



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

JULIO FLAVIO OSTI

**EVIDÊNCIAS EXPERIMENTAIS SUGEREM O GÊNERO *ESCOVOPSIOIDES* COMO
PARASITA DO FUNGO CULTIVADO PELAS FORMIGAS ATÍNEAS**

Rio Claro
2016

JULIO FLAVIO OSTI

**EVIDÊNCIAS EXPERIMENTAIS SUGEREM O GÊNERO *ESCOVOPSIODES* COMO
PARASITA DO FUNGO CULTIVADO PELAS FORMIGAS ATÍNEAS**

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

Orientador: Prof. Dr. André Rodrigues

**Rio Claro
2016**

576
O85e

Osti, Julio Flavio

Evidencias experimentais sugerem o gênero
Escovopsioides como parasita do fungo cultivado pelas
formigas atíneas / Julio Flavio Osti. - Rio Claro, 2016
37 f. : il., figs., gráfs., tabs.

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

1. Micro-organismos. 2. Ecologia microbiana. 3.
Hypocreales. 4. Micoparasitismo. 5. Formigas Attini. 6.
Biocontrole. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EVIDÊNCIAS EXPERIMENTAIS REFORÇAM O GÊNERO ESCOVOPSIODES COMO PARASITA DO FUNGO CULTIVADO PELAS FORMIGAS ATÍNEAS

AUTOR: JULIO FLAVIO OSTI

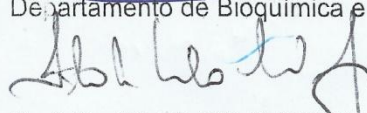
ORIENTADOR: ANDRE RODRIGUES

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



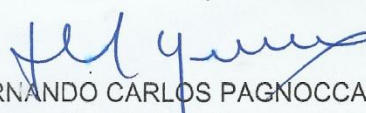
Prof. Dr. ANDRE RODRIGUES

Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro



Prof. Dr. ITALO DELALIBERA JÚNIOR

Departamento de Entomologia e Acarologia / Universidade de São Paulo



Prof. Dr. FERNANDO CARLOS PAGNOCCA

Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro

Rio Claro, 26 de abril de 2016

TÍTULO ALTERADO PARA: EVIDÊNCIAS EXPERIMENTAIS SUGEREM O GÊNERO ESCOVOPSIODES COMO PARASITA DO FUNGO CULTIVADO PELAS FORMIGAS ATÍNEAS

Dedico este trabalho aos meus pais, pelo apoio incondicional.

Agradecimentos

Agradeço ao professor André Rodrigues, por não ter me abandonado no início, me indicando uma oportunidade de emprego como técnico no LAMAI. Agradeço também, por ter me oferecido um bom projeto para eu desenvolver, bem como por toda sua dedicação e empenho como orientador.

À professora Lara Durães Sette por ter me dado a oportunidade de trabalhar como técnico em seu laboratório.

Ao pessoal do LAMAI Pedro, Alexandre e Gabi, Juzinha. Foram pessoas legais, que possibilitou um ambiente de trabalho muito agradável.

A minha chefe Ju, que é uma pessoa muito querida. Toda sua paciência, compreensão e boa-fé, que foram essenciais no meu aprendizado de toda parte básica do trabalho de bancada.

Aos colegas do LESF, que me ensinaram todos os protocolos básicos de bancada, bem como dicas importantes para o êxito da dissertação. Em especial a Mariana, por ter me ensinado bastante no trabalho com formigas, que foi importante na segunda metade do trabalho.

Ao professor Odair Bueno e suas técnicas, que sempre estiveram a disposição, mesmo em dias não usuais. Também agradeço ao professor Maurício Bacci e seu estudante, Sérgio Kakazu, por oferecerem o acesso e execução dos meus sequenciamentos.

Agradeço ao professor Fernando Pagnocca, por ter me dado completo acesso ao seu laboratório durante os experimentos de jardins de fungo com presença de formigas.

Ao programa de pós-graduação, que oferece um sistema de seleção para o mestrado bastante acessível. Agradeço também à Capes por ter financiado a minha bolsa.

Aos meus pais por todo apoio, inclusive em Rio Claro. Agradeço também minhas irmãs, por toda amizade que elas me oferecem.

Ao Ivo, por toda sua amizade, sua lealdade e atenção, que se mostram resistentes ao tempo e à longa distância.

Sumário

Resumo	8
Abstract	9
Introdução	10
Material e Métodos.....	11
<i>Origem e manutenção dos fungos.....</i>	<i>11</i>
<i>Caracterização molecular de Escovopsioides</i>	<i>12</i>
<i>Análises filogenéticas.....</i>	<i>13</i>
<i>Bioensaios de inibição (co-cultivo)</i>	<i>14</i>
<i>Análise dos dados dos experimentos de co-cultivo.....</i>	<i>15</i>
<i>Bioensaios com fragmentos de jardim de fungo na ausência de operárias</i>	<i>15</i>
<i>Bioensaios com fragmentos de jardim de fungo na presença das operárias</i>	<i>16</i>
Resultados.....	17
<i>Filogenia do fungo Escovopsioides</i>	<i>17</i>
<i>Bioensaios in vitro de antagonismo</i>	<i>18</i>
<i>Bioensaios com fragmentos de jardim de fungo na ausência das operárias.....</i>	<i>18</i>
<i>Bioensaios de fragmentos de jardim de fungo na presença das operárias</i>	<i>19</i>
Discussão.....	20
Considerações.....	24
Referências	24
Legenda das Figuras.....	29
Tabelas.....	30
Figuras	32
Material Suplementar	36

EVIDÊNCIAS EXPERIMENTAIS SUGEREM O GÊNERO *ESCOVOPSIODES* COMO PARASITA DO FUNGO CULTIVADO PELAS FORMIGAS ATÍNEAS

Julio Flavio Osti¹, André Rodrigues^{1,2*}

¹Departamento de Bioquímica e Microbiologia, UNESP- Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, Brasil.

²Centro de Estudos de Insetos Sociais, UNESP- Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, Brasil.

* Autor correspondente:

andrer@rc.unesp.br

Universidade Estadual Paulista, UNESP, Departamento de Bioquímica e Microbiologia
Avenida 24-A, n.1515, Bela Vista, Rio Claro, SP, CEP:13.506-900

Tel: +55 19 3526-4364 e Fax: +55 19 3526-4176

Resumo

Os jardins de fungo das formigas da tribo Attini abrigam uma microbiota diversa, além do fungo mutualista cultivado como alimento por esses insetos. Fungos do gênero *Escovopsioides* foram recentemente descritos como membros dessa microbiota. Relacionado filogeneticamente com os fungos parasitas *Escovopsis*, nada se sabe sobre a biologia e o potencial parasita de *Escovopsioides* nos jardins de fungo das formigas atíneas. Neste contexto, acessamos a diversidade genética de 21 isolados de *Escovopsioides* obtidos de colônias de formigas cortadeiras (gêneros *Atta* e *Acromyrmex*) e não cortadeiras (gêneros *Trachymyrmex* e *Apterostigma*), provenientes de diferentes regiões do Brasil. Independente da origem dos isolados, foi observada uma baixa diversidade genética entre 20 dos 21 isolados de *Escovopsioides* examinados, o que permitiu identifica-los como *Escovopsioides nivea* (a única espécie descrita para o gênero). Em contrapartida, o isolado obtido da colônia de *Apterostigma megacephala* apresentou baixa similaridade genética em relação à *E. nivea*, o que aponta para uma nova espécie filogenética. Segundo os marcadores moleculares *tef1* e ITS, *Escovopsioides* ocupa uma posição intermediária na filogenia de *Escovopsis*, o que sugere a possível reclassificação do gênero *Escovopsioides* como *Escovopsis*. Adicionalmente, nosso estudo confirmou o antagonismo de *Escovopsioides* frente ao fungo mutualista de formigas cortadeiras (*Leucoagaricus gongylophorus*). Esse resultado sugere que *Escovopsioides* seja um micoparasita do fungo cultivado pelas formigas. Baseado em dados de crescimento de *Escovopsioides* em jardim de fungo, tanto na ausência, quanto na presença de operárias podemos apontar fortes evidências do parasitismo de *Escovopsioides* frente ao jardim de fungo das formigas atíneas.

Palavras-chaves: Hypocreales. *Escovopsis*. Micoparasitismo. Formigas Attini. Biocontrole.

Abstract

Fungus gardens of attine ants harbor a rich microbiome, besides the mutualistic fungus cultivated by these insects for food. Fungi in the genus *Escovopsioides* were recently described as members of this microbiome. Closely related to the parasitic fungal genus *Escovopsis*, nothing is known about the biology and the parasitic potential of *Escovopsioides* in the fungus gardens of attine ants. In this sense, we accessed the genetic diversity of 21 *Escovopsioides* isolates obtained from leaf-cutting ants (*Atta* and *Acromyrmex* genera) and no leaf cutting ant colonies (*Trachymyrmex* and *Apterostigma* genera), originated from distinct regions of Brazil. Independent of the origin of the isolate, we observed a low genetic diversity among 20 out of 21 isolates, which prompted the identification of these isolates as *Escovopsioides nivea* (the only described species for the genus). In contrast, the isolate obtained from the colony of *Apterostigma megacephala* showed low genetic similarity in relation with *E. nivea*, indicating a new phylogenetic species. According to the *tef1* and ITS molecular markers, *Escovopsioides* exhibit an intermediate placement in the *Escovopsis* phylogeny, suggesting the putative reclassification of the genus *Escovopsioides* as *Escovopsis*. In addition, our study confirmed the antagonism of *Escovopsioides* towards the mutualistic fungus of leaf cutting ants (*Leucoagaricus gongylophorus*). This indicate that *Escovopsioides* is a mycoparasite of the ant fungal cultivar. Based in growth experiments of *Escovopsioides* in the fungus gardens, in the absence and in the presence of ant workers, we provide strong evidences of *Escovopsioides* parasitism in the fungus gardens of attini ants.

Keywords: Hypocreales. *Escovopsis*. Mycoparasitism. Attine ants. Biocontrol

Introdução

As formigas cultivadoras de fungos da tribo Attini são encontradas somente no continente americano (MAYHÉ-NUNES; JAFFÉ, 1998). Esses insetos se destacam pela habilidade de cultivar fungos como a principal fonte de alimento (WEBER, 1972). As formigas cortadeiras dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta*, popularmente conhecidas como quenquês e saúvas, compreendem um subgrupo das formigas atíneas. Elas apresentam como característica distintiva a utilização de folhas e flores frescas como substrato para o cultivo do fungo mutualista, *Leucoagaricus gongylophorus* (Basidiomycota: Agaricales). O parceiro fúngico, por sua vez, é cultivado pelas operárias em uma estrutura denominada de jardim de fungo, que compreende fragmentos do substrato vegetal processado pelas formigas e o micélio do fungo mutualista (WEBER, 1972; MUELLER et al., 2010). Devido à elevada quantidade de folhas que as formigas cortadeiras utilizam, esses insetos são considerados pragas agrícolas, ocasionando sérios prejuízos na agricultura, especialmente à de nosso país (DELLA LUCIA et al., 2014).

Ao contrário do proposto por Weber (1972), o fungo mutualista não é o único micro-organismo ativo no jardim de fungo. Na realidade uma diversa e rica comunidade microbiana constituída de bactérias, leveduras e fungos filamentosos também faz parte dos jardins de fungo (MÖLLER, 1893; CRAVEN et al., 1970; BACCI et al., 1995). Alguns desses micro-organismos podem competir por nutrientes com o fungo mutualista (SILVA et al., 2006); outros, parasitam o próprio fungo cultivado pelas formigas (REYNOLDS, CURRIE, 2004). Existem também aqueles micro-organismos benéficos nos jardins de fungo, os quais auxiliam o fungo mutualista na proteção frente a patógenos (SANTOS et al., 2004; RODRIGUES et al., 2009). Além disso, existem bactérias filamentosas do gênero *Pseudonocardia*, presentes nas cutículas das operárias, que também auxiliam na proteção da colônia frente a micro-organismos invasores (CURRIE et al., 1999a; SEN et al., 2009; MEIRELLES et al., 2014).

Currie e colaboradores (1999b) observaram que fungos do gênero *Escovopsis* (Ascomycota: Hypocreales) ocasionam um impacto negativo nas colônias das formigas atíneas, pois atuam como uma parasita no jardim de fungo. Tal descoberta se mostrou relevante, uma vez que não havia relatos de parasitas nos jardins desses insetos. É sabido que o parasitismo de *Escovopsis* é dá-se por mecanismos químicos e físicos, com estruturas especializadas para atuar nas hifas do hospedeiro (REYNOLDS, CURRIE, 2004; MARFETÁN et al., 2015).

Estudos sugerem que *Escovopsis* compartilha uma antiga história evolutiva com o fungo mutualista e as formigas, indicando que a origem do parasitismo ocorreu concomitante com início da associação formiga-fungo, há cerca de 50-65 milhões de anos (CURRIE et al., 2003; SCHULTZ; BRADY, 2008). Gerardo e colaboradores (2006) propuseram uma classificação

informal de diferentes tipos morfológicos de *Escovopsis*. Esta se baseia na coloração dos esporos, que em massa, produzem uma coloração típica da colônia. Tal marcador morfológico separa *Escovopsis* pertencentes aos diferentes clados filogenéticos (GERARDO et al., 2006). Assim, os autores descrevem *Escovopsis* com esporulação marrom, amarela, branca e rosa.

Recentemente, Augustin e colaboradores (2013) descreveram um segundo gênero de fungo (*Escovopsioides*) provenientes de jardins de *Acromyrmex niger*, *Acromyrmex subterraneus molestans* e *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. Esse fungo foi encontrado em 24% a 72% das colônias de atíneas amostradas (AUGUSTIN et al. 2013; REIS et al. 2015; PEREIRA et al. 2016). Tal fungo apresenta características morfológicas semelhantes aos fungos do gênero *Escovopsis* (Figura S1). Análises moleculares realizadas pelos autores comprovaram que *Escovopsioides* é um gênero filogeneticamente relacionado à *Escovopsis*.

A descoberta de *Escovopsioides* lançou novas janelas de pesquisas sobre a associação formiga – fungo mutualista. Primeiro, nada se conhece a respeito da diversidade e taxonomia de *Escovopsioides*. Até o momento, apenas uma espécie (*E. nivea*) foi descrita, porém, é provável que existam outras espécies desse gênero ainda desconhecidas para a ciência. Segundo, estudos de taxonomia e sistemática também são incipientes no que tange à classificação desse grupo. Terceiro, se *Escovopsioides* é um parasita do fungo mutualista, então novas oportunidades se abrirão para estudar a dinâmica da evolução (especificidade e virulência) de patógenos associados aos jardins das formigas atíneas.

Com a disponibilidade de vários isolados de *Escovopsioides* obtidos de diferentes formigas atíneas (gêneros *Atta*, *Acromyrmex*, *Trachymyrmex* e *Apterostigma*), o presente trabalho avaliou as seguintes questões: (i) Tendo em vista que o gênero *Escovopsioides* foi descrito de jardins de *Acromyrmex*, isolados desse fungo que infectam outros gêneros de atíneas formam um clado monofilético? (ii) Qual é a relação filogenética de *Escovopsioides* e *Escovopsis*? e (iii) *Escovopsioides* seria um parasita do jardim de fungo das formigas atíneas?

Material e Métodos

Origem e manutenção dos fungos

Fungos do gênero *Escovopsioides* foram obtidos de diferentes espécies de formigas cortadeiras em estudos prévios (RODRIGUES et al., 2005; 2008; PEREIRA, 2014; REIS et al., 2015). A coleção de *Escovopsioides* utilizada neste estudo compreende 20 isolados obtidos nesses estudos, além da espécie tipo utilizada na descrição do gênero (Tabela 1). Portanto, foram examinados 21 isolados, todos preservados em glicerol 10% à -80 °C e em ágar inclinado à 10 °C.

Os isolados estão mantidos no acervo da Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP), Rio Claro, SP. Neste estudo, também foi utilizado um isolado de *Escovopsis* (originado de jardim de fungo de *Atta sextens rubropilosa*), o qual foi empregado nos bioensaios *in vitro*.

Para a reativação dos isolados, os esporos armazenados à -80 °C foram transferidos dos tubos de criopreservação para o meio ágar batata-dextrose (BDA) e mantidos à 25 °C, durante sete dias, no escuro. Após incubação, a viabilidade das culturas foi verificada, bem como as características morfológicas microscópicas (conidióforos e esporos). Em seguida, todos os isolados foram submetidos à técnica de cultura monospórica para garantir a pureza dos fungos.

Caracterização molecular de Escovopsioides

O DNA genômico dos isolados foi extraído pelo método CTAB (cetiltrimetil brometo de amônio), modificado de Moller et al. (1992) e Gerardo et al. (2004). A principal modificação realizada nesses protocolos foi a utilização de micro-esferas de vidro (250-400 µm, Sigma) para quebra mecânica das hifas. As regiões alvos avaliadas do genoma desses fungos e amplificadas foram: o gene que codifica o fator alfa de alongação (*tef1*, *primers*: EF6-20F e EF6A-1000R) e o espaçador interno transcrito (ITS, *primers*: ITS5 e ITS4). Para *tef1*, alíquotas de 1 µL do DNA bruto diluído (1:100) foram utilizadas como DNA molde para amplificação utilizando *PureTaq Ready-To-Go* (GE Healthcare), com as seguintes condições: etapa inicial de desnaturação de 94 °C por 2 minutos, seguidos de 15 ciclos de 94 °C por 30 segundos e temperatura de anelamento inicial de 65 °C decrescente de 1 °C por ciclo (*touchdown*) e extensão final de 72 °C por 1 minuto. Uma segunda etapa foi executada com as seguintes condições: 94 °C por 30 segundos, seguidos de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 48 °C por 30 segundos e uma etapa final de extensão a 72 °C por 1 minuto. Já para a amplificação da região ITS, alíquotas de 2 µL do DNA bruto diluído (1:100) foram utilizadas como DNA molde para PCR, seguindo as seguintes condições: 94 °C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto e um passo final de extensão a 72 °C por 2 minutos. Os produtos de PCR foram corados com *GelRed™* (Biotium) e visualizados em UV após eletroforese em gel de agarose (1%).

Os *amplicons* foram purificados com o *Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega) seguindo o protocolo do fabricante. Para quantificar e verificar o grau de pureza dos *amplicons*, as amostras foram analisadas em *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific). As reações de sequenciamento foram preparadas utilizando *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Life Technologies), seguindo as instruções do fabricante. Para obtenção de sequências ITS foi adicionado 5% de DMSO na reação de sequenciamento, devido ao elevado conteúdo de CG

existente nessa região. As sequências foram geradas no sequenciador automático ABI 3500 (Life Technologies).

As sequências *forward* e *reverse* foram reunidas em sequências consenso (*contigs*) utilizando o software BioEdit v.7.1.3 (HALL, 1999). Em seguida, para avaliar a identidade das sequências, os *contigs* foram utilizados em buscas por sequências homólogas disponíveis na base de dados do NCBI-GenBank, através do aplicativo BLASTn (ZHANG et al., 2000).

Análises filogenéticas

Além das sequências *tef1* geradas no presente estudo (20 sequências), outras sequências foram obtidas do NCBI-GenBank, sendo uma sequência da espécie tipo de *Escovopsioides*, 44 sequências de *Escovopsis* e mais três sequências de fungos pertencentes à família Hypocreaceae, como grupo externo, conforme designado por Meirelles et al. (2015a). Para ITS, além das sequências geradas neste estudo (19 sequências), foram obtidas do NCBI-GenBank, uma sequência da espécie tipo, sete sequências de todas espécies tipo descritas de *Escovopsis* e mais quatro sequências de fungos pertencentes à família Hypocreaceae, como grupo externo, conforme designado por Meirelles et al. (2015a). O conjunto de sequências ITS é menor do que o conjunto de sequências do marcador *tef1*, pois não há muitas sequências desta região disponíveis na base de dados para *Escovopsis*, inviabilizando uma filogenia mais ampla com este marcador. Por fim, o conjunto total (alinhamento) reuniu 68 sequências *tef1* e 30 sequências ITS.

Para as análises filogenéticas, as sequências foram alinhadas utilizando o software MAFFT (KATO; STANDLEY, 2013). Inicialmente, os grupos filogenéticos de *Escovopsioides* foram inferidos utilizando o método de *neighbor-joining* (SAITOU; NEI, 1987). A árvore filogenética foi inferida utilizando o modelo de substituição nucleotídica de Kimura 2-parâmetros, para sequências de *tef1* (KIMURA, 1980) e *gaps* foram excluídos da análise. O suporte dos clados foi calculado através do método de *bootstrap* (utilizando 1.000 pseudoréplicas). Tal análise foi realizada no software MEGA6 (TAMURA et al., 2013).

Após explorar o conjunto de dados, utilizamos análise Bayesiana como método de análise filogenética mais robusto para inferir as relações de *Escovopsis* e *Escovopsioides* com o marcador *tef1*. O modelo de substituição nucleotídica foi escolhido com o software jModeltest 2, utilizando o suporte de *Bayesian Information Criterion* (BIC) com intervalo de confiança de 95% (DARRIBA et al., 2012). A análise Bayesiana foi realizada utilizando o software MrBayes v. 3.2.1 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003). Foi utilizado o modelo de substituição nucleotídica GTR+I+G, com três cadeias quentes e uma fria, cada execução utilizando o método de Monte Carlo via cadeias de Markov (MCMC) com amostragem de 1 milhão de gerações. A convergência

ocorreu quando o desvio padrão das frequências divididas ficou abaixo de 0,01; as primeiras 25% de gerações produzidas por MCMC foram descartadas como *burn-in*. Sequências de *tef1*, obtidas no GenBank de *Hypocrea lutea*, *Trichoderma* sp. e *Hypomyces poliporinus* foram utilizadas como grupo externo. A árvore final foi editada no programa FigTree v1.4.0 e no Adobe Illustrator CS6.

Adicionalmente, foi realizada a análise Bayesiana das sequências concatenadas de *tef1* e ITS, apenas com as espécies formalmente descritas de *Escovopsis* e a única espécie descrita de *Escovopsioides* (*E. nivea*), uma vez que não há no GenBank sequências ITS disponíveis de todos os *Escovopsis* para os quais foram sequenciados *tef1*. As sequências foram concatenadas utilizando o *software* Winclada v.1.00.08. A análise particionada do conjunto de dados foi realizada no MrBayes utilizando o modelo de substituição GTR+G para cada partição, com o mesmo número de gerações, número de cadeias e *burn-in*. Foram selecionadas sequências de *Hypocrea rufa*, *Trichoderma viride*, *T. pubescens* e *T. hamatum* como grupo externo para a análise concatenada.

Bioensaios de inibição (co-cultivo)

Para responder à pergunta sobre o potencial antagônico de *Escovopsioides* frente ao fungo cultivado pelas formigas atíneas, ensaios *in vitro* foram realizados para avaliar a atividade antifúngica, seguindo uma adaptação do método proposto por Silva et al. (2006). Foram selecionados 13 isolados de *Escovopsioides*, baseados na origem do isolado (Tabela 1) e nos polimorfismos do gene *tef1* após análise.

O fungo mutualista de *Atta sexdens rubropilosa* (*L. gongylophorus* FF2006) foi previamente cultivado em meio BDA e incubado à 25 °C, durante 14 dias, no escuro. Discos de micélio (8 mm de diâmetro) do fungo mutualista foram inoculados a uma distância de 1,5 cm da borda de placas de Petri (90 x 15 mm) contendo meio BDA. Essas placas foram incubadas nas mesmas condições. Um disco de micélio (8 mm de diâmetro) de uma cultura de *Escovopsioides*, previamente incubada em meio BDA, foi inoculado a uma distância de 3 cm do disco do fungo mutualista. As placas controles foram inoculadas com o mesmo fungo mutualista utilizado nas placas com os testes de inibição, entretanto, nenhum isolado de *Escovopsioides* foi inoculado. As placas contendo os dois fungos foram incubadas durante 14 dias à 25 °C, no escuro. Adicionalmente foi utilizado um isolado de *Escovopsis* originado de *Atta sexdens rubropilosa* para propósitos de comparação.

Foram realizadas seis réplicas biológicas para cada combinação *Escovopsioides*, *Escovopsis* e fungo mutualista. As placas experimentais e as do controle foram digitalizadas nos intervalos de 0, 2, 3, 5, 7, 10 e 14 dias em *scanner* HP. As imagens digitalizadas foram analisadas

em relação a área de crescimento da colônia (mm^2) do fungo mutualista, utilizando o programa ImageJ v. 1.38 (RASBAND, 2014).

Análise dos dados dos experimentos de co-cultivo

A área de crescimento micelial de *L. gongylophorus* frente aos fungos filamentosos e em relação ao controle foi analisada utilizando ANOVA dois fatores. Os dados foram checados quanto à normalidade e a homogeneidade de variância, utilizando os testes de Kolmogorov-Smirnov e de Bartlett, respectivamente. Devido à violação desses critérios, os dados foram transformados utilizando a função da raiz quadrada do arco-seno. Para propósitos de comparação entre os isolados, as áreas de crescimento micelial de *L. gongylophorus* em confronto com os fungos filamentosos foram divididas pela média da área de seu controle correspondente. As comparações entre os diferentes tratamentos foram realizadas utilizando o teste de Tukey-HSD. As análises estatísticas foram realizadas no programa R (versão 2.12.1, The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2011).

Bioensaios com fragmentos de jardim de fungo na ausência de operárias

Para determinar se *Escovopsioides* pode se desenvolver no jardim de fungo na ausência de operárias, realizamos bioensaios utilizando fragmentos desse substrato. Foram obtidas alíquotas de jardim de fungo de uma colônia saudável de *A. sexdens rubropilosa* mantida à 18 anos no laboratório do Centro de Insetos Sociais da UNESP (CEIS/UNESP/Rio Claro).

Todas as formigas e crias do jardim de fungo foram removidas, dos quais fragmentos de 2 cm^3 foram alocados em placas de Petri esterilizadas e com algodão umedecido nas bordas, de modo a manter o ambiente úmido. As placas com jardim de fungo foram acondicionadas durante 1 dia em BOD, em temperatura constante de 25 °C, de modo a evidenciar eventuais formigas que permaneceram no fragmento.

Uma suspensão de 10 mL de Tween 80 a 0,05% com massa micelial e esporos dos potenciais fungos parasitas foi agitada em vortex de modo a liberar os esporos. Tal suspensão foi filtrada duas a três vezes seguindo método relatado por Newmeyer (1990), para separar os esporos dos fragmentos de hifas presentes na suspensão. Essa suspensão foi diluída de modo a se obter entre 1.10^5 e 2.10^5 esporos mL^{-1} , contados em câmara de Neubauer. Alíquotas de 100 μL de suspensão de esporos foram gotejadas com micropipeta por toda superfície do fragmento de jardim; no controle negativo foi adicionado a mesma quantidade de uma solução esterilizada de Tween 80 a 0,05%. As placas de Petri com jardim de fungo foram acondicionadas em temperatura

de 25 °C por um período de 10 dias. O possível desenvolvimento das hifas, bem como esporulação dos fungos inoculados foi observado diariamente em estereomicroscópio.

Os dados de crescimento e esporulação foram convertidos utilizando um sistema de pontuação (escore): sem crescimento (0 pontos), crescimento observado no estereomicroscópio (1 ponto), crescimento macroscópico (2 pontos) e esporulação (3 pontos), ao longo do monitoramento durante 10 dias (Figura S2). A soma total das pontuações de cinco réplicas biológicas, em cada dia foi obtida. As amostras foram comparadas nos dia 0, 5 e 10, utilizando o Teste Exato de Fisher, realizado no *software* R.

Bioensaios com fragmentos de jardim de fungo na presença das operárias

Este bioensaio foi adaptado seguindo o método empregado por Wallace et al. (2014). Foram utilizadas embalagens plásticas com o fundo recoberto por gesso, para manter a umidade interna, evitando a dessecação do jardim de fungo. A superfície interna da embalagem foi revestida com teflon, de modo a impedir a fuga das formigas. Cerca de 20 cm³ de jardim de fungo proveniente da mesma colônia utilizada no experimento anterior foram alocados nas embalagens plásticas. A seleção de formigas nos fragmentos de jardim foi baseada na distribuição do trabalho nas colônias de *A. sexdens* proposto por Wilson (1980). Formigas com diâmetro da cápsula cefálica maior que 1,6 mm foram excluídas. Formigas com diâmetro da cápsula cefálica entre 1,0 e 1,6 mm foram contadas, com 50 formigas redistribuídas nos fragmentos de jardim. Formigas com menos de 1 mm de diâmetro de cápsula cefálica não foram contadas. Esse procedimento foi adotado de modo a possibilitar uma maior homogeneidade entre as diferentes réplicas biológicas, bem como entre os diferentes tratamentos com os fungos. As embalagens foram incubadas à 25 °C durante três dias, para estabilização dos jardins de fungo. Suspensões de esporos dos fungos alvo foram obtidas conforme mencionado no item anterior. Foi inoculado 1mL de suspensão de esporos, borrifando a suspensão por toda a superfície do jardim de fungo com auxílio de um borrifador. No controle negativo, foi borrifada solução de Tween 80 0,05% esterilizada.

Os experimentos foram monitorados após 0, 5 e 10 dias de inoculação para checagem da saúde dos jardins de fungo. Esse parâmetro foi baseado em um sistema de pontuação (escore), no qual jardins saudáveis receberam 0 pontos, jardins parcialmente degradados receberam 1 ponto e jardins completamente degradados receberam 2 pontos (Figura S4). A soma das pontuações obtidas das cinco réplicas biológicas de cada experimento, nos três dias observados, foram comparadas através do Teste Exato de Fisher, no *software* R.

De modo a verificar a permanência dos fungos inoculados nos jardins, nos dias 0, 5 e 10 após o tratamento, fragmentos foram removidos dos jardins de fungo e inoculados em placas de

Petri com Ágar Malte 2% suplementado com $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cloranfenicol. As placas foram incubadas à 25°C , durante sete dias. Foram utilizadas cinco placas para cada réplica biológica dos experimentos, totalizando 25 placas por tratamento. As placas com crescimento positivo foram contadas e a capacidade de fixação dos fungos nos jardins foi testada utilizando o Teste Exato de Fisher.

Resultados

Filogenia do fungo Escovopsioides

As análises filogenéticas utilizando as sequências de *Escovopsioides* e *Escovopsis* mostraram-se coerentes tanto utilizando o marcador *tef1*, quanto utilizando os marcadores *tef1* e ITS concatenados. Um clado monofilético coeso que agrupa todas as linhagens de *Escovopsioides* foi observado em ambas as análises, sendo que os valores de probabilidade posterior (PP) foram de 0,96 e 1,00 para as filogenias de *tef1* e concatenada, respectivamente (Figuras 1 e S3). O clado *Escovopsioides* é composto por duas ramificações: a primeira compreende a espécie tipo, *E. nivea* CBS 135749^T e isolados oriundos das atíneas derivadas: *Atta*, *Acromyrmex* e *Trachymyrmex*; já a outra ramificação inclui somente o isolado de *Escovopsioides* LESF 602 oriundo de *Apterostigma megacephala* (Figuras 1 e S3).

Uma baixa variação genética entre os isolados de *Escovopsioides* de atíneas derivadas foi observada (99,1 a 100% de similaridade). Interessante foi notar que a similaridade genética do marcador *tef1* independe da região geográfica, pois isolados de *Escovopsioides* obtidos de colônias separadas por grandes distâncias, como Rio Grande do Sul e Bahia, são similares. A baixa variação genética também foi observada no marcador ITS entre esses isolados (99,4 a 100% de similaridade). Por outro lado, o isolado LESF 602 apresentou similaridade entre 90% e 91% em relação aos demais isolados, considerando o marcador *tef1*, e 91% a 92% para ITS. A posição desse isolado na filogenia indica uma espécie filogenética ainda não descrita (Figura 1).

O clado *Escovopsioides* está situado entre os clados de *Escovopsis* que infectam as atíneas derivadas e basais (Figura 1 e S3). O posicionamento basal do clado *Escovopsioides* em relação aos isolados de *Escovopsis* oriundos de colônias de formigas atíneas derivadas e de *Apterostigma* sp. (*Escovopsis* com esporulação marrom) se mostrou bastante consistente na filogenia reconstruída com *tef1*, com valor de PP de 0,99 (Figura 1). Entretanto, quando realizamos a filogenia concatenada dos marcadores *tef1* e ITS, observamos que o clado *Escovopsioides* se agrupa com *Escovopsis* isolados de colônias de atíneas basais (Figura S3). Assim, independente

do marcador está claro o posicionamento de *Escovopsioides* junto ao grupo monofilético de *Escovopsis*.

Bioensaios in vitro de antagonismo

Todos os fungos avaliados (*Escovopsioides* e *Escovopsis*) inibiram significativamente o crescimento micelial de *L. gongylophorus* FF2006 após 14 dias de experimento (ANOVA 2 fatores, $F = 72,074$, $p < 0,001$, Figura 2).

A maioria dos isolados de *Escovopsioides* inibiu o crescimento do fungo mutualista no intervalo entre o 5º e 7º dia. Com exceção dos isolados LESF 602, LESF 591 e LESF 596, os demais inibiram significativamente o fungo mutualista neste intervalo do experimento (Tukey-HSD, $p < 0,05$). Já no 10º dia, os isolados LESF 591 e LESF 596 inibiram significativamente o fungo mutualista (Tukey-HSD, $p < 0,01$). A inibição do fungo mutualista pelo isolado LESF 602 somente foi observada no 14º dia de experimento (Tukey-HSD, $p < 0,001$). Por outro lado, inibição significativa do crescimento micelial de *L. gongylophorus* por *Escovopsis* foi observada no 3º dia de experimento (Tukey-HSD, $p < 0,05$). Todos os isolados de *Escovopsioides* começaram a inibir significativamente *L. gongylophorus* quando ocorreu o contato entre as colônias dos dois fungos, sendo que o fungo mutualista geralmente adquiriu uma coloração marrom.

Após 14 dias de experimento foi observado dois grupos de isolados de *Escovopsioides* em relação à inibição do fungo mutualista (Figura 2). Os isolados LESF 596 e LESF 602, obtidos de *Acromyrmex* sp. e *A. megacephala*, respectivamente, compreendem um agrupamento de fungos que inibiram significativamente o crescimento do fungo mutualista, porém em menor intensidade quando comparado aos demais isolados (Tukey-HSD, $p < 0,002$, Figura 2).

Escovopsis apresentou inibição semelhante aquela demonstrada pelos isolados LESF 151, LESF 510, LESF 590 e LESF 595 após 14 dias de experimento (Tukey-HSD, $p > 0,05$, Figura 2). Os demais isolados de *Escovopsioides* inibiram o fungo mutualista em menor intensidade que *Escovopsis* (Tukey-HSD, $p < 0,05$, Figura 2), porém com maior intensidade que os isolados LESF 596 e LESF 602.

Bioensaios com fragmentos de jardim de fungo na ausência das operárias

O objetivo deste bioensaio foi avaliar se os fungos alvo em potencial tinham capacidade de se nutrir dos recursos do jardim de fungo e competirem com o fungo mutualista na ausência das formigas. Os fungos foram comparados em relação ao desenvolvimento nos dias 0, 5 e 10 após inoculação no jardim de fungo. No geral, não foram observadas diferenças significativas em

relação ao desenvolvimento entre os fungos analisados. No dia 5, o isolado LESF 602 foi o único para o qual não observamos crescimento (Figura 3). Considerando os demais fungos no dia 5, não houveram diferenças significativas de crescimento entre os isolados (Teste Exato de Fisher, $p > 0,05$, Figura 3). Já no dia 10, 13 isolados apresentaram esporulação, completando seu ciclo de desenvolvimento, sendo que apenas o isolado LESF 594 se diferenciou significativamente dos demais por não esporular (Teste Exato de Fisher, $p < 0,05$). Além disso, não observamos o crescimento do isolado LESF 602 no jardim após 10 dias de inoculação, indicando uma possível falta de competitividade deste fungo no jardim de fungo (Figuras 3 e Figura S2).

Bioensaios de fragmentos de jardim de fungo na presença das operárias

Este experimento foi conduzido com o propósito de avaliar o efeito da inoculação de esporos de *Escovopsioides* em um contexto mais completo, com a ação protetora das formigas. Os fungos inoculados nos jardins apresentaram basicamente três efeitos:

1. As operárias removeram parcialmente ou completamente os isolados *Escovopsioides* LESF 596, LESF 599 e LESF 602 dos jardins de fungo, preservando a saúde dos mesmos. Isso foi observado pelo fato de que no dia 10 do experimento, houve uma grande redução da presença desses isolados em relação ao dia 0 (Teste Exato de Fisher, $p < 0,01$, Tabela 2). Notadamente, o isolado LESF 602 não foi encontrado nos jardins no dia 10 (Tabela 2). Os jardins de fungo inoculados com os três isolados mostraram-se saudáveis no dia 10 (Teste Exato de Fisher, $p = 1,00$, Figura 4).

2. Para o isolado LESF 590 e o isolado de *Escovopsis*, não houve redução significativa na presença do fungo inoculado nos dias 0, 5 e 10 (Teste Exato de Fisher, $p > 0,09$, Tabela 2). A presença inalterada desses fungos no jardim nos três dias avaliados sugere uma permanência destes no substrato, mesmo na presença das operárias. Além disso, a saúde dos jardins de fungo infectados com esses isolados não diferiu significativamente com a do controle (Teste Exato de Fisher, $p > 0,08$, Figura 4). O experimento com o isolado LESF 595 apresentou uma redução moderada na frequência de recuperação deste fungo. Embora LESF 595 apresentou uma redução significativa em relação ao tempo 0 (Teste Exato de Fisher, $p < 0,001$, Tabela 2), não houve diferença significativa entre os dias 5 e 10 (Teste Exato de Fisher, $p > 0,110$, Tabela 2).

3. Para os isolados LESF 151, LESF 510, LESF 591, LESF 592, LESF 594, LESF 601, LESF 603 e *E. nivea* CBS135749^T, ocorreram danos significativos nos jardins de fungo (Teste Exato de Fisher, $p < 0,032$, Figura 4). Os jardins tratados com esporos desses fungos morreram e foram transformados em lixo (Figura S4). Portanto, foram observados resultados irregulares no que diz

respeito ao crescimento de *Escovopsioides* nos fragmentos desse substrato inoculados no meio de cultivo (Tabela 2). Devido a esse fato, os resultados de fixação de *Escovopsioides* no lixo não foram utilizados nas análises.

Discussão

Neste trabalho acessamos a diversidade genética de isolados do gênero *Escovopsioides* encontrados em colônias das formigas da tribo Attini. Com base nas sequências *tef1* e ITS geradas, foi possível investigar o posicionamento filogenético desse gênero em relação à *Escovopsis*, fungo parasita associado às colônias dessas formigas. Adicionalmente, foram realizados bioensaios *in vitro* e em substrato natural (jardim de fungo) que comprovaram a inibição do crescimento do fungo mutualista das formigas cortadeiras por *Escovopsioides*.

Tanto na filogenia baseada no marcador *tef1*, quanto na filogenia utilizando os marcadores *tef1* e ITS, *Escovopsioides* apresentou-se como um clado monofilético, com valores elevados de PP. A maioria dos isolados avaliados (n= 20) mostrou baixa variação nos marcadores moleculares, corroborando à identificação em *E. nivea*. O isolado *Escovopsioides* sp. LESF 602, obtido de uma colônia de *A. megacephala*, foi o único que divergiu da espécie tipo, o que sugere uma provável espécie filogenética nova.

Em nossas análises foi possível notar que a origem dos isolados não explica a formação de dois clados de *Escovopsioides*. Resultado semelhante foi observado por Taerum e colaboradores (2007), pois com uma ampla amostragem em vários pontos das Américas, esses autores indicaram que isolados de *Escovopsis* muito semelhantes podem ser encontrados em colônias de locais muito distantes, como Panamá e Argentina. Ainda, esses autores não observaram uma separação de *Escovopsis* que infectam somente colônias de *Atta* e outros que infectam apenas colônias de *Acromyrmex*, demonstrando um alto grau de compartilhamento do parasita entre as colônias de formigas cortadeiras. Ainda, Meirelles e colaboradores (2015b) encontraram isolados de *Escovopsis* semelhantes geneticamente, tanto em colônias de formigas cortadeiras, quanto em colônias de formigas não-cortadeiras do gênero *Trachymyrmex*. Tal fato indicou o compartilhamento de isolados de *Escovopsis* em dois grupos distintos de formigas (cortadeiras e não-cortadeiras). Semelhantemente, um isolado de *Escovopsioides* obtido de *Trachymyrmex* é idêntico a outros isolados de *Escovopsioides* obtidos de formigas cortadeiras (Figura 1). Portanto, nossos dados sugerem um certo compartilhamento de *E. nivea* entre colônias de formigas cortadeiras e não-cortadeiras (*Trachymyrmex* sp.), mesmo considerando grandes distâncias.

A filogenia de *Escovopsioides* realizada no presente estudo sugere uma posição consistente desse fungo próxima à *Escovopsis* que infectam colônias de formigas atíneas derivadas

(Figura 1). Resultado semelhante foi obtido por Meirelles et al. (2015a), os quais apontaram *Escovopsioides* como um grupo irmão de *Escovopsis* que apresentam esporulação marrom, também baseado na filogenia utilizando *tef1*. Entretanto, não houve suporte para esse mesmo agrupamento na filogenia utilizando os marcadores concatenados (*tef1* e ITS) no trabalho desses autores. Por outro lado, a filogenia concatenada do presente estudo (Figura S2), o clado de *Escovopsioides* se relaciona de forma muito significativa com uma espécie recentemente descrita, *Escovopsis trichodermoides*. Augustin e colaboradores (2013), com uma filogenia baseada no gene LSU, encontraram um posicionamento basal de *Escovopsioides* em relação ao gênero *Escovopsis*. Entretanto, esses autores não incluíram sequências de *Escovopsis* de atíneas basais nas análises. Também com base no gene LSU, Meirelles et al. (2015a) obtiveram um posicionamento basal de *E. nivea* em relação a todas as espécies de *Escovopsis* descritas. Esse resultado foi obtido mesmo incluindo *Escovopsis kreiselii*, uma espécie com esporulação rosa, isolada de colônias de atíneas basais.

Até o momento, a posição filogenética de *Escovopsioides* como um gênero distinto de *Escovopsis*, como proposto por Augustin et al. (2013), aparentemente não se sustenta. Como pode ser visualizado na Figura 1, espécies basais de *Escovopsis* associados às colônias de formigas atíneas foram descritas como pertencentes ao gênero *Escovopsis*. Meirelles et al. (2015a) apontaram um posicionamento intermediário de *Escovopsioides*; ou seja, entre *E. kreiselii* (um *Escovopsis* basal) e os *Escovopsis* derivados que apresentam esporulação marrom. Já Masiulionis et al. (2015), aponta *Escovopsioides* formando um clado junto à espécie recentemente descrita, *Escovopsis trichodermoides* (de esporulação amarela), portanto, formando um clado monofilético com representantes de *Escovopsis* de esporulação branca e amarela, quando utiliza-se *tef1* como marcador. A filogenia concatenada (Figura S3) aponta, assim como esses autores, a formação de um clado entre *E. trichodermoides* e *Escovopsioides*. As diferenças na filogenia de Masiulionis et al. (2015) e a do presente trabalho utilizando o marcador *tef1*, no que diz respeito a formação do clado de *Escovopsioides*, pode ser explicada pelo tamanho dos alinhamentos utilizados. Os autores utilizaram fragmentos de 395 pb de *tef1* para reconstruir as filogenias; já o presente trabalho utilizou fragmentos de *tef1* acima de 700 pb. O posicionamento intermediário de *Escovopsioides* em relação às espécies formalmente descritas de *Escovopsis*, todas dentro de um clado monofilético, sugere a reclassificação de *Escovopsioides* para *Escovopsis*. Para levantar mais evidências que sustentem essa afirmação é necessário sequenciar o gene LSU para *E. trichodermoides*, bem como de todos os isolados de *Escovopsioides* examinados nesse trabalho. Além disso, é desejável que outros marcadores moleculares sejam avaliados para reconstruir uma filogenia *multilocus*.

Comprovamos que *Escovopsioides* é um provável parasita do jardim de fungo. Isso corrobora o fato de *Escovopsioides* ser um gênero relacionado filogeneticamente a *Escovopsis*. Haifig (2014) levantaram evidências de que *Escovopsioides* apresenta atividade inibitória frente ao fungo mutualista das formigas cortadeiras, entretanto, a autora utilizou apenas dois isolados originados de formigas do gênero *Acromyrmex*. Com um maior número de isolados, nossos dados reforçam o antagonismo de *Escovopsioides* frente ao fungo cultivado pelas formigas.

Nos bioensaios *in vitro* realizados no presente estudo, observamos indícios sobre o possível parasitismo de *Escovopsioides* frente ao fungo mutualista. Basicamente, existem dois tipos de micoparasitas: os necrotróficos e os biotróficos (GRUBER et al., 2012). O primeiro grupo abriga fungos que liberam enzimas que degradam as células do hospedeiro, liberando o conteúdo celular o qual é utilizado pelo parasita como fonte de nutrientes. Já o segundo grupo (biotróficos), quando em contato com o hospedeiro, o parasita penetra em suas células e capta o conteúdo celular como fonte de nutrientes (GRUBER et al., 2012). Reynolds e Currie (2004) propuseram que *Escovopsis weberi* é um micoparasita necrotrófico. Por outro lado, Marfetán e colaboradores (2015) sugerem que *E. weberi* é um parasita biotrófico destrutivo que necessita de contato direto com o hospedeiro. Esses mesmos autores também relataram atividade necrotrófica em alguns isolados de *Escovopsis*. Embora não foi acessada a interação entre *Escovopsioides* e o fungo mutualista em um nível hifal no presente estudo, a inibição significativa do fungo mutualista por *Escovopsioides* é um indício importante de comportamento micoparasita de *Escovopsioides* frente a *L. gongylophorus*.

Nos bioensaios *in vitro* após 10 dias de experimento, com exceção de um isolado de *Escovopsioides* advindo de *Acromyrmex* (isolado LESF 596) e outro de *Apterostigma* (isolado LESF 602), não foi observada diferença significativa marcante na inibição do fungo mutualista entre os demais isolados de *Escovopsioides*. Nos bioensaios com o jardim de fungo sem as operárias, observamos um padrão similar de resultados. Nesses experimentos, não observamos o crescimento do isolado LESF 602 no jardim e o isolado LESF 594 não esporulou. Em um contexto considerando a participação defensiva das formigas, o efeito de alguns isolados alterou significativamente em comparação com o experimento anterior sem operárias, pois não provocaram danos significativos nos jardins. Wallace et al. (2014), utilizando método semelhante ao deste estudo, observaram que isolados de *Escovopsis* geneticamente idênticos provenientes de *Atta cephalotes* apresentam diferenças marcantes no dano ocasionado no jardim na presença das formigas. Taerum et al. (2007) discutem a possibilidade de que diferenças sutis entre os isolados de *Escovopsis* podem apresentar um impacto muito significativo na virulência do parasita na presença das operárias. Proposta esta que pode justificar por que o efeito de diferentes isolados geneticamente similares de *Escovopsioides* apresentaram diferenças marcantes na presença das

operárias. Portanto, a observação de alteração significativa na virulência de fungos nocivos ao jardim com a presença de formigas, evidencia o quão essencial é a participação delas na saúde do jardim de fungo.

A atividade inibitória das bactérias filamentosas *Pseudonocardia*, presente no corpo das formigas, é descrita como importante fator na inibição do desenvolvimento de *Escovopsis* (CURRIE et al., 1999a; SEN et al., 2009; MEIRELLES et al., 2014). Embora o presente estudo não avaliou a interação de *Pseudonocardia* e *Escovopsioides*, é possível que essas bactérias também protejam as colônias desse fungo parasita. Apesar de *Pseudonocardia*, Currie e Stuart (2001) descrevem a atividade física de assepsia das formigas sobre o jardim de fungo, quando contaminadas com fungos nocivos. A remoção somente dos esporos do jardim é chamada de *grooming* e a remoção de fragmentos de jardim contaminados, os quais são descartados no lixo, é chamada de *weeding*. Foi notável a ausência de danos nos jardins de fungo infectados com esporos dos isolados LESF 596, LESF 599 e sobretudo do isolado LESF 602. Além desses isolados não mostrarem danos significativos, foi observado que a frequência de detecção destes nos jardins foi significativamente reduzida, sugerindo que a infecção esteja em processo de controle ou sob controle das operárias (Tabela 2). A remoção dos esporos pelas formigas, sem grandes danos ao jardim de fungo, sugere um comportamento bem sucedido utilizando bactérias *Pseudonocardia*. Além do mais, pequenas remoções por *weeding* de porções contaminadas de jardim, e principalmente comportamento de *grooming*, podem ter sido efetivos por parte das operárias, na remoção dos fungos parasitas. Por outro lado, em tratamentos com danos no jardim, quando o fungo inoculado está em desenvolvimento avançado, tipicamente foi observada a remoção parcial ou completa do jardim de fungo, transformando-o em lixo (Figura S4), ao que se refere o comportamento de *weeding*. O lixo das formigas é reconhecido como material em decomposição rico em micro-organismos, onde uma microbiota distinta da encontrada no jardim prevalece (SCOTT et al., 2010). A grande quantidade de micro-organismos exógenos ao jardim de fungo pode competir e inibir o desenvolvimento do fungo inoculado no meio de cultivo. Isso pode explicar por que frequentemente não foi observado crescimento dos fungos, quando inoculamos fragmentos de lixo no meio.

O isolado LESF 601 foi obtido da formiga derivada, porém não cortadeira de folhas do gênero *Trachymyrmex*. Como previamente descrito, esse isolado foi identificado como *E. nivea*. O efeito desse isolado nos experimentos de co-cultivo *in vitro* com *L. gongyloporus*, bem como no jardim de fungo na ausência e na presença de operárias, se mostrou indistinguível dos isolados mais virulentos obtidos de formigas cortadeiras. Taerum et al. (2007) observaram o crescimento de isolados de *Escovopsis* originados de *Trachymyrmex*, em jardins de fungo de formigas cortadeiras. Portanto, nossos resultados sugerem que *Escovopsioides* também não apresente

especificidade para com seu hospedeiro, quando considerando as formigas cortadeiras e não-cortadeiras.

O isolado LESF 602 é o único obtido de uma colônia de atínea basal, *A. megacephala*. Essa formiga se distingue de outras espécies de *Apterostigma* por cultivar *L. gongylophorus*, o mesmo fungo mutualista cultivado pelas formigas cortadeiras (SCHULTZ et al., 2015). Por cultivar esse fungo, era esperado que o isolado de *Escovopsioides* encontrado na colônia dessa formiga agrupasse com os isolados de *Escovopsioides* encontrados em formigas cortadeiras. Ao contrário do esperado, o isolado LESF 602 foi o mais diferenciado em relação aos demais na filogenia. Adicionalmente, esse isolado foi o único que não demonstrou não afetou os jardins de fungo tanto na ausência, quanto na presença das operárias. Meirelles e colaboradores (2015b) sugeriram que existem isolados de *Escovopsis* mais adaptados a determinadas regiões geográficas (especialização local). No caso de *A. megacephala*, esta é uma espécie rara e encontrada somente na região amazônica (Schultz et al. 2015) e embora Schultz et al. (2015) descreveram o fungo mutualista como *L. gongylophorus*, *A. megacephala* cultiva *L. gongylophorus* pertencente a um clado específico dos demais fungos que cultivam as formigas cortadeiras. Isto condiciona a uma certa especificidade de *Escovopsioides* para com o fungo mutualista desta formiga. Esse contexto poderia explicar o motivo de LESF 602 ser diferente dos demais isolados avaliados, e a ausência de danos no fungo mutualista utilizado nos bioensaios.

Considerações

Neste estudo foi apontado uma baixa diversidade genética entre os isolados de *Escovopsioides* de atíneas derivadas, mostrando uma distribuição ampla de *E. nivea* em diferentes atíneas de diferentes localidades. Em contrapartida, uma linhagem filogenética nova desse fungo foi descoberta nesse estudo. Considerando o posicionamento intermediário na filogenia de *Escovopsis*, torna-se necessária a reclassificação do gênero *Escovopsioides*; entretanto, outros marcadores moleculares devem ser analisados. Embora o atual estágio da taxonomia de *Escovopsioides* ainda não permita a clara distinção de *Escovopsis*, o presente estudo demonstrou que esse fungo é um antagonista do fungo cultivado pelas formigas atíneas.

Referências

AUGUSTIN, J. O.; GROENWALD, J. Z.; NASCIMENTO, R. J.; MIZBURTI, E. S. G.; BARRETO, R. W.; ELLIOT, S. L.; EVANS, H. C. Yet more "weeds" in the gardens: fungal novelties from nests of leaf-cutting ants. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 9, p. e82265, 2013.

BACCI JR, M.; ANVERSA, M.M.; PAGNOCCA, F.C. Cellulose degradation by *Leucocoprinus gongylophorus*, the fungus cultivated by leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.67, n.4, p.385-386, 1995.

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

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

CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 96, n. 7, p. 7998-8002, 1999b.

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

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

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, New York, v. 9, n. 8, p. 772-772, 2012.

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

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

GERARDO, N. M.; JACOBS, S. R.; CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G. Ancient host-pathogen associations maintained by specificity of chemotaxis and antibiosis. **Plos Biology**, San Francisco, v. 4, n. 8, e 235, 2006.

GRUBER, S; SEIDL-SEIBOTH, V. Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. **Microbiology**, Reading, v.158, 26-34, 2012.

HAIFIG, S. S. V. **A natureza do parasitismo de Escovopsis sp. e Escovopsioides sp. sobre Leucoagaricus gongylophorus, fungos associados aos jardins de formigas cortadeiras**. 61f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2014.

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.

KATOH, K., STANDLEY, D. M. Mafft Multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.30, n.4. p.772-780, 2013.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 16, n. 2, p. 111–120, 1980.

MARFETÁN, J.A.; ROMERO, A.I.; FOLGARAIT, P.J. Pathogenic interaction between *Escovopsis weberi* and *Leucoagaricus* sp.: mechanisms involved. **Fungal Ecology**, Exeter, v.17, p.52-61, 2015.

MASIULIONIS, V.E.; CABELLO, M.N.; SEIFERT, K.A.; RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F.C. *Escovopsis trichodermoides* sp. Nov. isolated from a nest of the lower attini ant *Mycocepurus goeldii*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.107, n.3, p.731-40, 2015.

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

MEIRELLES, L.A.; MENDES, T.D.; SOLOMON, S.E.; BUENO, O.C.; PAGNOCCA, F.C.; RODRIGUES, A. Broad *Escovopsis* inhibition activity of *Pseudonocardia* associated with *Trachymyrmex* ants. **Environmental Microbiology Reports**. Bedford, v.6, n.4, p.339-345, 2014.

MEIRELLES, L.A.; MONTROYA, Q.V.; SOLOMON, S.E.; RODRIGUES, A. New light on the systematics of fungi associated with attine ant gardens and the fescription of *Escovopsis kreiselii* sp. nov. **Plos One**, San Francisco, v.10, n.1, 2015a.

MEIRELLES, L.A.; SOLOMON, S.E.; BACCI JR, M.; WRIGHT, A.M.; MUELLER, U.G.; RODRIGUES, A. Shared *Escovopsis* parasites between leaf cutting and non- leaf-cutting ants in the higher attini fungus-growing ant symbiosis. **Royal Society Open Science**. London, v.2:150257, 2015b.

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

MUELLER, U. G.; SCOTT, J. J.; ISHAK, H. D.; COOPER, M.; RODRIGUES, A. Monoculture of leaf cutter ant gardens. **Plos One**, San Francisco, v. 5, n. 9, p. e12668, 2010.

NEWMAYER, D.. Filtering small quantities of conidial suspensions to remove mycelial fragments. **Fungal Genetics Newsletter**, Manhattan, v.37,n. 27. 1990.

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

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

REIS, B.M.S.; SILVA, A.; ALVAREZ, M.R.; OLIVEIRA, T.B.; RODRIGUES, A. Fungal communities of the leaf cutter ant *Atta cephalotes* in forest and cabruca agrosystems of Southern Bahia State (Brazil). **Fungal Biology**, Oxford, v.119, n.12, p.1170-1178, 2015.

- RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; PFENNING, L. H.; BACCI JR., M. Assessment of Microfungi in Fungus Gardens Free the Leaf-Cutting Ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera : Formicidae). **Sociobiology**, Chico, v.46, n.2, 2005.
- RODRIGUES, A.; BACCI JR., M.; MUELLER, U.G.; ORTIZ, A.; PAGNOCCA, F.C. Microfungal weeds in the leaf-cutter ant symbiosis. **Microbial Ecology**, New York, v.56, n.4, p.604-614, 2008.
- RODRIGUES, A.; CABLE, R.N.; MUELLER, U.G.; BACCI, M.; PAGNOCCA, F.C. Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungal garden pathogens of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.96, n.3, p.333-342, 2009.
- RODRIGUES, A.; SILVA, A.; BACCI JR, M.; FORTI, L.C.; PAGNOCCA, F.C. Filamentous fungi found on foundress queens of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Applied Entomology**. Berlin, v.134, n.4, p.342-345, 2010.
- RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, Oxford, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.
- RASBAND, W. S. **ImageJ**, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, , <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method - a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.
- SANTOS, A.V.; DILLON, V.M.; REYNOLDS, S.E.; SAMUELS, R.I. Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.239, n.2, p.319-323, 2004.
- SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G. 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.
- SCHULTZ, T.R.; SOSA-CALVO, J.; LOPES, C.T.; MUELLER, U.G.; BACCI JR, M.; VASCONCELOS, H.L. The most relictual fungus-farming ant species cultivates the most recently evolved and highly domesticated fungal symbiont species. **The American Naturalist**, Chicago, v.185, n.5, p.693-703, 2015.
- SCOTT, J.J.; BUDSBERG, K.J.; SUEN, G.; WIXON, D.L.; BALSER, T.C.; CURRIE, C.R. Microbial community structure of leaf-cutter ants fungus gardens and refuse dumps. **Plos One**, San Francisco, v.5, n.3, p.e9922, 2010.
- SEN, R.; ISHAK, H. D.; ESTRADA, D.; DOWD, S. E.; HONG, E.; MUELLER, U. G. Generalized antifungal activity and 454-screening of *Pseudonocardia* and *Amycolatopsis* bacteria in nests of fungus-growing ants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 106, n. 42, p. 17805-17810, 2009.
- SILVA, A.; RODRIGUES, A; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; BACCI JR., M. Susceptibility of ant-cultivated fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales: Basidiomycota) towards microfungi. **Mycopathologia**, Haia, v.162, p. 115-119, 2006.

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. **Proceedings of The Royal Society B-Biological Sciences**, London, v. 274, n. 1621, p. 1971-1978, 2007.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.30, p.2725, 2013

WALLACE, D.E.; ASENSIO, J.G.; TOMÁS, A.A. Correlation between virulence and genetic structure of Escovopsis strains from leaf-cutting ant colonies in Costa Rica. **Microbiology**, Reading, v.160, n.8, 2015.

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

WILSON, E.O. Caste and division of labor in leaf cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v.7, n.2, p.143-156, New York, 1980.

ZHANG, Z.; SCHAWARTZ, S.; WAGNER, L.; MILLER, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **Journal of Computational Biology**, New York, v. 7, n.1-2, p. 203-14, 2000.

Legenda das figuras

Figura 1. Posição filogenética de isolados de *Escovopsioides* obtidos de formigas da tribo Attini. Árvore reconstruída com Inferência Bayesiana. Sequências do marcador *tef1* de *Escovopsis* e de outros representantes (grupo externo) da família Hypocreaceae foram obtidas do GenBank. Valores nos ramos significam probabilidades posteriores. Códigos de acesso do GenBank e espécies de formigas das quais os fungos foram isolados estão entre parênteses. Clado de *Escovopsioides* encontra-se destacado em vermelho. ^T: espécie tipo.

Figura 2. Crescimento micelial relativo de *Leucoagaricus gongylophorus* na presença de diferentes isolados de *Escovopsioides*. O crescimento micelial relativo foi obtido através da proporção de crescimento de *L. gongylophorus* nos diferentes tratamentos em relação ao controle correspondente; após (A) 5 dias, (B) 10 dias e (C) 14 dias. Um isolado de *Escovopsis* foi utilizado para fins de comparação. ET: espécie tipo, *Escovopsioides nivea*; Esco: *Escovopsis*; L seguido de número refere-se aos códigos LESF relacionados na Tabela 1.

Figura 3. Desenvolvimento de diferentes isolados de *Escovopsioides* em jardim de fungo na ausência das operárias de *Atta sexdens rubropilosa*; após (A) 5 dias e (B) 10 dias. O eixo y indica os escores de desenvolvimento relativo (0 a 3) nos jardins de fungo. Estão representadas no gráfico as médias $\pm$ erro padrão dos escores nos diferentes tratamentos. Um isolado de *Escovopsis* foi utilizado para fins de comparação. ET: espécie tipo, *Escovopsioides nivea*; Esco: *Escovopsis*; L seguido de número refere-se aos códigos LESF relacionados na Tabela 1.

Figura 4. Saúde dos jardins de fungo na presença de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* observada nos dias (A) 5 e (B) 10 após inoculação de esporos de *Escovopsioides*. O eixo y indica os escores de dano relativo nos jardins de fungo (0 a 10) nos jardins de fungo. Estão representadas no gráfico as médias $\pm$ erro padrão dos escores nos diferentes tratamentos. Danos significativos provocados pelos fungos avaliados estão indicados com *. Um isolado de *Escovopsis* foi utilizado para fins de comparação. ET: espécie tipo, *Escovopsioides nivea*; Esco: *Escovopsis*; L seguido de número refere-se aos códigos LESF relacionados na Tabela 1.

Tabelas

Tabela 1. Isolados de *Escovopsioides* (n= 21) obtidos de jardins de fungo de formigas da tribo Attini e mantidas na Central de Recursos Microbianos da UNESP.

Código do isolado	Formiga	Local de coleta da colônia
LESF 57	<i>Atta sexdens rubropilosa</i>	Corumbataí-SP
LESF 151	<i>Atta sexdens rubropilosa</i>	Corumbataí-SP
LESF 159	<i>Atta sexdens rubropilosa</i>	Corumbataí-SP
LESF 510	<i>Atta sexdens rubropilosa</i>	Botucatu-SP
LESF 587	<i>Atta cephalotes</i>	Camacan-BA
LESF588	<i>Atta cephalotes</i>	Camacan-BA
LESF 589	<i>Atta cephalotes</i>	Camacan-BA
LESF 590	<i>Atta cephalotes</i>	Camacan-BA
LESF 591	<i>Atta capiguara</i>	Botucatu-SP
LESF 592	<i>Acromyrmex</i> sp.	Camacan-BA
LESF 593	<i>Atta cephalotes</i>	Camacan-BA
LESF 594	<i>Atta cephalotes</i>	Camacan-BA
LESF 595	<i>Atta cephalotes</i>	Camacan-BA
LESF 596	<i>Acromyrmex</i> sp.	Chuvisca-RS
LESF 597	<i>Atta cephalotes</i>	Camacan-BA
LESF 598	<i>Atta cephalotes</i>	Camacan-BA
LESF 599	<i>Acromyrmex heyeri</i>	Sentinela do Sul-RS
LESF 601	<i>Trachymyrmex</i> sp.	Rio Claro-SP
LESF 602	<i>Apterostigma megacephala</i>	Parauapebas-PA
LESF 603	<i>Atta sexdens</i>	Rio Claro-SP
CBS 135749 ^T	<i>Acromyrmex subterraneus subterraneus</i>	Viçosa-MG

^T: espécie tipo gentilmente cedida pelo Prof. Simon Elliot e Juliana Augustin (UFV).

LESF: Coleção de fungos pertencente ao Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos.

Tabela 2. Valores de permanência dos fungos inoculados nos jardins de fungo, na presença de operárias de *Atta sexdens rubropilosa*. Estão representadas as médias $\pm$ erro padrão dos valores de permanência nos diferentes tratamentos, em escala de 0 a 5. As comparações ocorrem entre um mesmo inóculo nos dias 0, 5 e 10 após tratamento. Letras iguais em um mesmo isolado nos diferentes dias, significam diferenças não significativas nos valores de permanência. Linhas brancas: Remoção bem sucedida dos esporos e jardim saudável, após 10 dias de inoculação; Linhas cinza claro: sem remoção bem sucedida dos esporos e jardim saudável, após 10 dias de inoculação; Linhas cinza escuro: Danos significativos, induzindo a morte do jardim de fungo, após 10 dias de inoculação. Um isolado de *Escovopsis* foi utilizado para fins de comparação. CBS 135749^T : espécie tipo, *Escovopsioides nivea*

Isolados	Dia 0	Dia 5	Dia 10
Controle	0	0	0
LESF596	4,8 $\pm$ 0,2a	1,8 $\pm$ 0,58b	1,6 $\pm$ 0,4b
LESF599	4 $\pm$ 0,55a	3,4 $\pm$ 0,81a	1,0 $\pm$ 0,44b
LESF602	4 $\pm$ 0,77a	1,2 $\pm$ 0,37b	0c
LESF590	4,6 $\pm$ 0,24a	4,8 $\pm$ 0,2a	3,8 $\pm$ 0,58a
LESF595	5a	4,2 $\pm$ 0,37a,b	3,0 $\pm$ 1,04b
<i>Escovopsis</i> sp.	5a	5a	5a
LESF151	5a	5a	4,2 $\pm$ 0,58*
LESF510	5a	5a	0*
LESF591	5a	4,4 $\pm$ 0,4a	1,6 $\pm$ 1,02*
LESF592	5a	4,6 $\pm$ 0,4a	1,2 $\pm$ 0,73*
LESF594	4,6 $\pm$ 0,4a	4 $\pm$ 0,44a	2,6 $\pm$ 1,02*
LESF601	5a	4,8 $\pm$ 0,2a	0*
LESF603	5a	5a	3,8 $\pm$ 0,43*
CBS 135749 ^T	5a	5a	0,6 $\pm$ 0,4*

*Valores não considerados nas análises, pois se referem ao crescimento de inóculo em lixo, não em jardim de fungo.

Figuras

Figura 1.

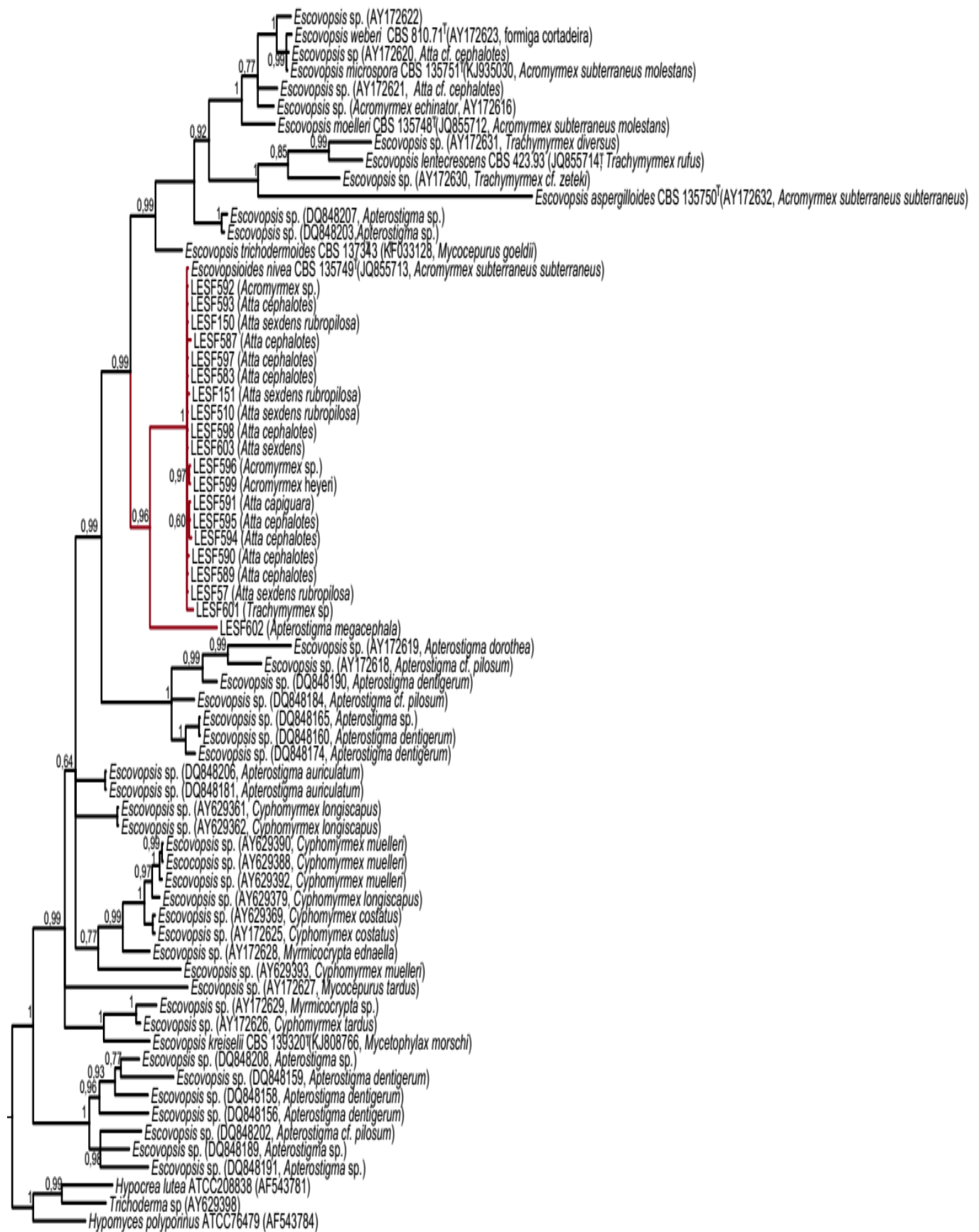


Figura 2.

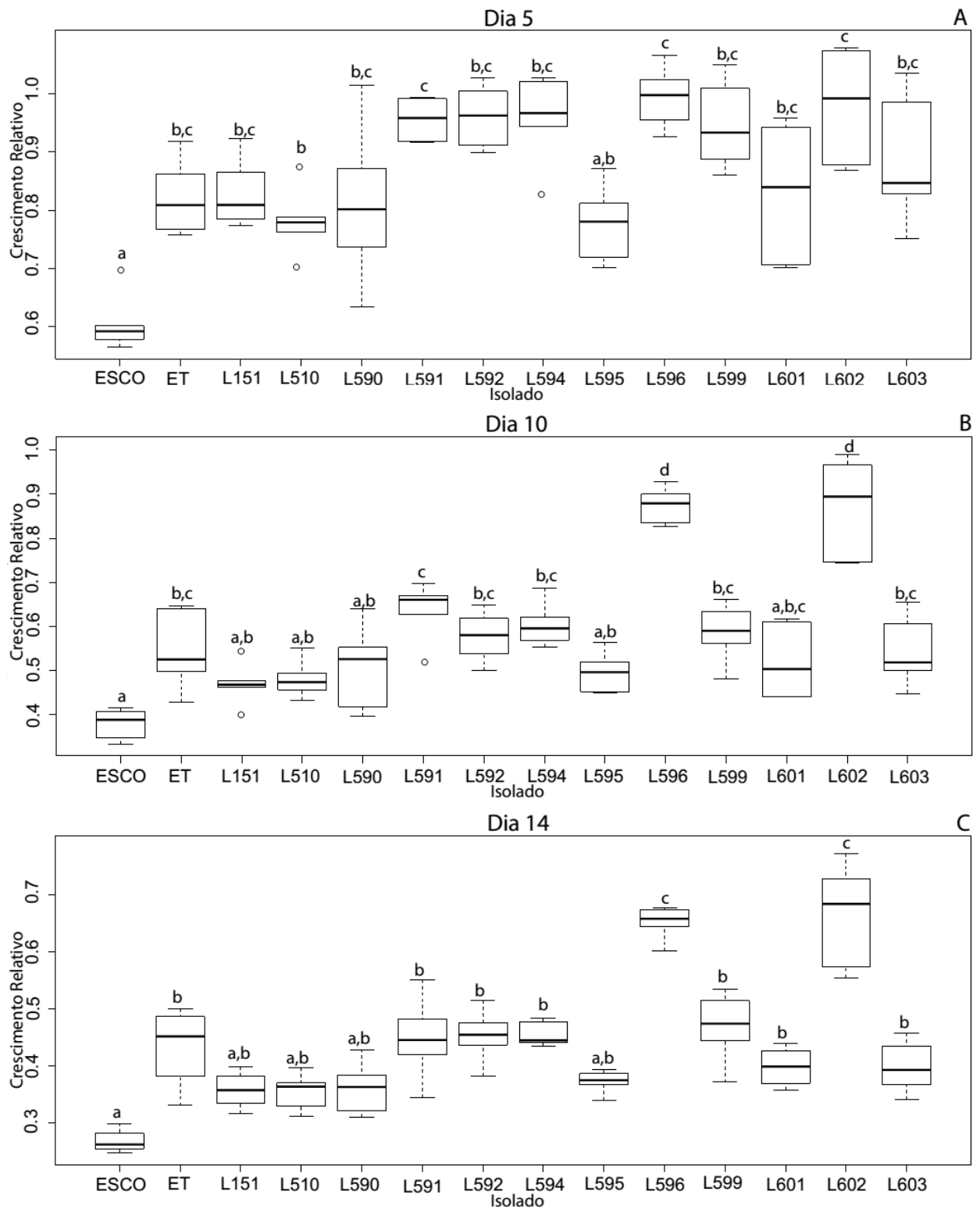


Figura 3.

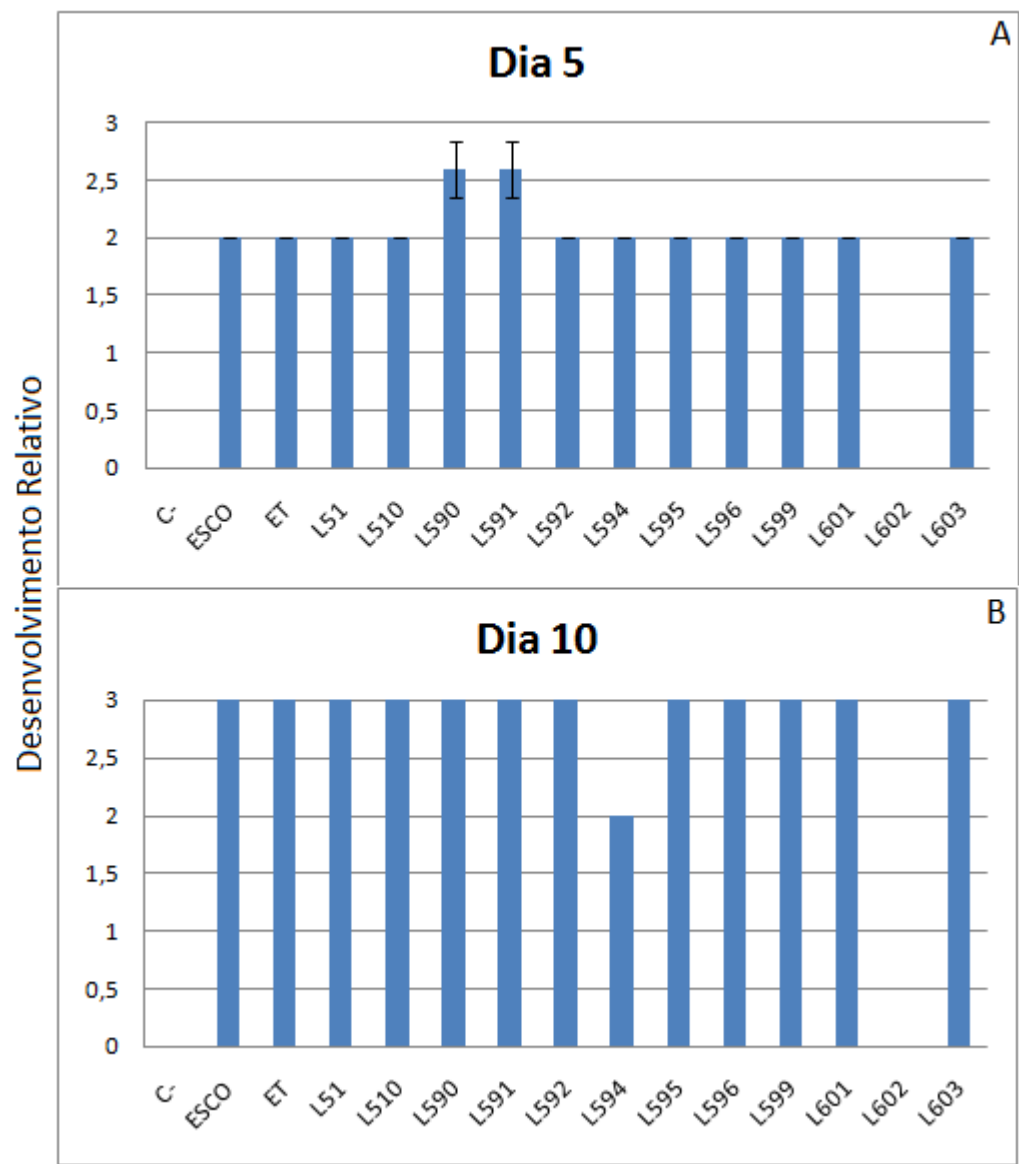
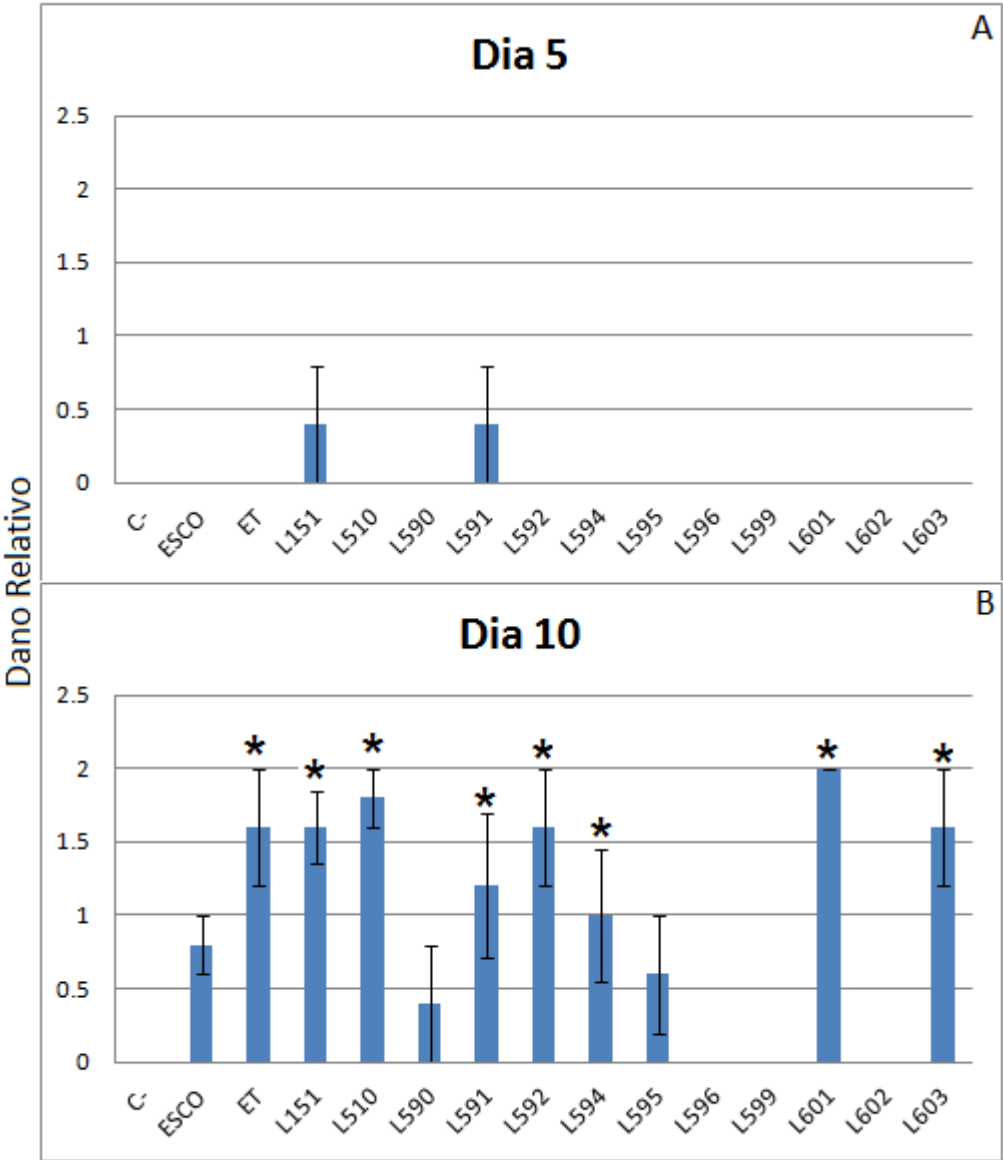


Figura 4.



Material Suplementar

Figura S1. Características distintivas de fungos do gênero *Escovopsis* e *Escovopsioides* associados aos jardins das formigas da tribo Attini. (A-C) *Escovopsis weberi*; em (A) coloração marrom das colônias de *Escovopsis* derivados; em (B-C) vesículas claviformes, as quais se encontram fiálides com conídios escuros; *Escovopsioides* sp. LESF 603 em (D-G); em (D) coloração hialina das colônias de *Escovopsioides*, (E-F) vesículas terminais, com fiálides longas (lageniformes), ligado aos conídios ; (G) hifas com aleuroconídios.

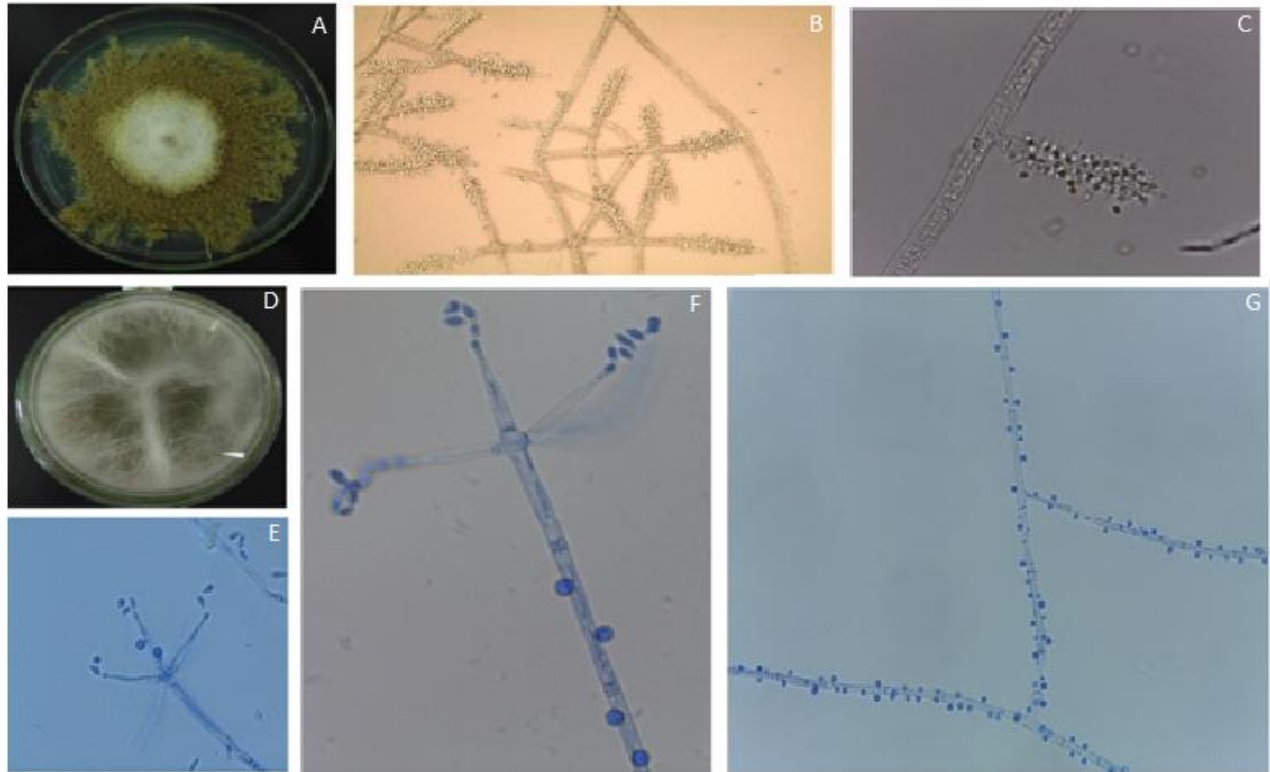


Figura S2. Bioensaios com jardins de fungo na ausência das operárias de *Atta sexdens rubropilosa* após 10 dias de incubação. (A) Controle negativo; (B) Crescimento de *Escovopsioides* LESF603; (C) Ausência de crescimento de *Escovopsioides*. LESF 602 e (D) Crescimento de *Escovopsis*.

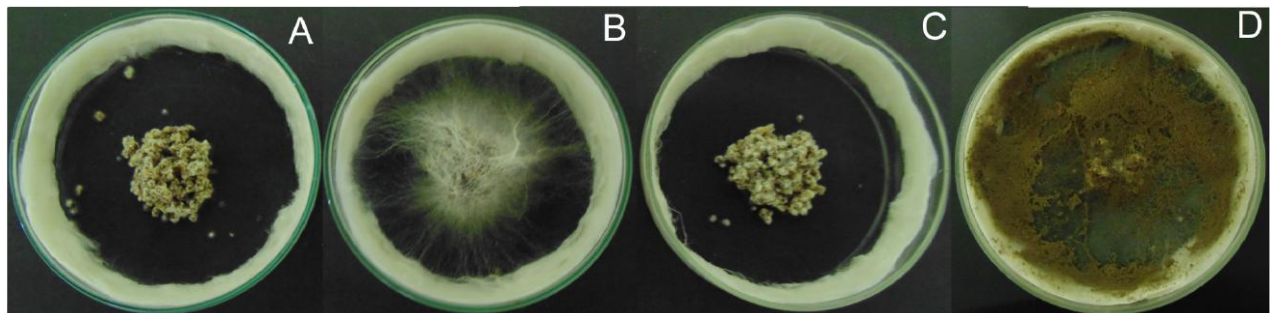


Figura S3. Posição filogenética de isolados de *Escovopsioides* obtidos de formigas da tribo Attini. Árvore foi reconstruída com Inferência Bayesiana. Sequências dos marcadores *tef1* e ITS de todas as espécies formalmente descritas de *Escovopsis* e representantes Hypocreaceae (grupo externo) foram obtidas do GenBank. Códigos de acesso do GenBank e espécies de formigas das quais os fungos foram isolados estão entre parênteses. Clado de *Escovopsioides* encontra-se destacado em vermelho. ^T: espécie tipo

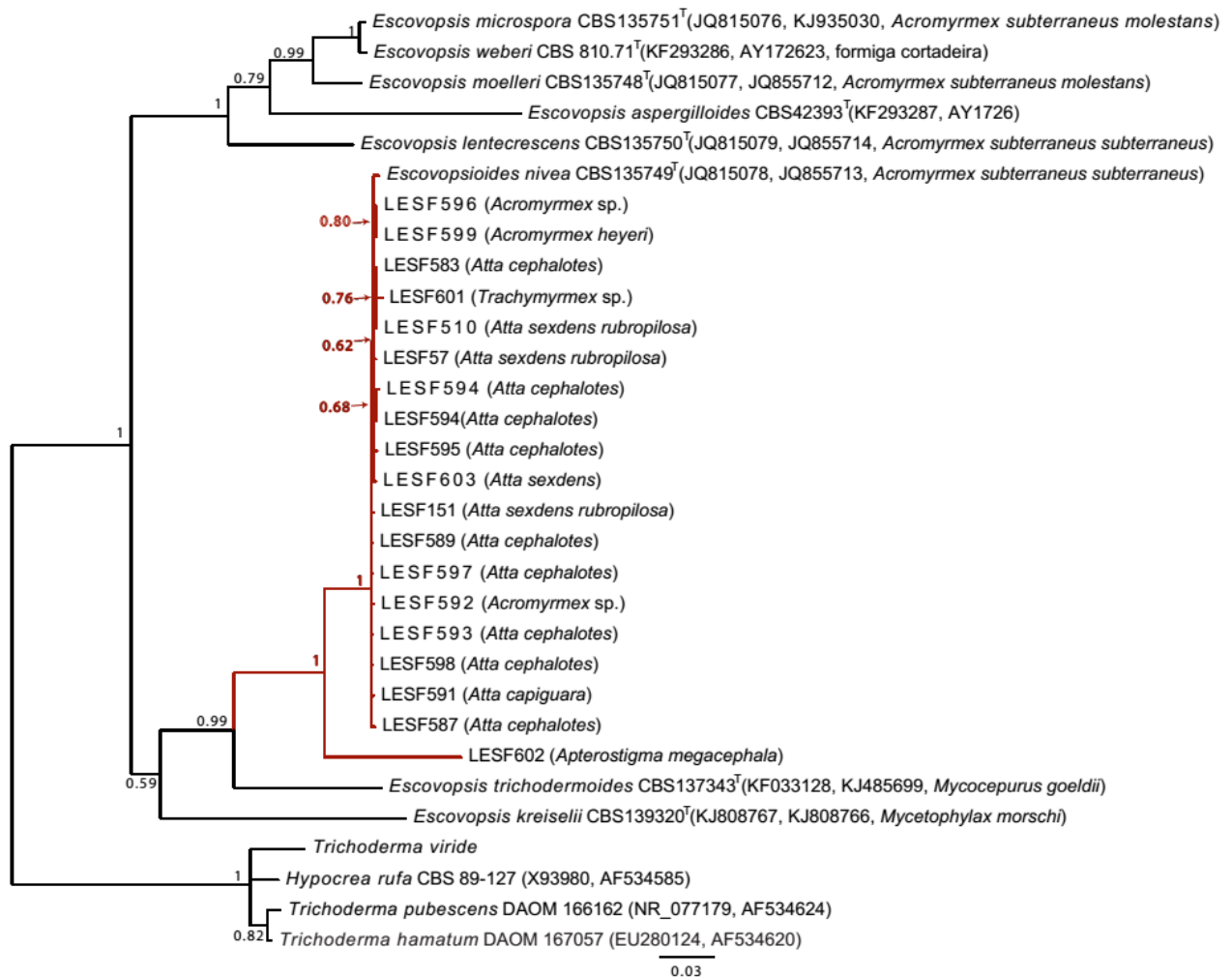


Figura S4. Critérios de condições de saúde do jardim de fungo. (A) Jardim saudável. (B) Jardim em processo de degradação (C) Jardim morto.

