

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 22/08/2018.

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

**Fungos isolados de ninhos iniciais da formiga *Atta sexdens rubropilosa*:
análise do potencial para biocontrole de formigas-cortadeiras**

DAIANE RAQUEL POLEZEL

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

Janeiro - 2017

DAIANE RAQUEL POLEZEL

Fungos isolados de ninhos iniciais da formiga *Atta sexdens rubropilosa*: análise do potencial para biocontrole de formigas-cortadeiras

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

Orientador: Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca

Rio Claro

2017

595.796 Polezel, Daiane Raquel

P765f Fungos isolados de ninhos iniciais da formiga *Atta sexdens rubropilosa* : análise do potencial para biocontrole de formigas-cortadeiras / Daiane Raquel Polezel. - Rio Claro, 2017

66 f. : il., figs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Fernando Carlos Pagnocca

1. Formiga. 2. Controle biológico. 3. *Leucoagaricus gongylophorus*. 4. *Trichoderma*. 5. Compostos orgânicos voláteis. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

campus de Rio Claro



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Fungos isolados de ninhos iniciais da formiga *Atta sexdens rubropilosa*: análise do potencial para biocontrole de formigas cortadeiras

AUTORA: DAIANE RAQUEL POLEZEL

ORIENTADOR: FERNANDO CARLOS PAGNOCCA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. **FERNAN L**
CEIS / 18-Rio Claro

Prof. Dr. **JOES** DE ALMEIDA
Laboratório de Controle Biológico / Instituto Biológico

Prof. Dr. ODAIR CORREA BUENO
CEIS / IB-Rio Claro

Rio Claro, 22 de fevereiro de 2017

Aos meus pais, José Augusto e Zélia, por serem grandes exemplos em minha vida.

Dedico.

Agradecimentos

Difícil iniciar aos agradecimentos, mas ao mesmo tempo é algo muito bom, pois escrever essas palavras demonstra que concluí mais uma etapa. Desde os árduos estudos para o processo seletivo, até a escrita dessa dissertação, foram vários dias difíceis, e a presença de inúmeras pessoas teve fundamental importância, desde os pensamentos positivos até as contribuições para que esse trabalho fosse realmente concluído.

De início, agradeço a Deus e à Nossa Senhora Aparecida, que sempre iluminam meus passos, me abençoam e me dão fé e perseverança para que eu alcance e concretize meus objetivos.

Ao meu pai José, minha mãe Zélia e ao meu irmão Danilo. Nenhuma palavra é capaz de realmente expressar minha gratidão por tudo o que me ensinaram, pelo amor compartilhado, pelo exemplo inefável que vocês são em minha vida. Tudo o que nós já passamos foram obstáculos que só conseguimos enfrentar pois temos uns aos outros. Só peço a Deus que nos ilumine e nos dê muita saúde! Eu amo vocês incondicionalmente e serei eternamente grata a Deus por tê-los em minha vida.

Agradeço imensamente meu orientador e também amigo Fernando Carlos Pagnocca, pela confiança, paciência, atenção. Tudo o que me passou, desde 2012, quando iniciei em seu laboratório, teve grandiosa contribuição para a minha formação na graduação e agora, durante o mestrado. Com certeza eu tive um grande orientador e aqui deixo o meu mais sincero agradecimento por todo o apoio dado a mim e também à minha família.

À Maria Carolina Canali. Foram 6 anos de convivência diária, desde o início da graduação, passando pelo estágio, TCC, prova do mestrado, e por fim a escrita e defesa da minha dissertação, que também é sua! Muito obrigada, minha amiga! Pelo apoio, pelas vezes que você esteve presente por mim, pelos dias de choros e sorrisos (e muitos sorrisos), estudos e descansos, por ser quem você é e pela amizade grandiosa que construímos! Serei eternamente grata por Deus ter colocado você junto a mim nessa caminhada tornando tudo mais leve e alegre!

Às minhas amigas, Daniela Tura e Weilan Paixão. Não tenho palavras para expressar o meu carinho por vocês! Muito obrigada pela amizade que, com certeza, levarei para sempre comigo.

À minha avó Raquel, pelas orações e por sempre me incentivar nos estudos. Agradeço imensamente por ainda ter a oportunidade de abraçá-la em mais esse momento da minha vida. E aos meus avós: Arcanjo, Alvira e Antonio (*in memoriam*); tenho certeza que intercederam por mim e estão orgulhosos por mais esse degrau que eu subi em minha vida. Vocês sempre serão meu exemplo de garra e coragem.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia: à Dra. Virgínia, que ofereceu grandiosa colaboração para o desenvolvimento desse trabalho, e também à Dra. Ana Paula, agradeço imensamente.

Ao CEIS, pelo suporte oferecido ao longo desses anos: Necis, por sempre estar disposta em ajudar, às meninas do Laboratório de Formigas: Thais, Nathália e Bianca, pela paciência ao ensinar a cuidar das formigas. Ao Sergio Kakazu, por realizar o sequenciamento das amostras. Ao Prof. Odair, pelas idéias oferecidas e pelo suporte dado ao longo desse trabalho. Ao Prof. Andre Rodrigues e todo o pessoal do LESF, Danilo Polezel, Quimi, Lorena, Tássio, por sempre estarem dispostos a ajudarem. Ao pessoal do Depto de Bioquímica, pela amizade construída que certamente levarei comigo. Ao Adriano Uemura, pela sua paciência e tempo dispensado, principalmente quando o assunto era o GC-MS, agradeço imensamente.

Ao CNPq pelo financiamento deste trabalho.

Enfim, a todos que de uma forma ou outra, contribuíram com alguma peça para o desenvolvimento desse trabalho, meu sincero agradecimento!

“No man is an island, entire of itself; every man is a piece of the continent, a part of the main.”

John Donne

RESUMO

Os gêneros de formigas-cortadeiras, *Atta* e *Acromyrmex*, mantêm uma associação mutualística com o basidiomiceto *Leucoagaricus gongylophorus*, o qual é responsável pela produção de enzimas que degradam o material vegetal transportado para o interior dos ninhos. As formigas-cortadeiras são consideradas pragas devido a enorme quantidade de material vegetal que é cortada, principalmente em ambientes alterados por atividades antrópicas, como os locais de agricultura e reflorestamento. Devido à necessidade de manejo das formigas-cortadeiras, o controle biológico representa um método promissor e ambientalmente amigável. Nesse contexto, devido a íntima relação entre as formigas e o fungo mutualista, é de grande importância selecionar linhagens de fungos filamentosos que possam interferir negativamente sobre o jardim de fungos. No presente trabalho isolamos fungos filamentosos contaminantes de colônias iniciais da formiga *Atta sexdens rubropilosa*. Após o isolamento e identificação foram realizados testes para avaliar o crescimento desses fungos utilizando o jardim de fungos como substrato, e também as linhagens consideradas melhores nesse aspecto foram testadas em colônias completas. A combinação de dois fungos (*Trichoderma harzianum* e *Trichoderma virens*) mostrou-se promissora para prosseguimento nos testes e futuro uso no controle biológico. Adicionalmente, foi avaliada a secreção de compostos orgânicos voláteis através de análises GC/MS de três linhagens de fungos filamentosos após sete dias de crescimento em culturas individuais e também frente ao fungo mutualista. Ainda, utilizando a microscopia eletrônica de varredura, avaliamos como ocorre a interação do fungo *R. variabilis* frente ao fungo mutualista, demonstrando que o fungo *R. variabilis* possui caráter micoparasita ao interagir com o fungo mutualista.

Palavras-chave: Controle biológico. Formigas-cortadeiras. Compostos orgânicos voláteis. *Leucoagaricus gongylophorus*. *Trichoderma*.

ABSTRACT

The leaf-cutting ants, *Atta* and *Acromyrmex*, maintain a mutualistic association with the basidiomycete *Leucoagaricus gongylophorus*, which is responsible for the production of enzymes that degrade the plant material transported to the interior of the nests. The leaf-cutting ants are considered pests due to an enormous amount of plant material they cut, mainly at areas altered by anthropic activities, such as agricultural and reforestation sites. Due to the need for management of the leaf cutting ants, biological control represents a promising and environmentally friendly method. In this context, due to the close relationship between ants and mutual fungi, it is of great importance to select strains of filamentous fungi that negatively impact the fungus garden. Thus, in the present study, we evaluated lineages of filamentous fungi isolated from the initial colonies of *Atta sexdens rubropilosa*. After isolation and identification of the contaminants filamentous fungi, assays were carried out in order to determine the fungal growth of the most suitable lineages on the fungus garden of the lab colonies. The combination of two fungi (*Trichoderma harzianum* and *Trichoderma virens*) was promising for the development of methods aiming at the biological control of leaf-cutting ants. Additionally, the production of volatile organic compounds was evaluated by the GC / MS analysis of three of the filamentous fungal strains after 7 days of growth in individual cultures, and also in the presence of the mutualistic fungus. Images of scanning electron microscopy were taken during the co-culture assays.

Key-words: Biological control. Volatile Organic Compounds. *Atta*. *Leucoagarycus gongylophorus*. *Trichoderma*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 Formigas da tribo Attini e o cultivo de fungos.....	12
2.2 Fungos parasitas associados às formigas-cortadeiras e ao fungo mutualista.....	13
2.3 Formigas-cortadeiras e seu controle	14
2.4 Metabólitos secundários	15
2.5 Estudos antecedentes produção de VOC's.....	16
3 CAPÍTULO 1 - Potencial dos fungos filamentosos para o biocontrole da formiga <i>Atta sexdens rubropilosa</i>.....	17
Resumo.....	18
3.1 Introdução.....	19
3.2 Objetivos.....	20
3.3 Material e Métodos.....	21
3.3.1 Isolamento, cultivo e preservação dos fungos.....	21
3.3.2 Cultivo direto no jardim de fungo.....	21
3.3.3 Teste de patogenicidade em sub-colônias de <i>A. sexdens rubropilosa</i>	22
3.3.4 Teste de patogenicidade em sub-colônias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> utilizando mix de fungos.....	22
3.3.5. Teste de patogenicidade em colônias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> utilizando mix de fungos.....	23
3.3.6 Teste de patogenicidade em colônias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> utilizando mix de fungos: técnica de polvilhamento.....	23
3.3.7 Teste de patogenicidade em colônias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> utilizando mix de fungos: técnica de nebulização.....	24
3.3.8 Viabilidade dos esporos.....	24
3.3.9 Caracterização polifásica dos isolados de fungos filamentosos.....	24
3.3.10. Marcadores morfológicos.....	24

3.3.11. Marcadores moleculares: Extração de DNA, Amplificação e Sequenciamento.....	25
3.4 Resultados.....	25
3.4.1 Identificação dos isolados	25
3.4.2 Cultivo direto no jardim de fungo.....	27
3.4.3 Teste de patogenicidade em subcolônias de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	28
3.4.4 Teste de patogenicidade em sub-colônias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> utilizando consórcio de fungos	29
3.4.5 Teste de patogenicidade em colônias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> utilizando consórcio de fungos.....	31
3.4.6. Teste de patogenicidade em colônias de <i>A. sexdes rubropilosa</i> utilizando mix de fungos: técnica de polvilhamento.....	31
3.4.7. Teste de patogenicidade em colônias de <i>A. sexdens rubropilosa</i> utilizando mix de fungos: técnica de nebulização.....	32
3.5 Discussão.....	33
3.6 Conclusão.....	34

4 CAPÍTULO 2 – Ação dos fungos filamentosos frente ao fungo mutualista *L.*

<i>gongylophorus</i>	35
Resumo.....	36
4.1 Introdução.....	37
4.2 Objetivos.....	38
4.3 Material e Métodos.....	39
4.3.1 Produção de Compostos Orgânicos Voláteis.....	39
4.3.2 Estudo das interações físicas entre <i>Rhizomucor variabilis</i> e o fungo mutualista <i>L. gongylophorus</i> por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	39
4.4 Resultados.....	41
4.4.1 Compostos Orgânicos Voláteis	41
4.4.1.1 Composição dos VOC's produzidos pelo co-cultivo de <i>L. gongylophorus</i> (FF2006) com <i>T. harzianum</i> (A215-2).....	43
4.4.1.2 Composição dos VOC's produzidos pelo co-cultivo de <i>T. virens</i> e <i>L. gongylophorus</i> (FF2006).....	44
4.4.1.3 Composição dos VOC's pelo co-cultivo de <i>R. variabilis</i> e <i>L. gonylophorus</i>	45

4.4.1.4 Composição dos VOC's produzidos pelo co-cultivo de <i>T. harzianum</i> (A215-2); <i>T. virens</i> (A174-1) e <i>L. gongylophorus</i> (FF2006).....	46
4.4.2 Estudo das interações físicas entre <i>Rhizomucor variabilis</i> e o fungo mutualista <i>L. gongylophorus</i> por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	49
4.5 Discussão.....	52
4.6 Conclusão.....	51
REFERÊNCIAS.....	55
ANEXO.....	64

1. Introdução

As formigas-cortadeiras, gêneros *Acromyrmex* e *Atta*, possuem uma relação mutualística com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* e o cultivam no interior de suas colônias sobre vegetação recém-cortada (CURRIE et al., 1999, HINKLE et al., 1994, MUELLER et al., 1998; SCHULTZ; BRADY, 2008). O controle dessas formigas faz-se necessário devido à intensa desfolha realizada em locais de agricultura e reflorestamento (CHERRETT, 1986; FOWLER et al., 1989). Atualmente, os métodos mais utilizados de controle dessas formigas envolvem produtos químicos. Contudo, esses compostos contaminam o meio ambiente por não serem biodegradáveis e acumulam-se na cadeia alimentar, atingindo assim organismos não alvo (BOARETTO; FORTI, 1997; OLIVEIRA et al., 2011).

O fungo mutualista das formigas-cortadeiras pode ser o alvo para o método de biocontrole, e alguns estudos realizados em condições de laboratório já demonstraram a ação deletéria de fungos micoparasitas, tais como os dos gêneros *Acremonium*, *Trichoderma*, *Escovopsis*, *Mucor* e *Syncephalastrum* sobre o jardim de fungos (SILVA et al., 2006; BARCOTO et al., 2016; FOLGARAIT et al., 2011).

Compostos orgânicos voláteis secretados por esses micro-organismos também podem representar uma fonte potencial de compostos promissores ao biocontrole, pois tais compostos podem possuir caráter antifúngico e também inseticida (HEIL, 2008; STENBERG et al., 2015; KANDASAMY et al., 2016; MITHÖFER et al., 2016; WERNER et al., 2016). Contudo, este é um campo de investigação pouco explorado (PIECHULLA; DEGENHARDT, 2014).

O presente trabalho teve como objetivo estudar os fungos filamentosos isolados como contaminantes de ninhos iniciais de formigas-cortadeiras visando a seleção de linhagens com potencial para o desenvolvimento de métodos de controle biológico dessas formigas-cortadeiras, avaliando a interação dos mesmos junto ao fungo mutualista *L. gongylophorus*.

A primeira parte do trabalho apresenta uma revisão sobre os aspectos básicos da associação mutualística entre formigas e fungo, além das pesquisas envolvendo o biocontrole das formigas-cortadeiras.

O Capítulo 1 teve como objetivo selecionar as linhagens que interagissem negativamente com o fungo mutualista das colônias de *Atta sexdens rubropilosa*, sendo estas as mais promissoras aos métodos de biocontrole. No capítulo 2, os estudos prosseguiram com as linhagens que foram selecionadas no Capítulo 1, verificando a interação destas com o fungo mutualista por meio da produção de compostos orgânicos voláteis. Ainda, foram realizados

estudos de microscopia eletrônica de varredura para avaliar como se dá a interação entre o fungo filamentoso *Rhizomucor variabilis* e o mutualista *L. gongylophorus*.

4.6. Conclusão

Os fungos filamentosos *T. harzianum*, *T. virens* e *R. variabilis*, selecionados no Capítulo 1 como patógenos potenciais ao fungo mutualista, são promissores para o desenvolvimento de métodos visando ao controle biológico das formigas-cortadeiras e os estudos devem avançar no sentido de promover a utilização destes em escala de campo.

Ainda, o presente trabalho mostrou a produção de diversos compostos voláteis por estes fungos, como Oxime-methoxy-phenyl (OMP), 1-octen-3-ol e β -Myrcene que podem ter diversas aplicações, seja na indústria farmacêutica, para a produção de antifúngicos, antimicrobianos, bem como na área agrícola, sendo que alguns dos compostos podem ter aplicação para o controle de nematóides. A produção de compostos voláteis de caráter antifúngico pelas linhagens de *Trichoderma* evidencia a potencialidade dos mesmos contra o fungo mutualista *L. gongylophorus*. No entanto, o estudo dos VOC's ainda está no início e, não apenas as propriedades biológicas, como vários desses compostos, ainda permanecem desconhecidos.

REFERÊNCIAS

- ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, 1998. 424 p.
- ANKE, T.; KUPKA, J.; SCHRAMM, G.; STEGLICH, W. Antibiotics from basidiomycetes X. *Scorodonin*, a new antibacterial and antifungal metabolite from *Marasmius scorodonius* (Fr.) Fr. **J Antibiotics**.;v. 33, p.463-467, 1980.
- AYLARD, F. O; BURNUM, K.E.; SCOTT, J.J.; SUEN,G. TRINGE,S.G.; ADAMS,S.M; BARRY,K.W.; NICORA,C.D.; NPIEHOWSKI,P.; PURVINE,S.O.; STARRETT,G.J.; GOODWIN,L.A.; SMITH,R.D.; LINPTON,M.S.; CURRIE,C.C. Metagenomic and metaproteomic insights into bacterial communities in leaf-cutter ant fungus gardens. **ISME J**, New York, v.6, p1688-1701, 2012.
- BARCOTO, M. O. **Patogenicidade de *Syncephalastrum racemosum* nos jardins de formigas-cortadeiras**. 2015. 87 f Trabalho de Conclusão de Curso – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo.
- BARCOTO, M. O.; PEDROSA, F.; BUENO, O. C.; RODRIGUES, A. Pathogenic nature of *Syncephalastrum* in *Atta sexdens rubropilosa* fungus gardens. **Pest Management Science**, 2016. doi: 10.1002/ps.4416
- BÉLANGER, R. R. et al. Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: indirect evidence for sequential role of antibiosis and parasitism. **Biocontrol Science and Technology**, v. 5, n. 1, p. 41-54, 1995.
- BARNETT, H. L.; BINDER, F. L. The fungal host-parasite relationship. **Annu. Rev. Phytopathol.**, Palo Ato, v. 11, p. 273-292, 1973.
- BASS, M.; CHERRETT, J. M. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **Physiological Entomology**, v. 20, n. 1, p. 1-6, 1995.
- BOARETTO, M. A. C.; FORTI, L. C. Perspectivas no controle de formigas-cortadeiras. **Série técnica IPEF**, v. 11, n. 30, p. 31-46, 1997.
- BRODHUN, Florian; FEUSSNER, Ivo. Oxylipins in fungi. **FEBS journal**, v. 278, n. 7, p. 1047-1063, 2011.
- BRUCE, A.; AUSTIN, W. J.; KING, B. Control of growth of *Lentinus lepideus* by volatiles from *Trichoderma*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 82, n. 3, p. 423-428, 1984.
- BULL, A. T. Inhibition of polysaccharases by melanin: enzyme inhibition in relation to mycolysis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 137, n. 2, p. 345-356, 1970.

BUTT, Tariq M.; JACKSON, Chris; MAGAN, Naresh **Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential.** London: CAB International, 2001.

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

CHERRY, A.J.; LOMER, C.J.; DJEGUI, D.; SCHULTHESS, F. Pathogen incidence and their potential as microbial control agents in IPM of maize stem borers in West Africa. **Biocontrol**, v. 44, n. 3, p. 301-327, 1999.

CHO, J. A., CHANG, H. J., LEE, S.-K., KIM, H.-J., HWANG, J.-K., CHUN, H. S. AMELIORATION of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by oral administration of β -caryophyllene, a sesquiterpene. **Life sciences**, v. 80, n. 10, p. 932-939, 2007.

COMBET E, HENDERSON J, EASTWOOD DC, BURTON KS. Eight carbon volatiles in mushrooms and fungi: properties, analysis, and biosynthesis. **Mycoscience**, v. 47, n. 6, p. 317-326, 2006.

CURRIE, C .R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 14, p. 7998-8002, 1999.

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

DELLA LUCIA, T.; GANDRA, L. C.; GUEDES, R. N. C. Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. **Pest management science**, v. 70, n. 1, p. 14-23, 2014.

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

DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. **Compendium of Soil Fungi.** Vols 1 e 2. Academic Press, London 1980.

EFFMERT, U.; KALDERÁS, J.; WARNKE, R.; PIECHULLA, B. Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. **Journal of Chemical Ecology**, v. 38, p. 665-703, 2012.

EVANS, B.; ROBINSON, S.; KELLEHER, N. Surveys of non-ribosomal peptide and polyketide assembly lines in fungi and prospects for their analysis in vitro and in vivo. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 48, n. 1, p. 49-61, 2011.

FABRE, C. E.; BLANC, P. J.; GOMA, G. Production of 2-Phenylethyl Alcohol by *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology progress**, v. 14, n. 2, p. 270-274, 1998.

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 primary study. **Mycological Research**, v. 100, n. 5, p. 541–546, 1996.

FLINT, H. M.; SALTER, S. S.; WALTERS, S. Caryophyllene: an attractant for the green lacewing. **Environmental Entomology**, v. 8, n. 6, p. 1123-1125, 1979.

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

FOWLER, H. G.; PAGANI, M. I.; SILVA, O. A.; FORTI, L.C.; SILVA, V. P.; VASCONCELOS, H. L.; A pest is a pest is a pest? The dilemma of Neotropical leaf-cutting ants: keystone taxa of natural ecosystems. **Environmental Management**, v. 13, n. 6, p. 671-675, 1989.

FRIES, N. Effects of volatile organic compounds on the growth and development of fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, v.60, p. 1-21, 1973

GARBEVA, P., HORDIJK, C., GERARDS, S., BOER, W.. Volatile-mediated interactions between phylogenetically different soil bacteria. **Front. Microbiol.** v. 5; 289p. 2014

GARG, S. K.; JAIN, A. Fermentative production of 2, 3-butanediol: a review. **Bioresource Technology**, v. 51, n. 2, p. 103-109, 1995.

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

GHELARDINI, C., GALEOTTI, N., DI CESARE, M. -L., MAZZANTI, G., BARTOLINI, A. GHELARDINI, C. Local anaesthetic activity of β -caryophyllene. **Il Farmaco**, v. 56, n. 5, p. 387-389, 2001.

GHISALBERTI, E. L.; SIVASITHAMPARAM, K. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. **Soil biology & Biochemistry**, v. 23, n. 11, p. 1011–1020, 1991.

GODOY, G. et al. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 37, n. 3, p. 179-191, 1990

GUEDES, A. F. A.; ATTILI-ANGELIS, D.; PAGNOCCA, F. C. Selective isolation of dematiaceous fungi from the workers of *Atta laevigata* (Formicidae: Attini). **Folia Microbiologica**, Praha, v. 57, n. 1, p. 21-26, 2012.

GUIMARÃES, L. G.. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 42, n. 2, p. 464-472, 2011.

HAIFIG, S. S. V. Natureza do parasitismo de *Escovopsis* e *Escovopsioides* sobre *Leucoagaricus gongylophorus*, fungos associados aos jardins de formigas-cortadeiras.

2014. Dissertação. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo.

HAJEK, A. E.; ST. LEGER, R. J. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. **Annual review of entomology**, v. 39, n. 1, p. 293-322, 1994.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 41, [s.n.], p. 95-98, 1999.

HARINI, Salakatte Thammaiah et al. Synthesis, antioxidant and antimicrobial activity of novel vanillin derived piperidin-4-one oxime esters: preponderant role of the phenyl ester substituents on the piperidin-4-one oxime core. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 22, n. 24, p. 7588-7592, 2012.

HEFETZ, A.; BATRA, SUZANNE WT. Geranyl acetate and 2-decen-1-ol in the cephalic secretion of the solitary wasp *Sceliphron caementarium* (Sphecidae; Hymenoptera). **Experientia**, v. 35, n. 9, p. 1138-1139, 1979.

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

HERVEY, A.; ROBERSON, C. T.; LEONG, I. Studies on fungi cultivated by ants. **Brittonia**, New York, v. 29, p. 226-236, 1977.

HOFFMANN, K. . The family structure of the Mucorales: a synoptic revision based on comprehensive multigene-genealogies. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 30, n. 1, p. 57-76, 2013.

INAMDAR AA, HOSSAIN MM, BERNSTEIN A, MILLER GE, RICHARDSON JR, BENNETT JW. Fungal-derived semiochemical 1-octen-3-ol disrupts dopamine packaging and causes neurodegeneration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 48, p. 19561-19566, 2013.

HÖLLDOBLER, B. & E. WILSON. **The Ants**. Cambridge: Belknap Press of Harvard University Press, 1990. 732p.

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

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

KANDASAMY, D.; GERSHENZON, J.; HAMMERBACHER, A. Volatile organic compounds emitted by fungal associates of conifer bark beetles and their potential in bark beetle control. **Journal of Chemical Ecology**, v. 42, n. 9, p. 952-969, 2016.

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

KIM, J., SEO, S. M., LEE, S. G., SHIN, S. C., PARK, I. K. Nematicidal activity of plant essential oils and components from coriander (*Coriandrum sativum*), oriental sweetgum (*Liquidambar orientalis*), and valerian (*Valeriana wallichii*) essential oils against pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 16, p. 7316-7320, 2008.

KUBO, I., CHAUDHURI, S. K., KUBO, Y., SANCHEZ, Y., OGURA, T., SAITO, T. ISHIKAWA. Cytotoxic and antioxidative sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*. **Planta Medica**, v. 62, n. 05, p. 427-430, 1996.

LITTLE, A. E.; CURRIE, C. R. Symbiotic complexity: discovery of a fifth symbiont in the attine-microbe symbiosis. **Biology Letters**, London, v. 3, n. 5, p. 501-504, 2007.

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

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

MENDES, T.D.; RODRIGUES, A.; DAYO-OWOYEMI, I.; MARSON, F. A. L.; Maffei, M.E., Gertsch, J., and Appendino, G. (2011). Plant volatiles: production, function and pharmacology. **Nat. Prod. Rep.** 28, 1359–1380. doi: 10.1039/c1np00021g

PAGNOCCA, F.C. Generation of nutrients and detoxification: possible roles of yeasts in leaf-cutting ant nests. **Insects**. v. 3, n.1, p. 228-245, 2012.

MEYLING, N. V.; LUBECK, M.; BUCKLEY, E. P.; EILENBERG, J.; REHNER S. A. Community composition, host range and genetic structure of the fungal entomopathogen *Beauveria* in adjoining agricultural and seminatural habitats. **Molecular Ecology**, v. 18, n. 6, p. 1282-1293, 2009.

MOLLER, E. M.; BAHNWEG, G.; SANDERMANN, H.; GEIGER, H.H. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 20, n. 22, p. 6115-6116, 1992.

MORATH, S. U.; HUNG, R.; BENNETT, J. W. Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. **Fungal Biology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 73-83, 2012.

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

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

MURAHASHI, S. Über die riechstoffe des matsutake. **Sci Pap Inst Phys Chem Res** v 34, [s.n], p155–172, 1938.

NAIR, M. K. M. et al. Antibacterial effect of caprylic acid and monocaprylin on major bacterial mastitis pathogens. **Journal of dairy science**, v. 88, n. 10, p. 3488-3495, 2005.

NEMCOVIC M, JAKUBIKOVA L, VIDEN I, FARKAS V. Induction of conidiation by endogenous volatile compounds in *Trichoderma* spp. **FEMS Microbiology Letters**, v. 284, n. 2, p. 231-236, 2008.

NORRMAN, J. Production of volatile organic compounds by the yeast fungus *Dipodascus aggregatus*. **Archiv für Mikrobiologie**, v. 68, n. 2, p. 133-149, 1969.

OGUNLESI, M.; OKIEI, W.; OSIBOTE, E. A.. Analysis of the essential oil from the leaves of *Sesamum radiatum*, a potential medication for male infertility factor, by gas chromatography-mass spectrometry. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 7, p. 1060-1067, 2010.

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

OKULL, D. O.; BEELMAN, R. B.; GOURAMA, H.. Antifungal activity of 10-oxo-trans-8-decenoic acid and 1-octen-3-ol against *Penicillium expansum* in potato dextrose agar medium. **Journal of food protection**, v. 66, n. 8, p. 1503-1505, 2003.

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

PAGANS, E.; FONT, X.; SÁNCHEZ, A.. Emission of volatile organic compounds from composting of different solid wastes: abatement by biofiltration. **Journal of hazardous materials**, v. 131, n. 1, p. 179-186, 2006.

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

PICHETTE, A., LAROUCHE, P.-L. LEBRUN, M., LEGAULT, J. Composition and antibacterial activity of *Abies balsamea* essential oil. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 5, p. 371-373, 2006.

POTTER, T. L. Essential oil composition of cilantro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 7, p. 1824-1826, 1996.

- 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**, New York, v. 96, n. 5, 955-959, 2004.
- ROBINSON, P. M.; PARK, D. Volatile inhibitors of spore germination produced by fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 49, p. 639-649, 1966.
- RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O.C.; PFENNING, L.H.; BACCI Jr., M. Assessment of microfungi in fungus gardens free of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 46, n. 2, p. 329-334, 2005.
- RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F.C.; BACCI Jr., M.; HEBLING, M.J.A.; BUENO, O.C.; PFENNING, L.H. Variability of non-mutualistic filamentous fungus associated with *Atta sexdens rubropilosa* Nests. 32 **Folia Microbiologica**, v. 50, n. 5, p. 421-425, 2005.
- ROZE, L. V.; BEAUDRY, R. M.; LINZ, J. E. Analysis of volatile compounds emitted by filamentous fungi using solid-phase microextraction-gas chromatography/mass spectrometry. In: KELLER, N. P.; TURNER, G. (Eds.). **Fungal secondary metabolism: methods and protocols**. Humana Press, 2012. p. 113- 142.
- STROBEL, G. A.; DIRKSE, E.; SEARS, J.; MARKWORTH, C. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus* a novel endophytic fungus. **Microbiology**, Reading, v. 147, p. 2943-2950, 2001.
- STROBEL, G. A.; SINGH, S. K.; RIYAZ-UI-HASSAN, S.; MITCHELL, A. M.; GEARY, B.; SEARS, J. An endophytic/pathogenic *Phoma* sp. from creosote bush producing biologically active volatile compounds having fuel potential. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 320, p. 87-94, 2011.
- SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. **Mycological Research**, v. 100, n. 8, p. 923-935, 1996.
- SANTOS, A. V.; DE OLIVEIRA, B. L.; SAMUELS, R. I.. Selection of entomopathogenic fungi for use in combination with sub-lethal doses of imidacloprid: perspectives for the control of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). **Mycopathologia**, v. 163, n. 4, p. 233-240, 2007.
- SCHMID-HEMPEL, P.. Parasites in social insects – monographs in behavior and ecology. **Princeton University Press**, 409 p. 1998
- SCHULTZ, T.R.; BRADY, S.G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America**, Washington, v.105, n.14, p.5435-5441, 2008.
- SILVA, A.; BACCI, M. Jr.; SIQUEIRA, C.G.; BUENO, O.C.; PAGNOCCA, F.C.; HEBLING, M.J.A. Survival of *Atta sexdens* workers on a different food sources. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 49. n.4, p. 307-313, 2003.

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

SINGH, G., MARIMUTHU, P., DE HELUANI, C. S., CATALAN, C. A. Antioxidant and biocidal activities of *Carum nigrum* (seed) essential oil, oleoresin, and their selected components. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 1, p. 174-181, 2006.

SOLOMON, S. E.; BACCI, M. Jr.; MARTINS, J. Jr.; VINHA, G. G.; MUELLER, U. G. Paleodistributions and comparative molecular phylogeography of leaf-cutter ants (*Atta* sp.) provide new insight into the origins of amazonian diversity. **PLoS One**, California, v. 3, n.7, e. 2738, 2008.

SUNG, G.H.; HYWEL-JONES, N.L.; SUNG, J.M.; LUANGSA-ARD, J.J.; SHRESTHA, B.; SPATAFORA, J.W. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. **Studies in Mycology**, v. 57, n.1, p.5-59, 2007.

STENBERG, J. A.; HEIL, M.; ÅHMAN, I.; BJÖRKMAN, C. Optimizing Crops for Biocontrol of Pests and. **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 11, p. 699, 2015.

ST. LEGER R. J. Studies on adaptations of *Metarhizium anisopliae* to life in the soil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, n. 3, p. 271–276, 2008.

STROBEL, Gary. Harnessing endophytes for industrial microbiology. **Current opinion in microbiology**, v. 9, n. 3, p. 240-244, 2006.

SYLVESTRE, M., LEGAULT, J., DUFOUR, D., PICHETTE, A. Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L. **Phytomedicine**, v. 12, n. 4, p. 299-304, 2005.

SYLVESTRE, M., PICHETTE, A., LONGTIN, A., LEGAULT, J. Composition and cytotoxic activity of the leaf essential oil of *Comptonia peregrina* (L.) Coulter. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 6, p. 536-540, 2007.

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.

THOLL, D., BOLAND, W., HANSEL, A., LORETO, F., RÖSE, U. S., SCHNITZLER, J. P. Practical approaches to plant volatile analysis. **The Plant Journal**, v. 45, n. 4, p. 540-560, 2006.

WANG, Y.; MUELLER, U G.; CLARDY, J. Antifungal diketopiperazines from symbiotic fungus of fungus-growing ant *Cyphomyrmex minutes*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, n. 4, p. 935-941, 1999.

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

WERNER, S.; POLLE, A.; BRINKMANN, N. Belowground communication: impacts of volatile organic compounds (VOCs) from soil fungi on other soil-inhabiting organisms. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 20, p. 8651-8665, 2016

WHEATLEY, R.; HACKETT, C.; BRUCE, A.; KUNDZEWICZ, A. Effect of substrate composition on production of volatile organic compounds from *Trichoderma* spp. inhibitory to wood decay fungi. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 39, n. 2, p. 199-205, 1997.

WHITE, N. A.; BODDY, L. Extracellular enzyme localization during interspecific fungal interactions. **FEMS Microbiology Letters**, v. 98, n. 1-3, p. 75-79, 1992.

XUE H, LU C, LIANG L, SHEN Y. Secondary Metabolites of *Aspergillus* sp. CM9a, an Endophytic Fungus of *Cephalotaxus mannii*. **Records of Natural Products**, v. 6, n. 1, p. 28, 2012.

ZHENG, G.Q.; KENNEY, P. M.; LAM, LUKE K.T. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. **Journal of natural products**, v. 55, n. 7, p. 999-1003, 1992.