeiras com fungos provenientes de outros ambientes ou substratos.
- Avaliar se o fungo mutualista apresenta antagonismo frente aos fungos filamentosos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem dos isolados de fungos e manutenção das culturas

Os microfungos utilizados nos bioensaios foram obtidos em estudos prévios (RODRIGUES et al. 2005a,b; 2008; 2011 e projeto PROTAX - “Programa de Capacitação em Taxonomia” – Código de barras de DNA de Basidiomycota e Ascomycota de áreas do semi-árido e da Mata-Atlântica do estado da Bahia). Os microfungos foram isolados de vários substratos, tais como: (i) solo adjacente e jardim de fungo de ninhos de formigas dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* e (ii) solos amostrados a 10 m de distância de ninhos de formigas cortadeiras (Tabela 1). Para analisar a suscetibilidade do fungo mutualista frente a fungos provenientes de outros ambientes, foram utilizados os fungos endofíticos isolados de folhas de cacauieiro: *Verticillium* sp. END61, *Clonostachys* sp. END72 e *Fusarium equiseti* END77. Os dois primeiros fungos foram isolados de cacauieiros mantidos em uma área completamente rodeada com floresta nativa conservada, em estágio avançado de sucessão. *Fusarium equiseti* END77 foi isolado de cacauieiros em uma área na qual o entorno apresenta mata perturbada, com a presença de outros cultivos, além de rodovias que cruzam a área.

Todos os microfungos estão depositados no acervo da Central de Recursos Microbianos da UNESP em glicerol 10% a -80 °C. Para a reativação dos fungos, os isolados foram retirados do freezer -80 °C, dispostos em freezer -20 °C durante 20 minutos e depois na geladeira até seu completo descongelamento. A suspensão celular foi transferida para placas de Petri, contendo MA2%, com auxílio de uma alça e incubadas a 25 °C, durante sete dias. Após este período, esporos do microfungo foram transferidos para tubos contendo MA2% e armazenados em geladeira.

O fungo mutualista *L. gongylophorus* FF2006, isolado de ninho de laboratório de *A. sexdens rubropilosa*, foi mantido através de repiques periódicos durante os experimentos em meio A com aveia e incubado em BOD a 25 °C, no escuro, durante 15 a 20 dias.

Tabela 1. Origem dos fungos filamentosos (microfungos) utilizados nos bioensaios.

Código	Fungo	Origem	Código do ninho	Local
3e(t=12)	<i>Sarocladium kiliense</i>	Jardim de fungo de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	Ninho 3	Corumbataí-SP
A086a	<i>Escovopsis</i> sp.	Jardim de fungo de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	G47	Corumbataí-SP
A086b	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	Jardim de fungo de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	G47	Corumbataí-SP
AR034	<i>Trichoderma harzianum</i> species complex ¹	Jardim de fungo de <i>Acromyrmex</i> sp.	ARFVG110517-01	Camacan-BA
AR036	<i>Escovopsioides</i> sp.	Jardim de fungo de <i>Acromyrmex</i> sp.	ARFVG110517-01	Camacan-BA
AR037	<i>Fusarium solani</i> species complex ¹	Jardim de fungo de <i>Acromyrmex</i> sp.	ARFVG110517-01	Camacan-BA
RS012	<i>Fusarium oxysporum</i> species complex ¹	Jardim de fungo de <i>Acromyrmex ambiguus</i>	AOMB060904-02	Nova Petrópolis-RS
RS038	<i>Cunninghamella binariae</i>	Jardim de fungo de <i>Acromyrmex aspersus</i>	AOMB080904-06	São Marcos-RS
SA003	<i>Zygorhynchus moelleri</i>	Solo adjacente de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	AR090402-01	Corumbataí-SP
SA062	<i>Trichoderma harzianum</i> species complex ¹	Solo adjacente de <i>Atta bisphaerica</i>	AR090429-01	Botucatu-SP
SA082	<i>Trichoderma spirale</i>	Solo adjacente de <i>Atta bisphaerica</i>	AR090429-01	Botucatu-SP
SC069	<i>Trichoderma spirale</i>	Solo a 10 m de distância de ninho de <i>Atta bisphaerica</i>	AR090429-01	Botucatu-SP
END61	<i>Verticillium</i> sp.	Cacaueiro, Fazenda Jacy	-	Ilhéus-BA
END72	<i>Clonostachys</i> sp.	Cacaueiro, Fazenda Jacy	-	Ilhéus-BA
END77	<i>Fusarium equiseti</i> species complex ¹	Cacaueiro, Fazenda Almirante	-	Ilhéus-BA

¹ complexo de espécies que apresentam morfologias semelhantes porém são distintas filogeneticamente.

4.2 Bioensaios

4.2.1 Co-cultivo *in vitro*

O potencial antagonista dos microfungos selecionados frente ao fungo mutualista foi avaliado em testes *in vitro* utilizando a técnica de co-cultivo, segundo Silva et al. (2006c). Com auxílio de um furador de rolha, foram recortados “discos” (8 mm de diâmetro) do micélio do fungo mutualista, mantido em meio A com aveia (em g L⁻¹: 50 de aveia em flocos, 5 de NaCl, 10 de glicose, 5 de peptona, 10 de extrato de malte e 10 de bacto ágar granulado). Os “discos” foram inoculados em placas contendo meio PDA (*Potato-Dextrose Agar*, Acumedia), a uma distância de 1,5 cm da borda da placa e, em seguida, incubados durante 17 dias, a 25 °C, no escuro. Após incubação, um “disco” de micélio do microfungo selecionado (previamente cultivado em MA2% - Ágar malte 2%, nas mesmas condições), foi inoculado a uma distância de 1,5 cm da borda da placa, oposta ao fungo mutualista. Esse sistema foi incubado durante 14 dias a 25 °C, no escuro. Com as placas de Petri viradas de cabeça para baixo foram realizadas as medidas do diâmetro (em cm) da colônia do fungo mutualista no dia em que foi inoculado o “disco” do microfungo. O diâmetro das colônias do fungo mutualista e do microfungo foram medidas no 2º, 3º, 5º, 7º, 10º e 14º dia após início do bioensaio. Para cada combinação microfungo-fungo mutualista foram realizadas seis réplicas.

Foram realizados dois controles: o controle 1 consistia em placas de PDA apenas com o “disco” do fungo mutualista. O controle 2 consistia em placas de PDA apenas com o “disco” do microfungo selecionado. Foram realizadas as medidas dos diâmetros em ambos os controles no 2º, 3º, 5º, 7º, 10º e 14º dia. Os controles também foram realizados em seis réplicas.

Os valores das medições foram anotados e organizados em uma planilha (Excel) e a partir desta foram conduzidas as seguintes análises, segundo Silva et al. (2006c):

(i) foi calculado o diâmetro inicial médio (DI) e o diâmetro final médio (DF) de cada combinação. A partir desses valores foi estimada a eficiência média do crescimento do fungo mutualista (E), conforme a fórmula: $E = DF / DI$. A eficiência relativa (ER) do crescimento das colônias de *L. gongylophorus* FF2006 na presença de diferentes microfungos foi expressa em relação ao controle do fungo mutualista, pela fórmula: $ER = E / EC$; sendo EC a eficiência do crescimento do fungo mutualista na ausência dos microfungos. A partir da eficiência relativa foi estimada a porcentagem de crescimento e de inibição do fungo mutualista. Diferenças estatísticas entre o crescimento do fungo mutualista no controle e o fungo

mutualista frente aos microfungos foram avaliadas para cada dia de leitura através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (a um erro de 5%), utilizando o programa BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007). As comparações múltiplas entre os valores de crescimento do fungo mutualista e os microfungos foram realizadas utilizando-se o teste de Dunn.

(ii) foi avaliado os possíveis efeitos do fungo mutualista no crescimento dos microfungos. Para tanto, o diâmetro do micélio do microfungo na presença do fungo mutualista e na ausência do mesmo foi avaliado. As diferenças estatísticas entre as médias do diâmetro final do microfungo na ausência (controle) e na presença do fungo mutualista foram avaliadas com o teste não paramétrico de Mann-Whitney (a um erro de 5%), utilizando o programa BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007).

4.2.2 Cultivo direto no jardim de fungo

Foram realizados ensaios nos quais o micélio dos fungos (Tabela 1), com exceção dos fungos endofíticos, foram inoculados diretamente no jardim de fungo, segundo o método proposto por Taerum et al. (2007). Esse método consiste em inocular micélio de fungos filamentosos (cultivados previamente em MA2%, a 25 °C, durante sete dias, no escuro) em fragmentos de jardim de fungo livre de operárias e larvas. Fragmentos de jardim de fungo foram removidos de uma colônia de *A. sexdens rubropilosa* mantida no laboratório do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS/IB/UNESP/Rio Claro).

Foi elaborado um sistema em placas de Petri (52 mm de diâmetro), nas quais em seu interior continham uma tampa de garrafa, sobre a qual foi disposto o jardim de fungo. Fragmentos de micélio (8 mm de diâmetro) de cada microfungo ou fragmentos de mesmo tamanho de MA2% sem microfungo inoculado (no caso do controle) foram dispostos ao lado do jardim (ver Figura 3 para detalhes). Na outra extremidade da placa foi disposto algodão umedecido com água destilada estéril para manter a umidade no interior da placa. Foram realizadas oito réplicas para cada microfungo e oito réplicas para o controle. As placas que contaminavam com fungos que não constavam no experimento foram removidas.

Os resultados foram avaliados segundo a capacidade dos fungos filamentosos em colonizar o jardim de fungo. Desse modo, foram gerados dados categóricos (0= sem crescimento; 1= crescimento na metade do jardim; 2= crescimento sobre todo o jardim e 3= crescimento sobre todo o jardim e presença de esporulação). Foi organizada uma planilha, indicando para cada microfungo, o número de réplicas em que o microfungo cresceu e a presença ou não de esporulação.

4.2.3 Ensaio utilizando filtrados de cultivo

Foram obtidos os filtrados de cultivo dos 15 microfungos utilizados nos bioensaios de co-cultivo. Cada microfungo foi cultivado em MA2%, durante sete dias, a 25 °C, no escuro. Após incubação, foram realizadas suspensões de esporos de cada microfungo, as quais foram padronizadas a 10^6 esporos mL^{-1} , em câmara de Neubauer. As suspensões foram inoculadas em Erlenmeyers (125 mL) contendo 90 mL de caldo extrato de malte 2%. Os frascos foram incubados a 25 °C, durante oito dias, sob agitação de 120 rpm. Após incubação, o meio de cultivo foi filtrado em papel filtro estéril e centrifugado a 10.000 rpm, durante 15 minutos. O sobrenadante foi recuperado e filtrado em membrana de 0,45 micra.

Para os ensaios em placa de Petri, foram adicionados 5 mL do filtrado de cada microfungo à 5 mL do meio A suplementado com aveia (este duplamente concentrado). Foram realizadas sete réplicas para cada filtrado de cultivo de microfungo.

O controle consistiu em 5 mL de malte líquido mais 5 mL do meio A suplementado com aveia, duplamente concentrado. Para o controle foram realizadas sete réplicas.

Após a elaboração dos meios, foi inoculado no centro da placa um “disco” (8 mm de diâmetro) de micélio do fungo mutualista, previamente cultivado em meio A com aveia, durante 15 a 20 dias. Todas as réplicas foram digitalizadas no 3º, 7º e 14º dia de cultivo do fungo mutualista e as medidas dos diâmetros (em cm) do fungo mutualista foram calculadas através do programa ImageJ v. 1.38 (ABRAMOFF; MAGALHAES; RAM, 2004).

Diferenças significativas entre as médias de diâmetro de crescimento do fungo mutualista na presença dos diferentes filtrados de cultivo foram avaliadas com o teste ANOVA 1-fator, utilizando o *software* R v. 2.12.1 (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2011). Para realizar os testes, comparou-se as diferenças de crescimento do fungo mutualista no 14º dia. O teste *posthoc* de Tukey HSD foi utilizado para comparações múltiplas entre as médias. A normalidade dos dados e homogeneidade das variâncias foram averiguadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente.

5 RESULTADOS

5.1 Efeitos dos microfungos no crescimento do fungo mutualista

Após 14 dias de experimento a maioria dos microfungos (11 de um total de 15 isolados) inibiu significativamente o crescimento do fungo mutualista de *A. sexdens rubropilosa* (Kruskal-Wallis, $H= 111.44$, $P < 0.0001$, Tabela 2). Nenhum dos 11 isolados que inibiram significativamente o crescimento do fungo mutualista, apresentaram diferenças significativas de efeito entre si. Os microfungos que não inibiram significativamente o fungo mutualista foram: *Escovopsioides* sp. AR036, *F. solani* AR037, *Verticillium* sp. END61 e *Clonostachys* sp. END72 (Tabela 2).

Os microfungos que inibiram o crescimento do fungo mutualista em maior intensidade foram: *Trichoderma harzianum* SA062, *Trichoderma spirale* SC069 e *Trichoderma harzianum* AR034 (43%, 42% e 41%, respectivamente, Tabela 3). Considerando as médias de crescimento do fungo mutualista na presença desses três microfungos (Tabela 2), pode-se notar que as diferenças observadas não foram estatisticamente significativas, portanto, os três microfungos inibiram em igual intensidade *L. gongylophorus* (Tabela 2).

Ainda, não foram observadas diferenças significativas no crescimento de *L. gongylophorus* até o segundo dia de experimento ($H= 22.46$, $P= 0.0961$, Tabela 2). Por outro lado, diferenças significativas foram observadas a partir do terceiro dia, pois o fungo mutualista cultivado na presença de *T. harzianum* SA062 e *T. spirale* SA082 apresentou menores médias de crescimento radial quando comparadas com o controle na ausência de microfungos (Tabela 2). *Escovopsis* sp. A086a, considerado parasita especializado do fungo mutualista, inibiu *L. gongylophorus* na mesma intensidade que outros microfungos (Tabela 3).

Notável foi a constatação de que todos os microfungos proporcionaram o escurecimento da colônia de *L. gongylophorus*, após 14 dias de experimento (Figura 1). Tal modificação na colônia do fungo mutualista indica que a interação com os microfungos pode envolver sinais químicos. Além disso, foi observado que a colônia do fungo mutualista na presença de *T. harzianum* AR034, *T. spirale* SC069, *S. kiliense* 3e(t=12) e *Zygorhynchus moelleri* SA003 apresentou coloração mais fraca, tendendo a ficar transparente.

Tabela 2. Médias do crescimento radial do fungo mutualista (em cm), *Leucoagaricus gongylophorus*, na ausência (controle) e presença de microfungos isolados de diversas origens. Médias seguidas do erro padrão.

Dias	Controle	3e(t=12)	A086a	A086b	AR034	AR036	AR037	RS012	RS038	H	P
0	2,78±0,02a ¹	2,73±0,06a	2,93±0,08a	2,65±0,04a	2,7±0,05a	2,93±0,04a	2,93±0,03a	2,68±0,05a	2,6±0,05a	40.63	0.0004
2	3,03±0,02a	2,96±0,07a	3,05±0,07a	2,86±0,12a	2,93±0,04a	3,13±0,06a	3,11±0,04a	2,98±0,06a	2,95±0,05a	22.46	0.0961
3	3,24±0,03a	3,06±0,05a	3,00±0,08a	3,08±0,03a	2,98±0,04a	3,25±0,06a	3,21±0,04a	3,11±0,04a	3,01±0,04a	43.72	0.0001
5	3,50±0,04a	3,16±0,05a	ND ²	3,15±0,05a	2,98±0,04b	ND	ND	3,21±0,04a	2,98±0,06b	72.68	<0.0001
7	3,75±0,04a	3,3±0,08a	3,03±0,08b	3,06±0,08b	2,95±0,04b	3,33±0,07a	3,43±0,04a	3,26±0,05a	3,00±0,05b	101.40	<0.0001
10	4,14±0,04a	3,23±0,11b	3,01±0,07b	3,13±0,06b	2,95±0,04b	3,35±0,07a	3,61±0,04a	3,16±0,04b	2,88±0,06b	107.52	<0.0001
14	4,63±0,05a	3,18±0,11b	3,01±0,07b	3,13±0,06b	2,46±0,04b	3,33±0,06a	3,65±0,05a	3,10±0,04b	2,83±0,08b	111.44	<0.0001

¹ Valores seguidos pela mesma letra nas linhas, não apresentam diferenças estatisticamente significativas segundo o teste de Kruskal-Wallis.

² Sem dados.

(continua)

(continuação)

Tabela 2. Médias do crescimento radial do fungo mutualista (em cm), *Leucoagaricus gongylophorus*, na ausência (controle) e presença de microfungos isolados de diversas origens. Médias seguidas do erro padrão.

Dias	Controle	SA003	SA062	SA082	SC069	END61	END72	END77	H	P
0	2,78±0,02a ¹	3,05±0,06a	2,71±0,04a	2,83±0,08a	2,71±0,03a	2,81±0,12a	2,93±0,11a	2,65±0,04a	40.63	0.0004
2	3,03±0,02a	3,13±0,06a	2,98±0,05a	3,1±0,11a	2,96±0,03a	3,05±0,13a	3,2±0,11a	2,85±0,07a	22.46	0.0961
3	3,24±0,03a	3,13±0,06a	2,96±0,05b	2,86±0,11b	3,03±0,04a	3,18±0,13a	3,28±0,12a	2,95±0,07a	43.72	0.0001
5	3,50±0,04a	3,05±0,06b	2,71±0,10b	2,96±0,12b	2,93±0,03b	3,33±0,10a	3,58±0,11a	2,98±0,08b	72.68	<0.0001
7	3,75±0,04a	3,05±0,06b	2,63±0,08b	2,95±0,12b	2,91±0,03b	3,48±0,10a	3,73±0,10a	3,01±0,10b	101.40	<0.0001
10	4,14±0,04a	3,05±0,06b	2,66±0,09b	2,98±0,13b	2,91±0,03b	3,61±0,09a	4,08±0,16a	3,01±0,10b	107.52	<0.0001
14	4,63±0,05a	3,01±0,06b	2,70±0,11b	3,05±0,11b	2,81±0,03b	3,81±0,12a	4,36±0,22a	3,06±0,15b	111.44	<0.0001

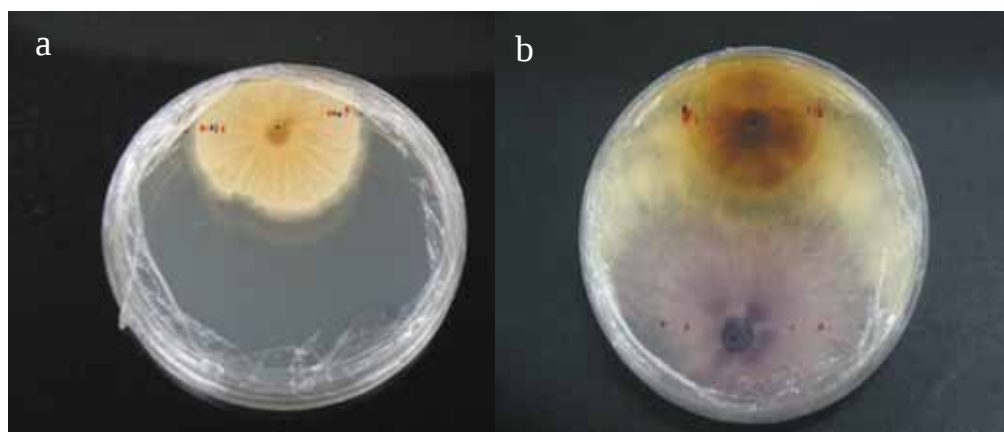
¹ Valores seguidos pela mesma letra nas linhas, não apresentam diferenças estatisticamente significativas segundo o teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 3. Porcentagem de inibição do fungo mutualista na presença dos microfungos.

Código	Microfungo	ER ¹	Inibição (%)
SA062	<i>Trichoderma harzianum</i>	0,577421585	43
SC069	<i>Trichoderma spirale</i>	0,589344527	42
AR034	<i>Trichoderma harzianum</i>	0,59721677	41
RS038	<i>Cunninghamella binariae</i>	0,607142857	40
SA003	<i>Zygorhynchus moelleri</i>	0,612021858	39
SA082	<i>Trichoderma spirale</i>	0,62541425	38
A086a	<i>Escovopsis</i> sp.	0,65513468	35
RS012	<i>Fusarium oxysporum</i>	0,656685191	35
3e(t=12)	<i>Sarocladium kiliense</i>	0,676636036	33
A086b	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	0,679874214	33
AR036	<i>Escovopsioides</i> sp.	0,723905724	28
END77	<i>Fusarium equiseti</i>	0,74393531	26
AR037	<i>Fusarium solani</i>	0,792676768	21
END61	<i>Verticillium</i> sp.	0,87109045	13
END72	<i>Clonostachys</i> sp.	0,956980519	5

¹ ER: eficiência relativa de crescimento do fungo mutualista.

Figura 1 – Coloração do micélio do fungo mutualista *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006 na presença de microfungos. (a) cultura pura do fungo mutualista de *Atta sexdens rubropilosa*; (b) fungo mutualista cultivado na presença de *Fusarium oxysporum* RS012. Placas contendo meio PDA após 14 dias de experimento.



5.2 Efeitos do fungo mutualista no crescimento dos microfungos

Pode-se observar que ao final de 14 dias de experimento, o fungo mutualista não afetou o crescimento de nenhum dos 15 microfungos testados, quando comparado aos respectivos controles (Mann-Whitney, $P > 0,05$).

Alguns microfungos, por exemplo, *S. kiliense* 3e(t=12), *Escovopsis* sp. A086a, *F. solani* AR037, *T. harzianum* AR034, *Clonostachys* sp. END72, *F. equiseti* END77 e *F. oxysporum* RS012, apresentaram um crescimento mais rápido durante a interação com o fungo mutualista, alcançando o diâmetro total da placa de Petri (7 cm) antes dos seus respectivos controles (Figura 2 b, c, d, f, l, n e o). *Cunninghamella binariae* RS038 e *T. spirale* SC069 apresentaram um crescimento mais rápido durante a interação com o fungo mutualista até o segundo dia de experimento, e a partir do terceiro dia, o crescimento não diferiu do controle (Figura 2 g e k, respectivamente). *T. spirale* SA082 e *T. harzianum* SA062 atingiram o diâmetro final após dois dias de crescimento na presença do fungo mutualista, não diferindo do controle (Mann-Whitney, $P= 0,5$, Figura 2 j e i, respectivamente). *Escovopsioides* sp. AR036 e *Z. moelleri* SA003 apresentaram um crescimento mais rápido na ausência do fungo mutualista, entretanto, este não interferiu no crescimento desses microfungos (Figura 2 a e h, respectivamente).

5.3 Colonização dos microfungos nos fragmentos de jardins de fungos

Ao final de cinco dias de experimento, os jardins de fungos que permaneceram na ausência de operárias não apresentaram crescimento de fungos filamentosos, com algumas exceções. Nesses casos, observou-se a presença de contaminações com o fungo *S. racemosum* a partir do quinto dia. Tais placas foram removidas do experimento e provavelmente sinalizam a contaminação prévia com esse fungo.

Após cinco dias de experimento, todos os microfungos inoculados cresceram e esporularam nos fragmentos de jardins desprovidos de operárias (Tabela 4). Somente os jardins inoculados com os microfungos *F. solani* AR037, *F. oxysporum* RS012 e *Z. moelleri* SA003, não foi possível observar a esporulação dos microfungos, apesar destes crescerem neste substrato.

T. harzianum SA062 foi o fungo que esporulou mais rápido, em apenas dois dias (Tabela 4). *Escovopsis* sp. A086a, apresentou crescimento rápido, preenchendo toda a placa de Petri a partir do segundo dia. Este fungo também apresentou rápida esporulação, porém a partir de 4 dias de experimento.

Até o terceiro dia de experimento, os jardins apresentaram tonalidade bege com algumas regiões de marrom escuro na presença dos microfungos. Ao final de cinco dias, os jardins apresentaram coloração escura em algumas regiões e alguns ficaram totalmente pretos.

As placas controle apresentaram os jardins com sua coloração original de bege a marrom claro (Figura 3).

Figura 2 – Crescimento dos microfungos na presença (interação) e na ausência (controle) do fungo mutualista.

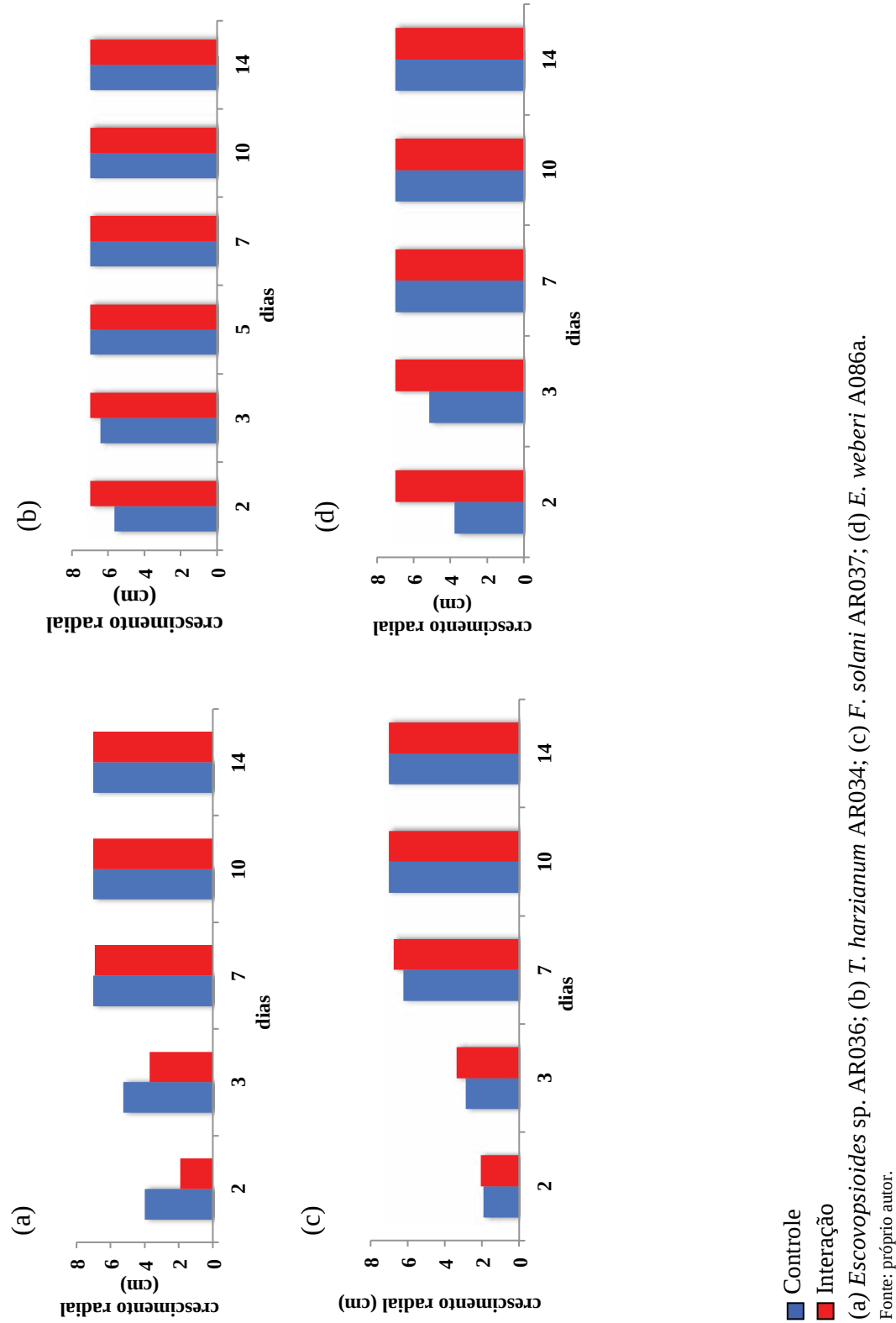
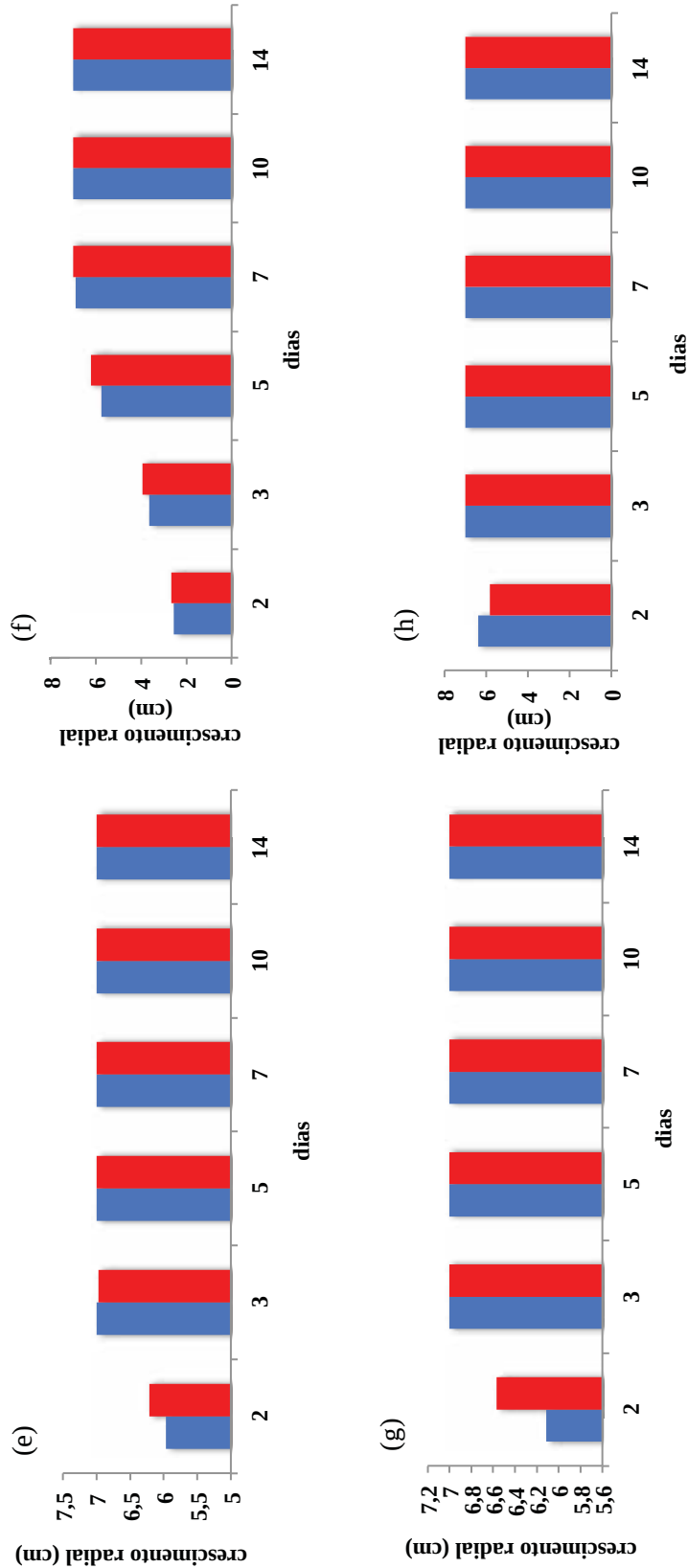


Figura 2 – Crescimento dos microfungos na presença (interação) e na ausência (controle) do fungo mutualista.

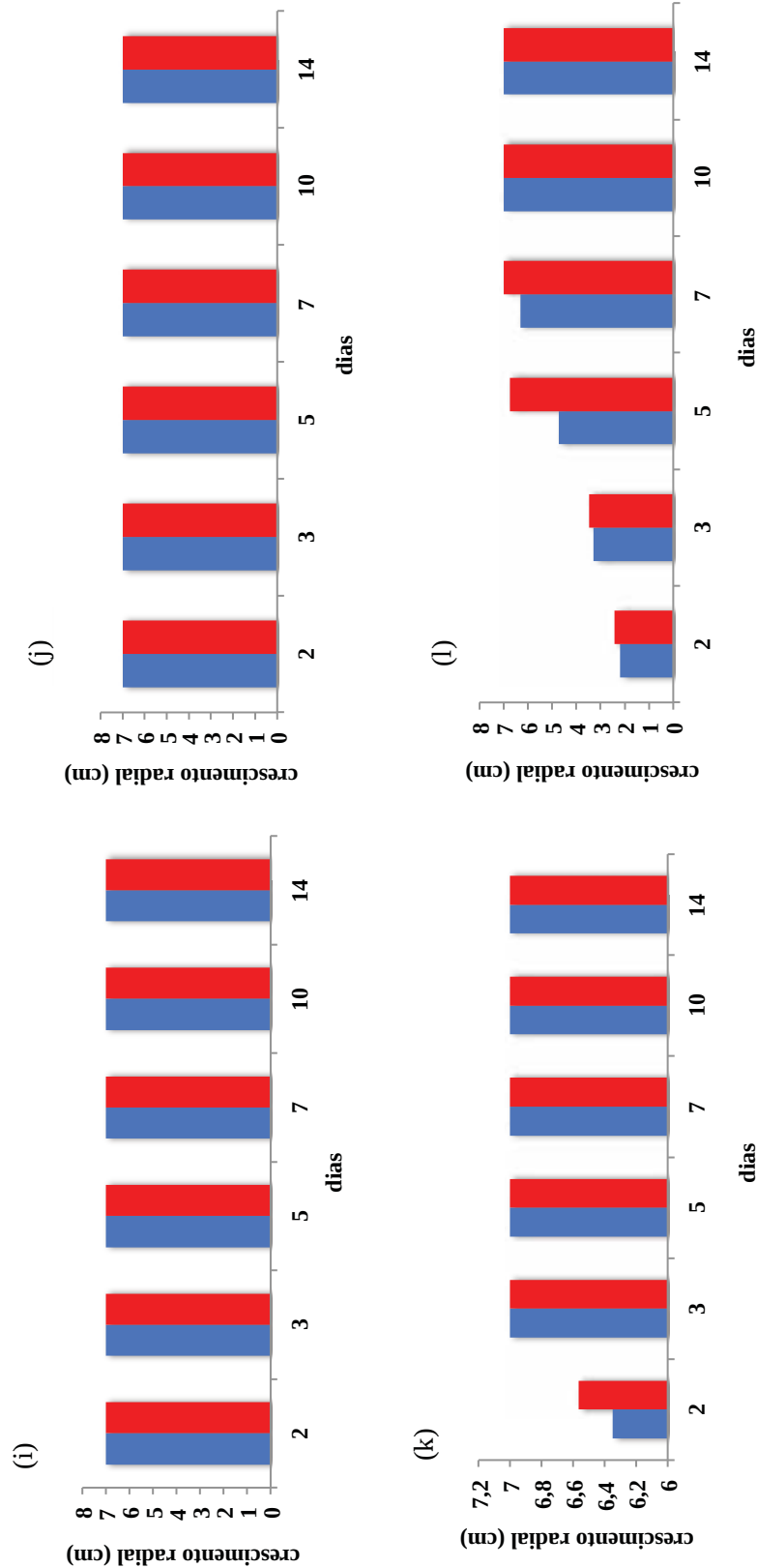


■ Controle
■ Interação

(e) *Syncephalastrum racemosum* A086b; (f) *F. oxysporum* RS012; (g) *C. binariae* RS038; (h) *Z. moelleri* SA003.

Fonte: próprio autor.

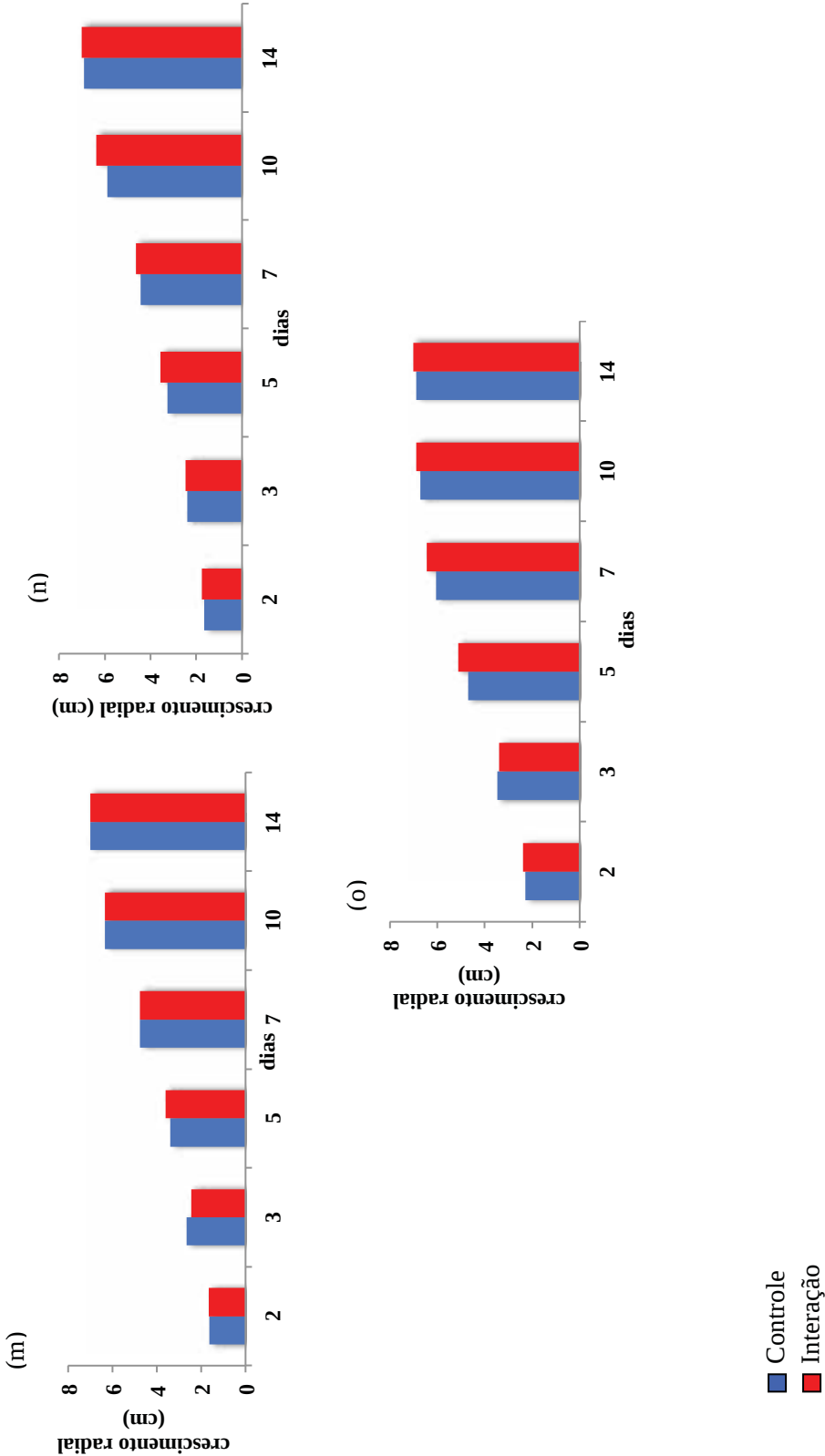
Figura 2 – Crescimento dos microfungos na presença (interação) e na ausência (controle) do fungo mutualista.



■ Controle
■ Interação

(i) *T. harzianum* SA062; (j) *T. spirale* SA082; (k) *T. spirale* SC069; (l) *S. kiliense* 3e(t=12).
Fonte: próprio autor.

Figura 2 – Crescimento dos microfungos na presença (interação) e na ausência (controle) do fungo mutualista.



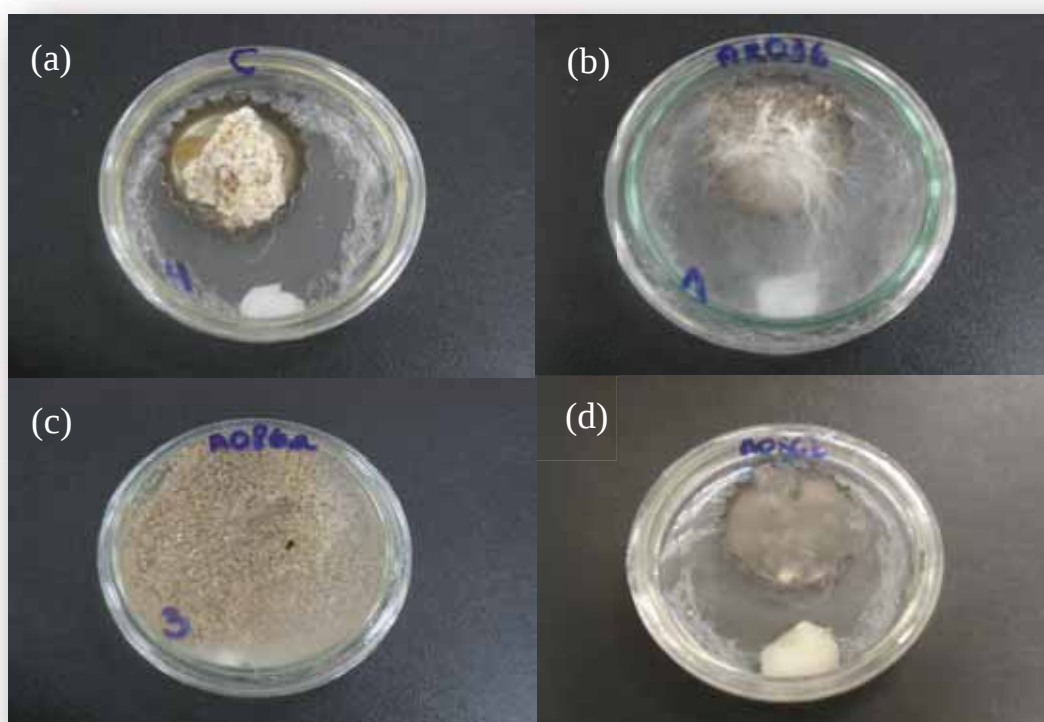
(m) *Verticillium* sp. END61; (n) *Clonostachys* sp. END72; (o) *F. equiseti* END77.

Fonte: próprio autor.

Tabela 4. Crescimento e esporulação dos microfungos nos jardins de fungos. Os valores indicam: o número de réplicas em que o microfungo cresceu / o número de réplicas total. A presença de esporulação foi indicada com um asterisco (*).

Microfungos	1 dia	2 dias	3 dias	4 dias	5 dias
SA062	8/8	8/8*	8/8*	8/8*	8/8*
A086b	8/8	8/8	8/8	8/8*	8/8*
RS012	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8
SC069	8/8	8/8	8/8	7/7*	7/7*
SA003	6/8	7/8	8/8	7/7	7/7
AR037	2/8	7/8	8/8	8/8	8/8
RS038	0/8	0/6	2/6	2/6	3/6*
AR036	7/8	8/8	8/8	8/8*	8/8*
A086a	8/8	8/8	8/8	8/8*	8/8*
3e(t=12)	5/8	6/8	7/8	7/8*	7/8*
AR034	7/8	8/8	8/8*	8/8*	8/8*
SA082	7/8	7/8	8/8*	8/8*	8/8*
Controle	0/8	0/8	0/8	0/8	1/8

Figura 3 – Jardins de fungos na presença dos microfungos. Placa controle com jardim não inoculado apresentando coloração mais clara (a), *Escovopsioides* sp. AR036 (b), *Escovopsis* sp. A086a (c) e *Syncephalastrum racemosum* A086b (d), com 5 dias de experimento.



5.4 Efeitos dos filtrados de cultivo no crescimento do fungo mutualista

Após 14 dias de experimento, a maioria dos filtrados (13 de um total de 15) inibiu significativamente o crescimento de *L. gongylophorus* FF2006, quando comparado ao controle (ANOVA 1-fator, $F= 1,3494$ $P< 0,05$, Tabela 5). Apenas os filtrados dos fungos *Escovopsis* sp. A086a e *Fusarium equiseti* END77 não inibiram significativamente o crescimento do fungo mutualista (Teste de Tukey, $P> 0,05$, Tabela 5).

Tabela 5. Médias do crescimento radial (em cm) do fungo mutualista, *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006, após 14 dias de incubação na ausência dos filtrados (controle) e na presença dos filtrados dos microfungos isolados de diversas origens. Médias seguidas do erro padrão.

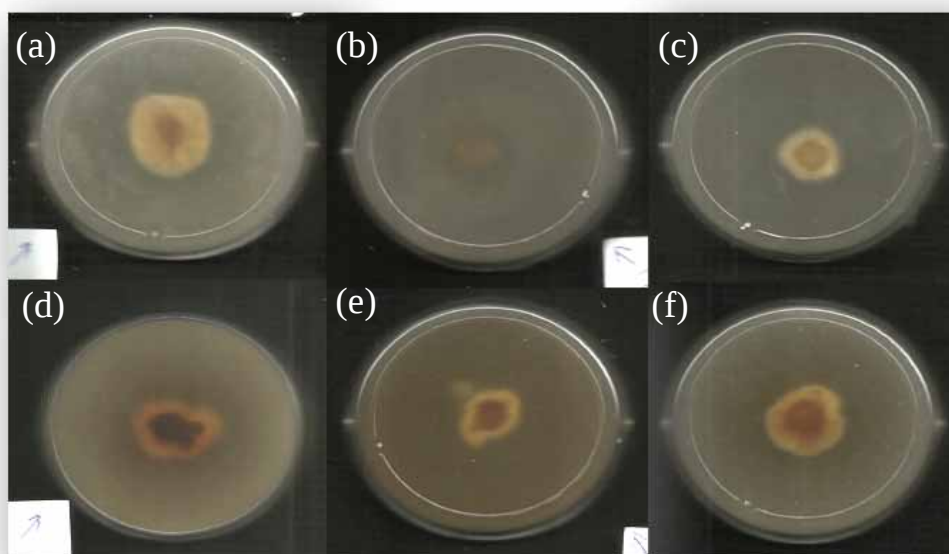
Microfungos	Diâmetro (cm) ¹
Controle	2,44 ± 0,11 a
3e(t=12)	1,11 ± 0,04 b
A086a	2,16 ± 0,09 a
A086b	0,98 ± 0,02 b
AR034	1,03 ± 0,05 b
AR036	1,75 ± 0,09 b
AR037	1,91 ± 0,01 b
END61	1,76 ± 0,03 b
END72	1,57 ± 0,04 b
END77	2,28 ± 0,05 a
RS012	1,93 ± 0,04 b
RS038	1,63 ± 0,08 b
SA003	1,74 ± 0,08 b
SA062	1,73 ± 0,04 b
SA082	1,53 ± 0,04 b
SC069	1,47 ± 0,05 b

¹ Valores seguidos pela mesma letra não apresentam diferenças significativas, segundo o teste de *posthoc* de Tukey HSD (valores são relativos apenas ao controle).

Dentre os filtrados avaliados, notável foi a inibição proporcionada pelo filtrado de cultivo de *S. racemosum* A086b (Tabela 5, Figura 4). A inibição ocasionada por este fungo foi maior e significativamente diferente da inibição causada pelos microfungos do gênero *T. spirale* SC069, *T. spirale* SA082 e *T. harzianum* SA062 (Teste de Tukey, $P> 0,05$, dados não mostrados), onde a média de crescimento do fungo mutualista na presença do filtrado de cultivo de *S. racemosum* A086b foi menor que a média de crescimento do fungo mutualista na presença dos filtrados de cultivo de *T. spirale* SC069, *T. spirale* SA082 e *T. harzianum* SA062, após 14 dias de crescimento (Tabela 5).

Ainda, pode-se observar que os fungos endofíticos de cacaueroi *Verticillium* sp. END61 e *Clonostachys* sp. END72 inibiram significativamente *L. gongylophorus* FF2006.

Figura 4 – Crescimento radial e alterações macroscópicas do fungo mutualista após 14 dias de cultivo na ausência (a) e presença de filtrados de cultivo de microfungos: *Syncephalastrum racemosum* A086b (b), *Clonostachys* sp. END72 (c), *Escovopsioides* sp. AR036 (d), *Trichoderma harzianum* AR034 (e), *Zygorhyncus moelleri* SA003 (f). Note as alterações na coloração do micélio do fungo mutualista.



Foi possível observar um maior escurecimento da colônia de *L. gongylophorus* FF2006 quando na presença dos filtrados de cultivo dos fungos: *Escovopsioides* sp. AR036, *T. harzianum* AR034, *Z. moelleri* SA003 e *T. spirale* SA082, indicando que estes podem apresentar compostos químicos que causem uma alteração da colônia (Figura 4). Essas alterações observadas são semelhantes aquelas obtidas nos experimentos de co-cultivo.

6 DISCUSSÃO

Conforme relatado em trabalhos prévios, os jardins de fungo das formigas cortadeiras apresentam uma variedade de fungos filamentosos (RODRIGUES et al., 2005a; 2008). Muitos desses fungos são considerados potenciais antagonistas de *L. gongylophorus*. Por tal motivo, o presente estudo teve como objetivo entender as interações microbianas que ocorrem no jardim de fungo, especialmente, as interações entre o fungo cultivado pelas formigas e os outros fungos filamentosos, na tentativa de encontrar potenciais antagonistas do fungo das formigas.

A maioria dos microfungos inibiu significativamente o fungo mutualista, quando comparado com o controle (Tabela 2). Em alguns ensaios de co-cultivo, pode-se notar que o diâmetro médio das colônias do fungo mutualista diminuiu nas duas últimas leituras. Assim, deve-se considerar que nessas leituras houve dificuldade na identificação dos limites das colônias do fungo mutualista, devido à sobreposição das colônias dos fungos antagonistas. Tal fato é um possível fator limitante desse tipo de ensaio *in vitro*. Por outro lado, foi observado que o fungo mutualista frente a *S. racemosum* A086b, *T. spirale* SA082 e *F. equiseti* END77 apresentou crescimento até o 14º dia (Tabela 2), porém, este foi significativamente menor do que o do controle. Nesses ensaios, os limites da colônia de *L. gongylophorus* foram detectados da mesma forma que nos experimentos nos quais observaram-se a diminuição da colônia do fungo. Portanto, a diminuição do diâmetro médio da colônia de *L. gongylophorus* frente alguns microfungos pode também ser devida a uma possível atividade lítica das hifas do fungo cultivado pelas formigas.

Três espécies do gênero *Trichoderma* inibiram o fungo mutualista em maior intensidade em relação aos demais microfungos. Interessante é o fato de que fungos isolados de diversas origens inibirem o crescimento do fungo mutualista de *A. sexdens rubropilosa*. Essa observação demonstra que o fungo mutualista das formigas é suscetível a vários fungos, inclusive aqueles que não estão adaptados ao ambiente dos ninhos desses insetos. Além disso, é possível que esses microfungos também apresentem inibição com os fungos cultivados por *Acromyrmex*; já que as rainhas pertencentes aos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* carregam o fungo mutualista da colônia parental para uma nova colônia e dessa forma, cultivam a mesma linhagem do fungo mutualista (MUELLER et al., 2001).

Fungos do gênero *Trichoderma*, assim como o gênero *Escovopsis*, são frequentemente encontrados nos jardins de fungo das formigas Attini (RODRIGUES et al., 2005a; 2008). Algumas espécies de *Trichoderma* são consideradas parasitas necrotróficos, ou seja, aqueles

que matam o hospedeiro e depois digerem a biomassa remanescente. Segundo vários autores, tanto *Trichoderma* sp., quanto *Escovopsis* sp., aparentemente não penetram nas hifas do fungo mutualista, indicando que a inibição não ocorre através de contato físico, mas sim a partir de uma certa distância; o que sugere o envolvimento de compostos químicos na interação (ORTIZ; ORDUZ, 2000; REYNOLDS; CURRIE, 2004; HAIFIG, 2014). O fungo mutualista frente a *T. harzianum* AR034 e *T. spirale* SC069 apresentou uma segunda alteração no micélio, além do escurecimento da colônia. O fungo mutualista frente a essas linhagens ficaram “transparentes” e ocorreu também uma diminuição do diâmetro da colônia ao final de 14 dias de experimento. Este fato pode ser explicado, segundo Ortiz e Orduz (2000), que utilizaram fungos do gênero *Trichoderma* em seus experimentos *in vitro* de antagonismo, obtendo como resultado a perda da pressão de turgor das células do fungo mutualista. Segundo esses autores, isso pode ter ocorrido devido ao fato de que este microfungo produz compostos tóxicos, como enzimas e substâncias voláteis e não-voláteis, que degradam a parede das células do mutualista. Já os fungos, *S. kiliense* 3e(t=12) e *Z. moelleri* SA003, ocasionaram a mesma mudança de coloração no fungo mutualista, porém tal mudança pode ter ocorrido, provavelmente, devido à competição por nutrientes (SILVA et al., 2006c). De qualquer forma, fica claro que o fungo mutualista apresenta alterações na presença de outros micro-organismos, além daqueles do gênero *Trichoderma*.

O gênero *Fusarium* já foi encontrado em jardim de formigas cortadeiras (RODRIGUES et al. 2005a). Dentre os três isolados que utilizamos no presente estudo, *F. oxysporum* RS012 e *F. equiseti* END77 inibiram o crescimento do fungo mutualista. Este último foi isolado de folhas de cacaueteiro na região de Ilhéus, BA (Tabela 1). Esse resultado é interessante, pois demonstra que outros microfungos associados a outros ambientes também podem inibir o fungo mutualista.

O fungo mutualista não interferiu no crescimento dos microfungos testados neste trabalho. Todos os microfungos que, ao final de 14 dias, não inibiram significativamente, incluindo os fungos endofíticos de cacaueteiro, apresentaram um crescimento normal. Portanto, os resultados sugerem que o fungo mutualista não é um bom competidor para esses fungos filamentosos.

Como demonstrado por Ortiz e Orduz (2000), o fungo mutualista não é capaz de inibir fungos dos gêneros *Trichoderma* e *Clonostachys* (= *Gliocladium*), isso também é válido para os microfungos analisados neste trabalho. O aparecimento de uma pigmentação mais escura no fungo mutualista pode ter sido um mecanismo de defesa contra os microfungos; entretanto, essas alterações podem ter ocorrido apenas por resultado da interação entre os micélios que

não envolva um mecanismo de defesa. Além disso, a maioria dos microfungos apresentou um crescimento mais rápido, quando em contato com o fungo mutualista (RODRIGUES et al., 2005a).

Os microfungos encontrados nos ninhos apresentam mecanismos que os caracterizam como antagonistas. O jardim de fungo apresenta grande quantidade de nutriente devido sua atividade metabólica, como açúcares simples, que podem ser utilizados pelos microfungos e ocasionar um esgotamento, inibindo o crescimento do fungo mutualista e acelerando o crescimento do microfungo (RODRIGUES et al., 2005a; ORTIZ; ORDUZ, 2000).

Com exceção de *C. binariae* RS038, todos os microfungos começaram a crescer nos fragmentos de jardins sem operárias, a partir do primeiro dia de experimento. Além disso, a maioria dos microfungos apresentou esporulação nos jardins (Tabela 3), indicando que uma variedade de microfungos pode se desenvolver nesse substrato (RODRIGUES et al., 2005a). Esses microfungos podem aproveitar dos nutrientes presentes nos jardins de fungos e tornarem-se competidores do fungo mutualista. A esporulação precoce de *T. harzianum* SA062, *T. harzianum* AR034 e *T. spirale* SA082, mostra que estes microfungos apresentam uma grande capacidade de colonização dos jardins, o que evidencia o grau de patogenicidade.

Escovopsis sp. A086a também apresentou antagonismo frente ao fungo mutualista, pois tanto nos experimentos de co-cultivo, quanto no cultivo direto nos jardins de fungo, esse microfungo apresentou o crescimento rápido. Segundo Taerum et al. (2007), linhagens geneticamente semelhantes de *Escovopsis* encontradas tanto nos jardins de fungo de *Atta*, como no de *Acromyrmex*, indicando que não houve co-especiação entre este fungo parasita e esses gêneros de formigas. Dessa forma, pode-se dizer que independente da origem deste microfungo, ele pode inibir o crescimento do fungo mutualista de diversas espécies de formigas.

O ninho cultivado em laboratório, onde foram isolados os jardins de fungo para o experimento de cultivo direto, poderia estar contaminado com *S. racemosum*, porém, na presença das formigas este fungo não se desenvolve. Como esses experimentos foram realizados na ausência de operárias, este microfungo teve a oportunidade de se desenvolver. Ao que tudo indica, *S. racemosum* só é encontrado em jardins de fungos cultivados em laboratório, mas não no solo adjacente e solo à 10 metros de distância dos ninhos (RODRIGUES et al., 2005, 2008, 2011).

Como demonstrado por Currie e Stuart (2001), as formigas cortadeiras desempenham um importante papel na manutenção dos ninhos contra micro-organismos invasores. Segundo esses autores, elas utilizam suas antenas para detectar esporos de outros microfungos

presentes ao redor do jardim de fungo e, caso houver algum microfungo parasita, elas retiram fragmentos do jardim e movendo-os para o lixo. Essa ação foi mais frequente na presença de *Trichoderma* e *Escovopsis*. Dessa forma, a presença das formigas cortadeiras é necessária para proteção do fungo mutualista e limpeza dos ninhos contra fungos parasitas, confirmando que o fungo mutualista não é um bom competidor.

O resultado observado com os filtrados dos fungos *Escovopsis* sp. A086a e *F. equiseti* END77 indica que estes fungos podem não ter produzido seu princípio ativo durante o período de incubação. *Escovopsis* sp. A086a não apresentou um bom crescimento em MA2%, durante os sete dias. Consequentemente, este fungo pode não ter produzido o princípio ativo no caldo extrato de malte durante o período de incubação sob agitação, não apresentando inibição significativa.

Alguns microfungos que não apresentaram inibição significativa no experimento de co-cultivo, inibiram significativamente o fungo mutualista nos testes utilizando os filtrados de cultivo, são eles: *Escovopsioides* sp. AR036, *F. solani* AR037, *Verticillium* sp. END61 e *Clonostachys* sp. END 72 (Tabelas 2 e 5). Esses microfungos foram submetidos a um período de incubação e agitação suficiente para que produzissem no meio líquido, compostos químicos solúveis que inibiram o fungo mutualista.

Nos experimentos de co-cultivo foi demonstrado e discutido sobre a diminuição do diâmetro da colônia do fungo mutualista, devido a perda da pressão de turgor das células, causada pela ação de compostos tóxicos (ORTIZ; ORDUZ, 2000). Corroborando os resultados de Ortiz e Orduz (2000), os filtrados de *Trichoderma* e *Clonostachys* (= *Gliocladium*), inibiram significativamente o fungo mutualista, devido a presença de enzimas, metabólitos, antibióticos ou substâncias voláteis e não-voláteis nesses filtrados, que degradam a parede celular de *L. gongylophorus* FF2006.

Fungos do gênero *Trichoderma* podem ser considerados potenciais agentes de controle biológico, devido a sua alta capacidade de reprodução e habilidade de colonizar ambientes desfavoráveis. Estes fungos apresentam alta capacidade de obter ATP a partir do metabolismo de diferentes açúcares difundidos em vários substratos (BENÍTEZ et al., 2004). Além disso, estes fungos têm a capacidade de produzir enzimas líticas que funcionam como potenciais agentes de controle biológico, como as lipases, xilanases, mananases, pectinases, liases de pectina, amilases, fosfolipases, RNases e DNases, que apresentam atividade antifúngica contra uma variedade de micro-organismos (MONTE, 2001).

Segundo Strobel e Daisy (2003), fungos endofíticos tem a capacidade de produzir compostos bioativos, como antibióticos que inibem o crescimento de bactérias, fungos,

protozoários e vírus, combatendo diversas doenças. Estes autores demonstraram que *Cryptosporiopsis quercina* apresentou atividade antifúngica contra alguns patógenos como *Candida albicans* e *Trichophyton* spp. Os fungos endofíticos *Verticillium* sp. END61 e *Clonostachys* sp. END72, estudados nesse trabalho, apresentaram uma inibição significativa do fungo mutualista, indicando a produção destes compostos.

Buayairaksa et al. (2011), utilizando solventes orgânicos e métodos cromatográficos obtiveram o extrato bruto do fungo *S. racemosum*, que apresentou atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais. Neste trabalho, notável foi a inibição significativa causada pelo filtrado de *S. racemosum* A086b, indicando uma possível produção de metabólitos bioativos com atividade antifúngica.

As formigas cortadeiras são conhecidas por modificarem as propriedades químicas do solo adjacente aos seus ninhos. Essas alterações são proporcionadas por compostos químicos advindos das glândulas metapleurais ou mesmo de micro-organismos produtores de antibióticos que estão associados ao integumento das operárias (RODRIGUES et al., 2013). Os micro-organismos que permanecem no solo ao redor dos ninhos podem ser considerados antagonistas do fungo mutualista, pois esses fungos podem secretar compostos bioativos que inibem o crescimento de *L. gongylophorus*. Os resultados do presente trabalho corroboram as evidências levantadas por Pagnocca et al. (2012), de que microfungos de diferentes origens podem ser considerados oportunistas dos ninhos das formigas cortadeiras.

7 CONCLUSÕES

- O presente estudo demonstrou que o fungo mutualista de *A. sexdens rubropilosa* em cultura pura é suscetível a vários microfungos, independente da origem destes.
- O antagonismo dos microfungos frente ao fungo cultivado pelas formigas ocorre através de vários mecanismos, sendo a competição por nutrientes e a produção de compostos bioativos, dois exemplos observados no presente estudo.
- O presente estudo reforça resultados de outros trabalhos, no que tange o potencial dos fungos do gênero *Trichoderma* como antagonistas do fungo mutualista.

8 PERSPECTIVAS

O presente trabalho selecionou microfungos que apresentam capacidade de inibir o fungo mutualista das formigas cortadeiras. Os microfungos avaliados proporcionaram inibições tanto físicas, como químicas, indicando que o fungo mutualista é suscetível à diversos antagonistas que colonizam o jardim de fungo. Considerando o controle biorracional desses insetos pragas e tendo em vista a produção de compostos químicos pelos fungos avaliados, estes organismos podem, eventualmente, serem associados com doses sub-letais de inseticidas, constituindo uma estratégia para o emprego desses agentes no controle biológico das formigas.

REFERÊNCIAS

- ABRAMOFF, M.D.; MAGALHAES, P.J.; RAM, S.J. Image Processing with ImageJ. **Biophotonics International**, v. 11, p. 36-42, 2004.
- AYRES, M.; AYRES Jr, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. **BioEstat**: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá: MCT-CNPq, 2007. 364 p.
- BACCI JR., M.; RIBEIRO, S. B.; CASAROTTO, M. E. F.; PAGNOCCA, F. C. Biopolymer-degrading bacteria from nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 28, n. 1, p. 79-82, 1995.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A.M.; LIMÓN, M. C.; CODÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International microbiology**, Sevilla, v. 7, n. 4, p. 240-260, 2004.
- BRANDÃO, C. R. F.; MAYHE-NUNES, A. J.; SANHUDO, C. E. D. Taxonomia e filogenia das formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Ed. UFV, 2011. p. 27-48.
- BUAYAIRAKSA, M.; KANOKMEDHAKUL, S.; KANOKMEDHAKUL, K.; MOOSOPHON, P.; HAHNVAJANAWONG, C.; SOYTONG, K. Cytotoxic lasiodiplodin derivatives from the fungus *Syncephalastrum racemosum*. **Archives of pharmacal research**, Seoul, v. 34, n. 12, p. 2037-2041, 2011.
- CABEZAS, L.; CALDERON, C.; MEDINA, L. M.; BAHAMON, I.; CARDENAS, M.; BERNAL, A. J.; GONZALEZ, A.; RESTREPO, S. Characterization of cellulases of fungal endophytes isolated from *Espeletia* spp. **Journal of microbiology**, Gangnam-gu, v. 50, n. 6, p. 1009-1013, 2012.
- CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 96, n. 7, p. 7998-8002, 1999.
- CURRIE, C. R.; STUART, A. E. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. **The Royal Society**, London, v. 268, p. 1033-1039, 2001.
- 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.
- FISHER, P. J.; STRADLING, D. J.; PEGLER, D. N. Leaf cutting ants, their fungus gardens and the formation of basidiomata of *Leucoagaricus gongylophorus*. **Mycologist**, Cambridge, v. 8, n. 3, p. 128-131, 1994.
- FISHER, P. J.; STRADLING, D. J.; SUTTON, B. C.; PETRINI, L. E. Microfungi in the fungus gardens of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*: a preliminary study. **Mycological Research**, Cambridge, v. 100, n. 5, p. 541-546, 1996.

- FOLGARAIT, P. J.; MARFETÁN, J. A.; CAFARO, M. J. Growth and conidiation response of *Escovopsis weberi* (Ascomycota: Hypocreales) against the fungal cultivar of *Acromyrmex lundii* (Hymenoptera: Formicidae). **Environmental Entomology**, College Park, v. 40, n. 2, p. 342-349, 2011.
- HAIFIG, S. S. V. Natureza do parasitismo de *Escovopsis* e *Escovopsioides* sobre *Leucoagaricus gongylophorus*, fungos associados aos jardins de formigas cortadeiras. 2014. 59 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2014.
- MEHDIABADI, N. J.; SHULTZ, T.R. Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants. **Myrmecological News**, Vienna, v. 13, p. 37-55, 2010.
- MONTE, E. Understanding Trichoderma: between biotechnology and microbial ecology. **International Microbiology**, Salamanca, v. 4, n. 1, p. 1-4, 2001.
- MUELLER, U. G.; SHULTZ, T.R.; CURRIE, C. R.; ADAMS, R. M. M.; MALLOCH, D. The origin of the Attini ant-fungus mutualism. **The Quarterly Review of Biology**, v.76, n. 2, p. 169-197, 2001.
- MUELLER, U. G.; SCOTT, J. J.; ISHAK, H. D.; COOPER, M.; RODRIGUES, A. Monoculture of leafcutter ant gardens. **Plos One**, San Francisco, v. 5, n. 9, p. 1-7, 2010.
- ORTIZ, A.; ORDUZ, S. *In vitro* evaluation of *Trichoderma* and *Gliocladium* antagonism against the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. **Mycopathologia**, Netherlands, v. 150, p. 53-60, 2000.
- PAGNOCCA, F. C.; RODRIGUES, A.; BACCI, JR. Microrganismos associados às formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Ed. UFV, 2011. p. 262-283.
- PAGNOCCA, F. C.; MASIULIONIS, V. E.; RODRIGUES, A. Specialized fungal parasites and opportunistic fungi in gardens of attine ants. **Psyche**, New York, v. 12, p. 1-9, 2012.
- POULSEN, M.; BOOMSMA, J.J. Mutualistic fungi control crop diversity in fungus-growing ants. **Science**, Cambridge, v. 307, p. 741-744, 2005.
- 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, p. 955-959, 2004.
- RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI, M. Jr.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PFENNING, L. H. Variability of non-mutualistic filamentous fungi associated with *Atta sexdens rubropilosa* nests. **Folia Microbiologica**, Praga, v. 50, p. 421-425, 2005a.
- RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; PFENNING, L. H.; BACCI, M. Jr. Assessment of microfungi in fungus gardens free of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, Chico, v. 46, n. 2, 2005b.
- RODRIGUES, A.; BACCI, M. Jr.; MUELLER, U. G.; ORTIZ, A.; PAGNOCCA, F. C. Microfungal “weeds” in the leafcutter ant symbiosis. **Microbial Ecology**, Washington, v. 56, p. 604-614, 2008a.

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

RODRIGUES, A.; MUELLER, U. G.; ISHAK, H. D.; BACCI, M. Jr.; PAGNOCCA, F. C. Ecology of microfungal communities in gardens of fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae): a year-long survey of three species of attine ants in Central Texas. **FEMS Microbiology Ecology**, Hoboken, p. 244-255, 2011.

RODRIGUES, A.; PASSARINI, M. R. Z.; FERRO, M.; NAGAMOTO, N. S.; FORTI, L. C.; BACCI, M. Jr.; SETTE, L. D.; PAGNOCCA, F. C. Fungal communities in the garden chamber soils of leaf-cutting ants. **Journal of Basic Microbiology**, 2013, no prelo.

RODRIGUEZ, R. J.; WHITE, J. F. Jr.; ARNOLD, A. E.; REDMAN, R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, Malden, v. 182, n. 2, p. 314-330, 2008.

SHOENIAN, I.; SPITELLER, M.; GHASTE, M.; WIRTH, R.; HERZ, H.; SPITELLER, D. Chemical basis of the synergism and antagonism in microbial communities in the nests of leaf-cutting ants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 108, n. 5, p. 1955-1960, 2011.

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

SILVA, A.; BACCI, M. Jr.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. Production of polysaccharidases in different carbon sources by *Leucoagaricus gongylophorus* Moller (Singer), the symbiotic fungus of leaf-cutting ant *Atta sexdens* Linnaeus. **Current Microbiology**, New York, v. 53, n. 1, p. 68-71, 2006a.

SILVA, A.; BACCI, M. Jr.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. Starch metabolism in *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. **Microbiological Research**, Jena, v. 161, n. 4, p. 299-303, 2006b.

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

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

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

SOSA-CALVO, J.; SHULTZ, T. R.; BRANDÃO, C. R. F.; KLINGENBERG, C.; FEITOSA, R. M.; RABELING, C.; BACCI, M. Jr.; LOPES, C. T.; VASCONCELOS, H. L. *Cyatta abscondita*: taxonomy, evolution, and natural history of a new fungus-farming ant genus from Brazil. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 11, p. 1-20, 2013.

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.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Bozeman, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

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. **Proceeding of the Royal Society of London, Series B**, London, v. 274, n. 1621, p. 1971-1978, 2007.

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

WANG, Y.; DAI, C. Endophytes: a potential resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation. **Annals of Microbiology**, New York, v. 61, n. 2, p. 207-215, 2010.

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

Rio Claro, 4 de julho de 2014

Isabela Calegari Moia – Discente

Prof. Dr. André Rodrigues - Orientador