
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Gabriel Giorgio Pressuto Pennachioni

**Natureza da interação entre *Escovopsioides* e
actinobactérias associadas às formigas cultivadoras de
fungos**

Rio Claro - SP
2025



Gabriel Giorgio Pressuto Pennachioni

Natureza da interação entre *Escovopsioides* e actinobactérias associadas às formigas cultivadoras de fungos

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

Orientador: Prof. Dr. André Rodrigues

Rio Claro - SP
2025

P412n Pennachioni, Gabriel Giorgio Pressuto
Natureza da interação entre Escovopsioides e actinobactérias associadas às formigas cultivadoras de fungos / Gabriel Giorgio Pressuto Pennachioni. -- Rio Claro, 2025
33 p. : tabs., fotos

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

1. Microbiologia. 2. Ecologia microbiana. 3. Simbiose. 4. Antifúngicos. 5. Formiga-cortadeira. I. Título.

Gabriel Giorgio Pressuto Pennachioni

Natureza da interação entre *Escovopsioides* e actinobactérias associadas às formigas cultivadoras de fungos

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

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. André Rodrigues

Dr. Vítor Rodrigues Marin

Dra. Elisa Pais Pellizzer

Aprovado em: 07 de novembro de 2025

Assinatura do discente

Assinatura do orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo nº 121741/2023-0), pela concessão da bolsa. Ao meu orientador, André Rodrigues, por me acolher no laboratório desde o primeiro ano da graduação e, posteriormente, por me introduzir na carreira científica. Aos colegas de laboratório, Mateus Oliveira da Cruz e Quimi Vidaurre Montoya, pelos ensinamentos na manipulação dos fungos e nas técnicas de biologia molecular; Mariana de Oliveira Barcoto, pela reativação das bactérias e pelo auxílio na discussão do trabalho; Raquel Lima de Sousa, pela reativação dos fungos; Pepijn Wilhelmus Kooij, pelo auxílio nas análises filogenéticas; e Diego Santana Assis, pelo auxílio com as análises estatísticas. Agradeço também à minha família, que me apoiou incondicionalmente durante toda a minha vida de estudos. O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil. Processo nº 2019/03746-0. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

RESUMO

As formigas-cortadeiras de folhas mantêm uma simbiose com o fungo *Leucocoprinus gongylophorus*, o qual é a fonte de alimento para a colônia. Em contrapartida, esses insetos fornecem folhas frescas como substrato para o cultivo do fungo. Outros microrganismos participam dessa simbiose, interagindo com o cultivar fúngico. Para protegê-lo de microrganismos contaminantes, as formigas mantêm em suas cutículas actinobactérias do gênero *Pseudonocardia*, as quais são produtoras de antibióticos. O objetivo deste estudo foi determinar se linhagens de *Pseudonocardia* inibem o crescimento de *Escovopsioides nivea*, fungo recentemente descrito como antagonista do cultivar fúngico das formigas e para o qual ainda não há informações sobre esta atividade. Para tanto, foram realizados ensaios de co-cultivo de três linhagens de *Pseudonocardia* frente a *E. nivea*, com medições diárias do crescimento. As três linhagens de *Pseudonocardia* sp. inibiram significativamente o crescimento de *E. nivea*, sendo que as linhagens TCP 15a e TCP 21a inibiram com mais intensidade, quando comparado à linhagem TCP 30a. Além disso, *Pseudonocardia* sp. TCP 15a e TCP 21a também inibiram significativamente o crescimento de *Escovopsis weberi*, fungo parasita do fungo cultivado pelas formigas. Nossos resultados indicam que *Pseudonocardia* apresenta ação antifúngica frente a *E. nivea*, sugerindo um papel defensivo nas colônias de formigas frente a esse antagonista. Por outro lado, todas as linhagens dessa actinobactéria também inibiram significativamente o crescimento de *L. gongylophorus*. Embora este resultado também foi observado em outros estudos, ainda são necessárias mais pesquisas para compreender a dinâmica da proteção conferida por *Pseudonocardia* para a colônia, sem prejudicar o fungo cultivado pelas formigas.

Palavras-chave: Simbiose; Antagonismo; Inibição; Atíneas.

ABSTRACT

Leaf-cutting ants maintain a symbiosis with the fungus *Leucocoprinus gongylophorus*, which serves as food for the colony. In turn, these insects supply fresh leaves as a substrate for fungal growth. Other microorganisms participate in this symbiosis, interacting with the fungal cultivar. To protect it from harmful microorganisms, the ants harbor on their cuticles antibiotic-producing actinobacteria in the genus *Pseudonocardia*. Here, we determine whether *Pseudonocardia* strains inhibit the growth of *Escovopsioides nivea*, a fungus recently described as an antagonist of ant fungal cultivars and for which this activity has not yet been reported. Dual culture assays were performed between three *Pseudonocardia* strains towards *E. nivea*, with daily measurements of its growth. All three *Pseudonocardia* sp. strains significantly inhibited the growth of *E. nivea*, with strains TCP 15a and TCP 21a showing higher inhibition compared to strain TCP 30a. In addition, *Pseudonocardia* sp. TCP 15a and TCP 21a also significantly inhibited the growth of *Escovopsis weberi*, a parasitic fungus of the ants' cultivated fungus. Our results indicate that *Pseudonocardia* exhibits antifungal activity against *E. nivea*, suggesting a defensive role within ant colonies against this antagonist. On the other hand, all *Pseudonocardia* strains significantly inhibited the growth of the ant fungal cultivar. Although this result has also been observed in other studies, further research is needed to understand the dynamics of *Pseudonocardia* protection for the colony without harming the fungal crop.

Keywords: Symbiosis; Antagonism; Inhibition; Attines.

Title: Nature of the interaction between actinobacteria and *Escovopsioides* associated with fungus-growing ants.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	OBJETIVOS.....	10
2.1	Geral.....	10
2.2	Objetivos específicos	10
3	MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1	Microrganismos: reativação e cultivo	11
3.2	Identificação das actinobactérias.....	12
3.3	Ensaio de co-cultivos entre <i>Pseudonocardia</i> e fungos.....	13
3.4	Análises dos dados.....	14
4	RESULTADOS	16
4.1	Identificação das actinobactérias	16
4.2	Ação de <i>Pseudonocardia</i> no crescimento de <i>Escovopsioides nivea</i>	18
5	DISCUSSÃO.....	23
6	CONCLUSÃO	25
	REFERÊNCIAS	26
	APÊNDICE	31

1 INTRODUÇÃO

As formigas cultivadoras de fungos (*Hymenoptera: Formicidae*) constituem um grupo monofilético que pertence à subtribo Attina, a qual abriga 20 gêneros e 246 espécies de formigas (Schultz, 2022). Esses insetos apresentam como principal característica o cultivo obrigatório de fungos basidiomicetos (*Basidiomycota: Agaricales*), os quais são mantidos, geralmente, em câmaras subterrâneas. Nessas, as formigas constroem o jardim de fungo, composto por substrato vegetal coletado por esses insetos e o micélio do fungo (Schultz, 2022). As formigas dispersam o fungo e o suprem com o substrato que coletam. Em contrapartida, o fungo cultivado é o principal alimento das larvas, das operárias e da rainha da colônia (Weber, 1972; Schultz; Brady, 2008). As formigas atíneas ocorrem exclusivamente nas Américas e apresentam uma grande importância ecológica, pois auxiliam na ciclagem de nutrientes, colaborando com diversos serviços ecossistêmicos (Montoya-Lerma *et al.*, 2012). No entanto, quando ocorrem em monoculturas, algumas atíneas, especialmente as conhecidas como saúvas e quenquéns (formigas-cortadeiras), tornaram-se pragas, devido ao elevado corte das folhas frescas, gerando prejuízos milionários, seja pelo corte diretamente, seja pelos gastos com o combate desses insetos (Della Lucia; Gandra; Guedes, 2014).

A prática da fungicultura pelas atíneas surgiu há 66 milhões de anos (Schultz *et al.*, 2024). A maioria das espécies de formigas atíneas cultiva fungos da tribo *Leucocoprinae* (*Basidiomycota, Agaricaceae, Agaricales*), enquanto um grupo específico cultiva fungos da família *Pterulaceae* (Schultz *et al.*, 2024). Considerando os diferentes fungos cultivados e características ecológicas das formigas, é possível distinguir cinco tipos de fungiculturas. O primeiro compreende o grupo das atíneas basais, que cultiva espécies de fungos da tribo *Leucocoprinae*. Neste grupo, a simbiose aparentemente não é totalmente obrigatória considerando o lado dos fungos, pois estes são capazes de vida livre, fora do formigueiro (Schultz, 2022). O segundo tipo de fungicultura reúne formigas do gênero *Apterostigma* (Mayr, 1865), que cultivam fungos coraloides pertencentes à família *Pterulaceae*. Tais fungos também são capazes de vida livre, fora dos formigueiros (Schultz, 2022). O terceiro tipo é a fungicultura caracterizada pelo cultivo de leveduras, sendo exclusivo de espécies de formigas pertencentes ao grupo *Cyphomyrmex rimosus* (Spinola, 1851). Esses fungos são aparentados dos fungos das atíneas basais, porém, ao invés de serem cultivados na forma micelial, são mantidos como células leveduriformes (Schultz, 2022). O quarto tipo de fungicultura é o chamado “fungicultura das atíneas derivadas”, pois os fungos cultivados (também da tribo *Leucocoprinae*) demonstram sinais de domesticação pelas formigas, a saber: (i) existência de vesículas nutritivas encontradas

nas extremidades das hifas (gongilídeos), sendo estas adaptações ao mutualismo; e (ii) o fato desses fungos não serem encontrados em vida livre e serem poliploides (Kooij *et al.*, 2015). O último tipo compreende a fungicultura das formigas-cortadeiras, considerado o mais derivado das atíneas, o qual reúne três gêneros de formigas: *Amoimyrmex* (Cristiano *et al.*, 2020), *Acromyrmex* (Mayr, 1865) e *Atta* (Fabricius, 1804). Esse grupo cultiva apenas uma espécie de fungo, *Leucocoprinus gongylophorus* (Möller) R. Heim (1957) (Schultz, 2022).

Além do fungo cultivado, outros fungos filamentosos, leveduras e bactérias também habitam as colônias desses insetos (Montoya *et al.*, 2021; Bizarria; de Castro Pietrobon; Rodrigues, 2023; Martiarena *et al.*, 2023). Muitos desses microrganismos adentram as colônias via material vegetal coletado pelas formigas ou mesmo aderidos aos corpos desses insetos. Dentre esses microrganismos, destacam-se fungos filamentosos do gênero *Escovopsis* (Muchovej; Della Lucia, 1990) (*Ascomycota: Hypocreales*). Esses foram descritos inicialmente como parasitas do fungo cultivado pelas formigas, eventualmente levando a colônia à morte (Currie; Mueller; Malloch, 1999). Entretanto, um estudo recente mostrou que *Escovopsis* apresenta um potencial oportunista em relação ao fungo mutualista das formigas. Embora o crescimento de *Escovopsis* seja mais rápido na presença de *L. gongylophorus*, a virulência varia segundo o contexto em que a colônia se apresenta, ou seja: quando a colônia está debilitada pela ação de inseticidas, *Escovopsis* cresce rapidamente sobre o jardim; já quando a colônia está saudável, *Escovopsis* parece se comportar como um comensal (Jiménez-Gómez *et al.*, 2021).

Outro fungo filamentoso também encontrado no sistema é o gênero *Escovopsioides* H.C. Evans & J.O. Augustin (2013) (*Ascomycota: Hypocreales*). Filogeneticamente relacionado a *Escovopsis*, apenas uma única espécie é conhecida, *Escovopsioides nivea* H.C. Evans & J.O. Augustin (2013) (Augustin *et al.*, 2013). Encontrado com relativa frequência, variando de 5% a 66% em colônias de atíneas (Pietrobon *et al.*, 2022), estudos sugerem que *E. nivea* é um antagonista dos fungos cultivados por essas formigas, pois ensaios *in vitro* de co-cultivo demonstraram que esse fungo inibe o crescimento dos fungos mutualistas das atíneas (Osti; Rodrigues, 2018; Mendonça *et al.*, 2021; Pietrobon *et al.*, 2022). Além disso, *E. nivea* cresce sobre o fungo mutualista quando na ausência de operárias, mas semelhante a *Escovopsis*, ele não é capaz de condenar uma colônia saudável à morte (Mendonça *et al.*, 2021). Portanto, até o momento, não foram observadas evidências que *E. nivea* seja um parasita das colônias das atíneas.

Durante a evolução, as formigas desenvolveram mecanismos para tentar manter as suas culturas livres de contaminantes (Fernández-Marín *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2018). Algumas das

atíneas desenvolveram comportamentos higiênicos de autolimpeza corporal e secreção de compostos de suas glândulas metapleurais (Fernández-Marín *et al.*, 2009), enquanto outras se associaram à actinobactérias (Currie *et al.*, 1999). No sistema das formigas cultivadoras de fungos foram encontradas diferentes actinobactérias, sendo aquelas pertencentes aos gêneros *Amycolatopsis*, *Pseudonocardia* e *Streptomyces* relatadas com maior frequência e provenientes de diversas espécies de formigas atíneas (Sen *et al.*, 2009). Todas apresentam a capacidade de produzir compostos antifúngicos que inibem os antagonistas do sistema das atíneas, como demonstrado em testes *in vitro* para *Escovopsis* (Haeder *et al.*, 2009; Meirelles *et al.*, 2014; Batey *et al.*, 2020). Dentre as actinobactérias mutualistas presentes no sistema, *Pseudonocardia* está localizada em estruturas especializadas no exoesqueleto das formigas (Li *et al.*, 2018). A quantidade de cobertura bacteriana nessas formigas está ligada ao comportamento dos indivíduos trabalhadores da colônia: operárias forrageadoras quase não apresentam cobertura bacteriana, pois ficam fora da colônia; enquanto que as operárias que permanecem na colônia, cuidando do jardim de fungo, apresentam uma maior cobertura (Fladerer; Bucar, 2022). *Pseudonocardia* é considerada um simbiote que atua na defesa do jardim de fungo, pois inibe *Escovopsis* (Goldstein; Klassen, 2020). Por outro lado, além da inibição dos invasores, também foi observada a inibição do próprio fungo mutualista das formigas por *Pseudonocardia*, lançando questionamentos sobre como essas bactérias atuam no sistema (Sen *et al.*, 2009).

Curiosamente, *E. nivea* bem como alguns grupos de actinobactérias estão associadas ao mesmo grupo de formigas atíneas, como é o caso das formigas-cortadeiras do gênero *Acromyrmex*, popularmente conhecidas como quenquéns (Sen *et al.*, 2009; Osti; Rodrigues, 2018; Goldstein; Klassen, 2020; Pietrobon *et al.*, 2022). Embora, estudos anteriores mostraram o papel antagônico das actinobactérias, principalmente *Pseudonocardia*, frente a *Escovopsis* (Sen *et al.*, 2009; Meirelles *et al.*, 2014), a relação dessas bactérias com o fungo *E. nivea* ainda não foi explorada. Dada a relação filogenética entre os fungos *Escovopsis* e *Escovopsioides* (Augustin *et al.*, 2013), é esperado que interajam de forma semelhante com as actinobactérias, devido ao compartilhamento de sua história evolutiva e nicho ecológico. Portanto, no presente estudo tentamos responder às seguintes perguntas: (i) as actinobactérias também inibem *E. nivea*? (ii) Como *E. nivea* é um antagonista e não um parasita do fungo cultivado, tal inibição é mais branda do que aquela observada para *Escovopsis*? Neste contexto, o presente estudo buscou elucidar a natureza da interação entre *E. nivea* e *Pseudonocardia* provenientes de formigas-cortadeiras do gênero *Acromyrmex*.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Descrever a interação *in vitro* entre *Pseudonocardia* e *E. nivea* encontrados em formigas-cortadeiras.

2.2 Objetivos específicos

- A) Determinar o crescimento de *E. nivea* na presença e ausência de *Pseudonocardia*, em ensaios *in vitro* de co-cultivo;
- B) Determinar se linhagens de *Pseudonocardia* também inibem o crescimento do fungo cultivado pelas formigas atíneas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos: reativação e cultivo

Um total de três isolados de *E. nivea* foi utilizado nos experimentos. As culturas estavam preservadas na coleção do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF) e foram obtidas de colônias de *Acromyrmex* sp. (Tabela 1). Foram utilizadas três linhagens de *Pseudonocardia*, também isoladas de colônias de *Acromyrmex* sp. (Tabela 1). Adicionalmente, foi utilizado um isolado do fungo cultivado pela formiga (*L. gongylophorus*) e um isolado de *Escovopsis weberi*, ambos também obtidos de colônias do gênero *Acromyrmex* (Tabela 1). O isolado *E. weberi* LESF 024 foi utilizado para fins de comparação, por já ter sido observada a inibição por actinobactérias (Meirelles *et al.*, 2014). Já o fungo mutualista *L. gongylophorus* foi utilizado para demonstrar se *Pseudonocardia* apresenta especificidade de ação antifúngica apenas contra os antagonistas do sistema ou se essa ação é possivelmente generalista.

Tabela 1. Microrganismos utilizados no estudo, com os respectivos dados de coleta das formigas.

Código ¹	Microrganismo	Formiga	Cidade-Estado
LESF 024	<i>Escovopsis weberi</i>	<i>Acromyrmex coronatus</i>	Alta Floresta-MT
LESF 321	<i>Escovopsioides nivea</i>	<i>Acromyrmex subterraneus</i>	Viçosa-MG
LESF 592	<i>Escovopsioides nivea</i>	<i>Acromyrmex</i> sp.	Camacan-BA
LESF 599	<i>Escovopsioides nivea</i>	<i>Acromyrmex heyeri</i>	Sentinela do Sul-RS
TCP 200313-05	<i>Leucocoprinus gongylophorus</i>	<i>Acromyrmex subterraneus</i>	Santa Teresa-ES
TCP 15a	<i>Pseudonocardia</i> sp.	<i>Acromyrmex subterraneus</i>	Santa Teresa-ES
TCP 21a	<i>Pseudonocardia</i> sp.	<i>Acromyrmex subterraneus</i>	Santa Teresa-ES
TCP 30a	<i>Pseudonocardia</i> sp.	<i>Acromyrmex subterraneus</i>	Santa Teresa-ES

¹LESF: Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos. TCP: Tatiane de Castro Pietrobon, quem originalmente isolou as actinobactérias. BA: Bahia, ES: Espírito do Santo, MG: Minas Gerais, MT: Mato Grosso, RS: Rio Grande do Sul. Fonte: Elaborado pelo autor, 2025

As culturas mantidas nos estoques foram reativadas seguindo protocolos específicos para cada microrganismo. Os isolados de *E. nivea* e *E. weberi* estavam mantidos como suspensão de conídios, em glicerol 10%, a -80 °C. As suspensões foram retiradas do freezer e 50 µL semeados em placas de Petri contendo meio de cultivo *Potato Dextrose Agar* (PDA, Neogen® Culture Media, Lansing, MI, EUA), suplementado com 150 µg mL⁻¹ de cloranfenicol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), e incubados a 25 °C, no escuro durante sete a dez dias. As actinobactérias foram retiradas do freezer a -80 °C e 100 µL das suspensões foram semeados

com alça de Drigalsky em placas contendo o meio *Yeast Malt Extract Agar* (em g L⁻¹: 3 de extrato de malte, 3 de extrato de levedura, 5 de peptona, 10 de dextrose e 18 de ágar; Neogen[®] Culture Media, Lansing, MI, EUA) (Meirelles *et al.*, 2014; Pietrobon *et al.*, 2022). As placas foram incubadas durante 28 dias a 25 °C, no escuro. No caso do fungo mutualista, foi utilizado o isolado mantido na coleção do LESF, o qual foi transferido pelo método de repique contínuo em *Malt Extract Agar Levedura Peptona* (MEA LP) (em g L⁻¹: 20 de extrato de malte, 2 de extrato de levedura, 5 de peptona, e 20 de ágar; Neogen[®] Culture Media, Lansing, MI, EUA) (Miyashira *et al.*, 2010).

3.2 Identificação das actinobactérias

As actinobactérias preservadas na coleção não estavam identificadas, portanto, a identificação foi realizada por métodos moleculares (DNA *barcoding*). Para tanto, o DNA genômico das culturas bacterianas (cultivadas nas condições mencionadas no item 3.1) foi extraído e amplificado para a região 16S do RNA ribossomal, utilizando o par de *primers* 27FA/1492RT (27f 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'/ 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane, 1991). Os *amplicons* foram purificados com o kit *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega Corporation, Madison, WI, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Após purificação dos *amplicons*, esses foram sequenciados no sequenciador ABI 3500 (LifeTechnologies, Carlsbad, CA, EUA). Em seguida, as sequências *forward* e *reverse* foram reunidas em *contigs* no Unipro UGENE v.52.0 (Okonechnikov *et al.*, 2012). Os *contigs* foram utilizados em buscas na base de dados do NCBI-GenBank, utilizando BLASTn, com buscas na base *core nucleotide*. As identificações por *barcoding* foram realizadas até gênero, pois é sabido que o sequenciamento da região 16S não apresenta resolução taxonômica suficiente para identificar espécies nesse grupo de bactérias (Huang; Goodfellow, 2015). As sequências geradas foram depositadas no NCBI-GenBank, com os seguintes códigos de acesso: linhagem TCP 15a (PV340226), TCP 21a (PV340227) e TCP 30a (PV340228).

As sequências obtidas foram reunidas com as sequências utilizadas por Cafaro *et al.* (2010) para a obtenção do conjunto de dados para realizar a análise filogenética. A matriz de sequências (tamanho total: 1398 pares de base) foi submetida ao alinhamento via *software* Allview v1.30 (Larsson, 2014) com o *plug-in* MUSCLE v3.8.425 (Edgar, 2004). Após o alinhamento, foi utilizado o *software* IQ-TREE online (Trifinopoulos *et al.*, 2016) para realizar a inferência filogenética com o algoritmo de máxima verossimilhança. O suporte dos nós foi

calculado com 1000 pseudoréplicas de *bootstrap* ultrarápidos. A árvore filogenética final foi visualizada e editada no *software* Figtree v1.4.4 (Rambaut, 2018) e posteriormente refinado no *software* Inkscape (Inkscape Project, 2023)

3.3 Ensaios de co-cultivos entre *Pseudonocardia* e fungos

Para avaliar a interação das *Pseudonocardia* frente a *E. nivea*, *E. weberi* e *L. gongylophorus*, foi empregado o método de cultura pareada, como descrito por Meirelles *et al.* (2014). Neste método, as actinobactérias foram semeadas a 1 cm da borda da placa de Petri (90 x 15 mm, JProLab, São José dos Pinhais, PR, Brasil) contendo meio YMA. As placas foram incubadas durante 25 dias, a 25 °C, no escuro. Tal procedimento é denominado de *head-start*, visto que as actinobactérias apresentam crescimento lento em cultura. Após 25 dias de incubação, um fragmento de 5 mm de diâmetro de micélio dos fungos alvos foi semeado no centro de cada placa. Todas as placas foram incubadas a 25 °C durante 14 dias para os hipocreáceos e 45 dias para *L. gongylophorus*. Os fungos-alvos foram previamente cultivados em YMA, durante 10 dias e 28 dias para os hipocreáceos e *L. gongylophorus*, respectivamente (Figura 1). Definimos como o último dia do experimento aquele em que um dos tratamentos tenha ocupado completamente a área da placa em todas as pseudorréplicas.

Os controles do experimento consistiram em placas de Petri com meio YMA semeadas apenas com os fungos-alvos, na ausência das actinobactérias. Em seguida as placas foram incubadas durante o mesmo período dos outros tratamentos nas condições descritas acima. No total, foram realizados co-cultivos entre três actinobactérias frente aos três isolados de *E. nivea*, um isolado de *E. weberi* e um isolado de *L. gongylophorus*, em um total de 15 combinações de culturas pareadas, além das placas controle contendo apenas os fungos alvos. Durante a execução dos experimentos, o número de placas em cada ensaio variou devido às contaminações das placas com microrganismos não desejados (Tabela 2).

Os dados de crescimento de cada microrganismo, tanto nos co-cultivos, quanto nos controles, foram obtidos através da digitalização das placas de Petri em *scanner* HP Deskjet 2050 J510 series. A digitalização foi realizada diariamente, durante os 14 dias de experimento para os fungos antagonistas e a cada cinco dias, até completar 45 dias, para *L. gongylophorus*, devido ao crescimento naturalmente mais lento. A área de crescimento (em cm²) das colônias de cada microrganismo foi mensurada no *software* ImageJ (Schneider; Rasband; Eliceiri, 2012). Embora as placas tenham área de cerca de 63,5 cm², a área máxima de medida foi de 48,5 cm²,

devido ao espaço possível de ser delimitado com o marcador utilizado para facilitar a medição posterior, via *software*.

Tabela 2. Número amostral (pseudorréplicas) de cada experimento de co-cultivo.

Actinobactéria	Isolado do fungo (n amostral)				
	LESF 321 ¹	LESF 592	LESF 599	LESF 024	<i>Leucocoprinus gongylophorus</i>
Ausência	14	12	14	11	12
TCP 15a	15	11	12	14	12
TCP 21a	10	14	13	15	12
TCP 30a	6	12	13	10	12

¹LESF: Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2025

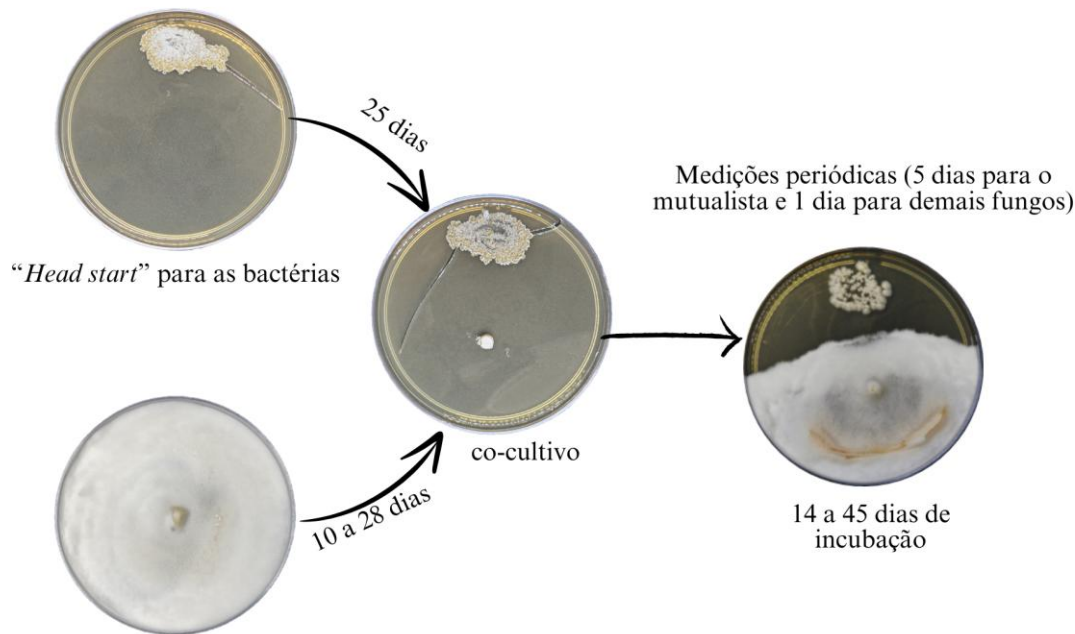


Figura 1. Desenho experimental dos co-cultivos entre *Pseudonocardia* e fungos associados às formigas-cortadeiras. As medições foram realizadas periodicamente com o *software* ImageJ. As interações foram avaliadas em ensaios de co-cultivo em meio YMA.

3.4 Análises dos dados

Para a análise estatística, três caminhos foram seguidos: no primeiro, as medidas de crescimento de *E. nivea* obtidas no último dia de experimento foram utilizadas como variável resposta na construção de um modelo misto linear generalizado (GLMM). Os diferentes isolados do fungo foram utilizados como variáveis aleatórias e os diferentes tratamentos, como variável explicativa. Tal análise teve como principal objetivo entender se diferentes tratamentos apresentam distintas taxas de crescimento. Para isso, foram utilizados os pacotes GLMMTMB

(Brooks *et al.*, 2025), pois os dados demonstraram uma distribuição de erros do tipo BETA. Após as análises, foi checada a adequação do modelo, com a distribuição dos resíduos pelo pacote DHARMA (Hartig; Lohse; Leite, 2024). Por último, foi realizada uma análise *post-hoc* utilizando o pacote emmeans (Lenth *et al.*, 2025), com o ajuste do valor de p das análises pareadas corrigido pelo método de falsas descobertas “fdr”.

O segundo tipo de análise levou em consideração as curvas de crescimento dos microrganismos ao longo do experimento. Utilizamos uma análise de variância do tipo ANOVA, a qual é aplicada com a função nparLD (Noguchi *et al.*, 2022). Essa função aceita dados para análise de forma longitudinal, ou seja, dados que levam em consideração medidas repetidas (tempo, em dias) e que apresentam dependência, como é o caso dos experimentos de co-cultivo (de Oliveira *et al.*, 2023). Como *post-hoc*, foi utilizado o teste de Tukey a 5%.

O último modo de análise estatística foi realizado apenas para os fungos *E. weberi* e *L. gongylophorus*. Para esses, as medidas de crescimento obtidas ao fim do experimento foram utilizadas para comparar o crescimento para cada um dos tratamentos. Os dados não demonstraram normalidade (Teste de Shapiro-Wilk, $p > 0,05$) e nem homogeneidade de variância (Teste de Bartlett $p > 0,05$). Por este motivo, foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para determinar a diferença entre os tratamentos. Para a análise comparativa do crescimento dos fungos, foi utilizado o teste de Wilcox como *post-hoc*, com o fator de correção fdr. Todas as análises foram realizadas no *software* R v.4.5.1 (R Core Team, 2025).

4 RESULTADOS

4.1 Identificação das actinobactérias

Após a montagem dos *contigs*, foi realizada a busca por sequências homólogas no NCBI-GenBank. A busca revelou que as linhagens TCP 15a e TCP 30a apresentaram porcentagem de similaridade de 99,56% e 99,63%, respectivamente, com *Pseudonocardia* sp. EC090907-05 (número de acesso: JQ731845). Esse isolado foi obtido de uma formiga atínea do gênero *Atta*. A linhagem TCP 21a apresentou 99,78% de similaridade com a linhagem *Pseudonocardia* sp. CC031209-02 (número de acesso: EU139574), também obtida de formiga atínea, neste caso, do gênero *Acromyrmex*.

Após reunir os *contigs* para constituir a matriz com sequências de outras actinobactérias, foi elaborada uma filogenia que revelou que a linhagem TCP21a é filogeneticamente próxima à outras linhagens de *Pseudonocardia* isoladas de formigas-cortadeiras, inclusive *Acromyrmex* sp. Por outro lado, as linhagens TCP 15a e TCP 30a formaram um clado separado das demais linhagens de *Pseudonocardia* isoladas de formigas atíneas (Figura 2).

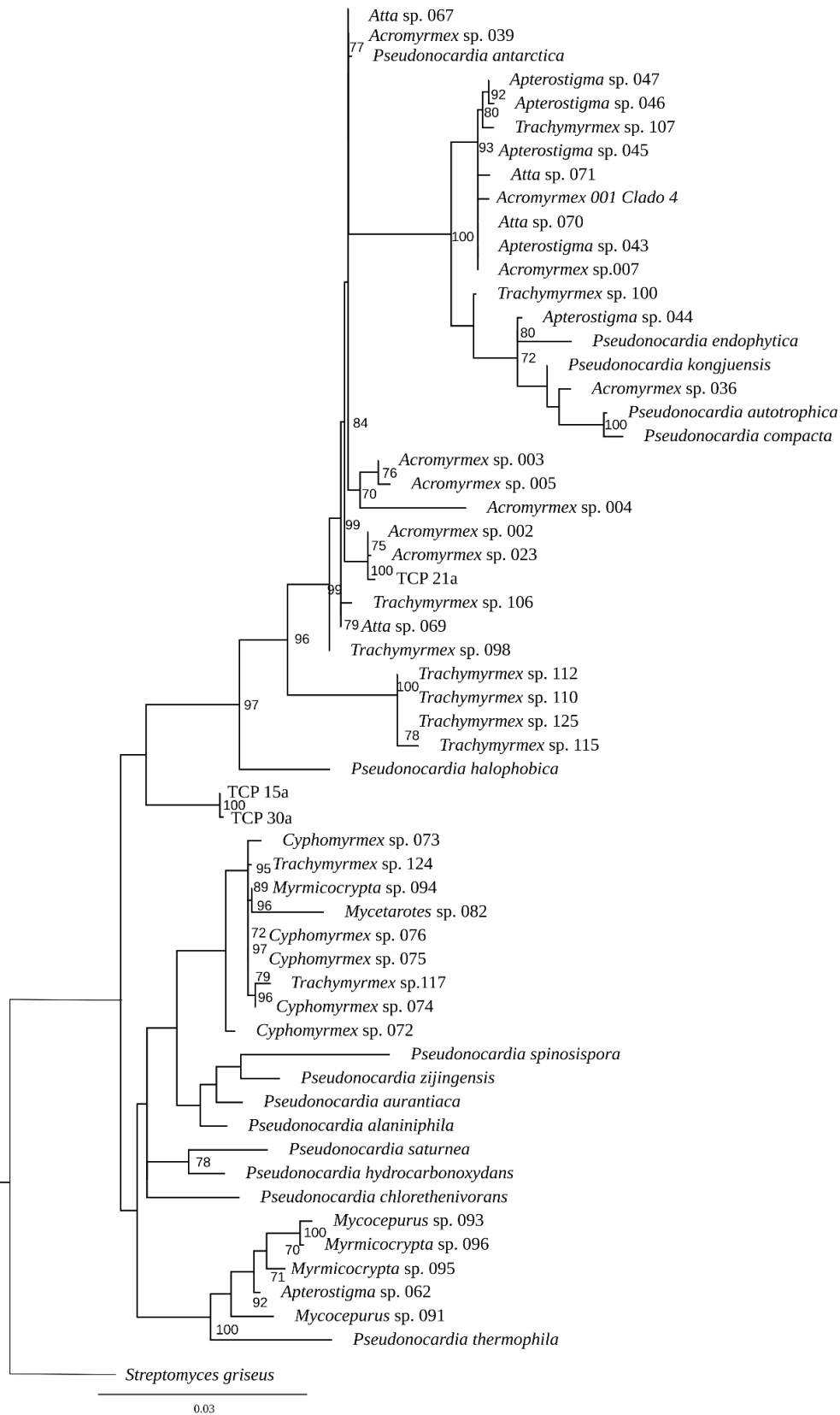


Figura 2. Árvore filogenética inferida com o algoritmo de máxima verossimilhança, com base na região 16S, de actinobactérias de vida livre e associadas às formigas atíneas. O alinhamento final compreendeu 1398 pb. Códigos e nomes das actinobactérias associadas às atíneas estão baseados no gênero da formiga do qual o isolamento foi realizado (Cafaro *et al.*, 2010). Números nos ramos representam valores de *bootstrap* (aqueles abaixo de 70% não estão representados na figura). Os números após cada táxon que estão nos ramos terminais da árvore representam os números do conjunto de dados utilizados em Cafaro *et al.* (2010).

4.2 Ação de *Pseudonocardia* no crescimento de *Escovopsioides nivea*

Quando avaliado o último dia de experimento, observamos diferenças significativas no crescimento de *E. nivea* frente às três linhagens de *Pseudonocardia* sp. (GLMM, $\chi^2 = 296,4$, g.l = 3, $p < 0,05$). Foi observado que a linhagem *Pseudonocardia* sp TCP 15a proporcionou a maior inibição de crescimento (Teste de Tukey, $p < 0,05$, fdr), *Pseudonocardia* sp. TCP 21a (Teste de Tukey, $p < 0,05$, fdr) proporcionou uma inibição intermediária e o isolado *Pseudonocardia* sp. TCP 30a com a menor inibição (Teste de Tukey, $p < 0,05$, fdr, Figura 3A, B, C; Tabela 1A).

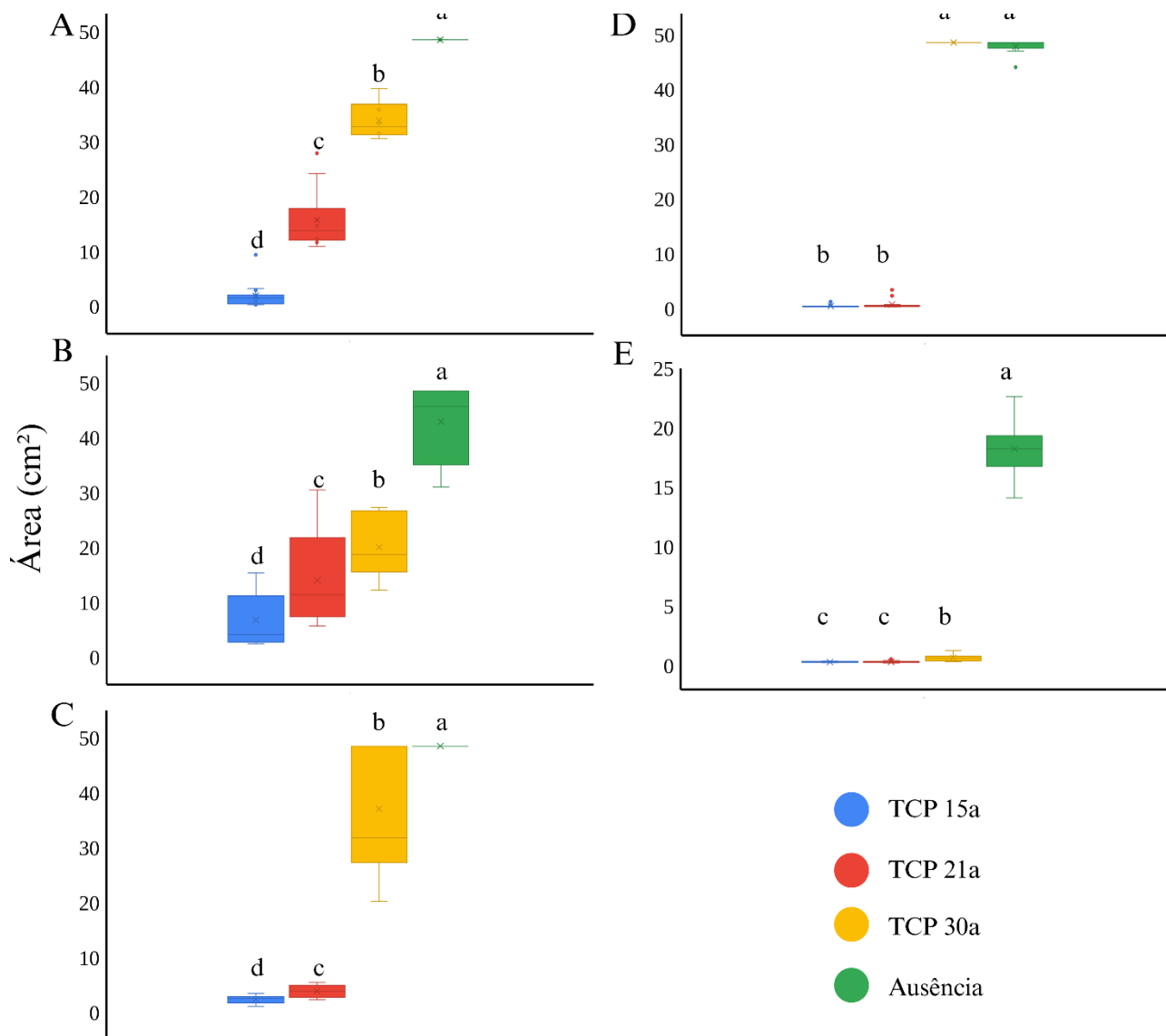


Figura 3. Área micelial (em cm²) no último dia de experimento de *Escovopsioides nivea*, *Escovopsis weberi* e do fungo mutualista *Leucocoprinus gongylophorus*, frente a três linhagens de *Pseudonocardia* sp. (TCP 15a, TCP 21a e TCP 30a). A) *Escovopsioides nivea* LESF 321; B) *E. nivea* LESF 592; C) *E. nivea* LESF 599; D) *Escovopsis weberi* LESF 024 e E) *Leucocoprinus gongylophorus*. Letras distintas denotam diferenças significativas no crescimento de cada fungo na presença das actinobactérias.

Embora tenham sido observadas diferenças entre todos os tratamentos, quando analisado o último dia de experimento, as análises das curvas de crescimento nem sempre apresentaram o mesmo resultado. Observamos diferenças significativas no crescimento dos três isolados de *E. nivea* frente às três linhagens de *Pseudonocardia* sp. (nparLD, Wald-type, g.l.= 3, $p < 0,05$, Figura 4, Tabela A2, A3, A4).

As três linhagens de *Pseudonocardia* sp. inibiram significativamente o crescimento micelial dos isolados *E. nivea* LESF 321, *E. nivea* LESF 592 e *E. nivea* LESF 599, em relação ao controle, ao longo do experimento (Teste de Tukey, $p < 0,05$, Figura 4A, B, C, Tabelas 2A, 3A, 4A). *Pseudonocardia* sp. TCP 15a proporcionou a maior inibição de *E. nivea* LESF 321, seguida de *Pseudonocardia* sp. TCP 21a e *Pseudonocardia* sp. TCP 30a (Teste de Tukey, $p < 0,05$, Figura 4A, Tabela A2). Quando analisamos as inibições enfrentadas pelo isolado *E. nivea* LESF 592, todas as três linhagens de *Pseudonocardia* diferiram sua intensidade de inibição (nparLD, Wald-type, g.l.= 3, $p < 0,05$, Figura 4B, Tabela A3). Neste experimento a linhagem *Pseudonocardia* sp. TCP15a proporcionou a inibição de crescimento mais intensa (Teste de Tukey, $p < 0,05$), *Pseudonocardia* sp. TCP 21a proporcionou uma inibição intermediária (Teste de Tukey, $p < 0,05$) e o isolado *Pseudonocardia* sp. TCP 30a com a inibição menos intensa (Teste de Tukey, $p < 0,05$). Por outro lado, *Pseudonocardia* sp. TCP15a e *Pseudonocardia* sp. TCP 21a não diferiram significativamente com relação a inibição de *E. nivea* LESF 599 (Teste de Tukey, $p > 0,05$, Figura 4C, Tabela A4), porém ambas inibiram significativamente mais que *Pseudonocardia* sp. TCP 30a (Teste de Tukey, $p < 0,05$, Figura 4C, Tabela A4).

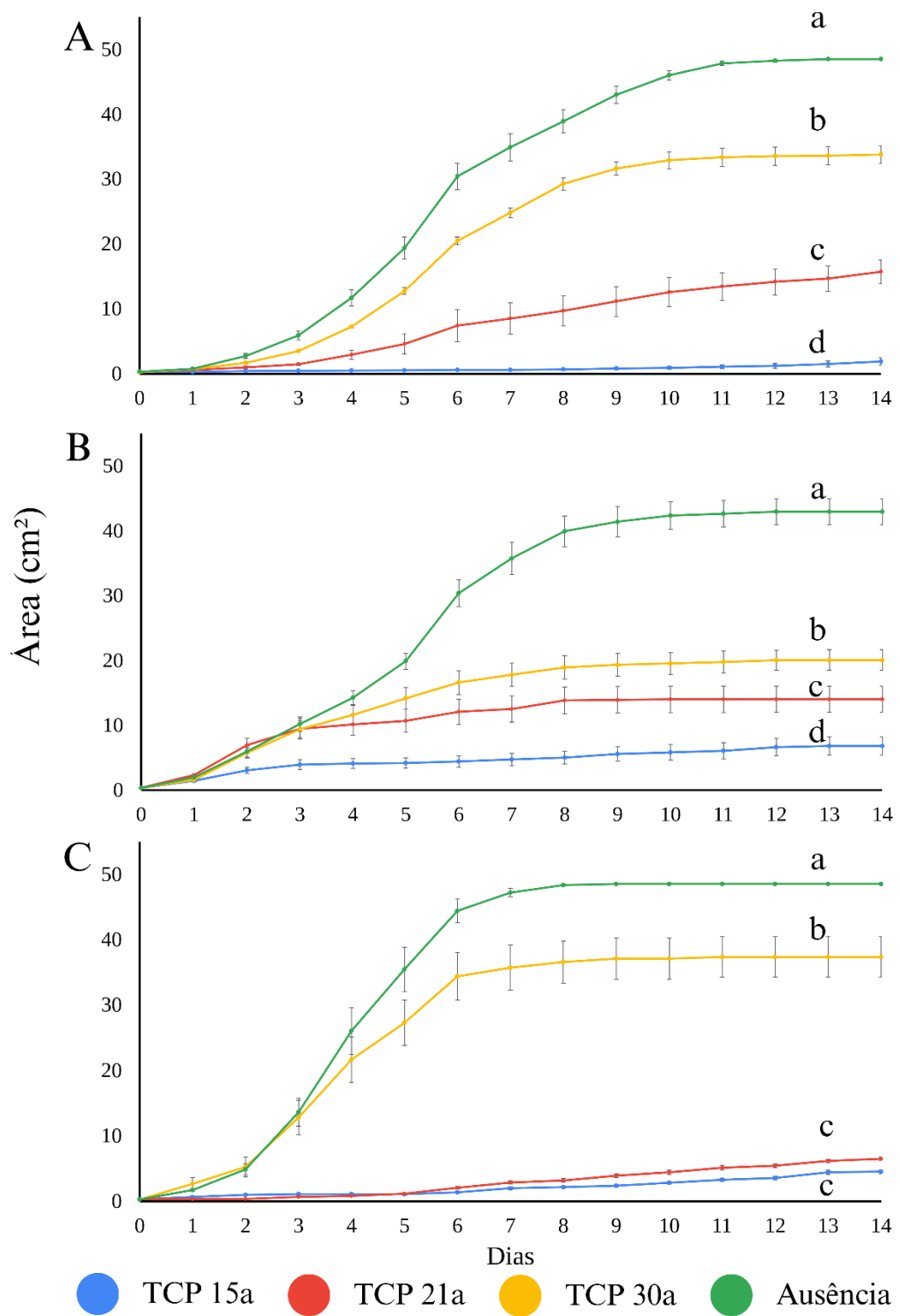


Figura 4. Curvas de crescimento dos isolados de *Escovopsioides nivea* associados às formigas-cortadeiras do gênero *Acromyrmex* (A: LESF 321; B: LESF 592; C: LESF 599), na presença e ausência de três linhagens de *Pseudonocardia* sp. (TCP 15a, TCP 21a e TCP 30a). Letras distintas denotam diferenças significativas (NparLD, Tukey, $p < 0,05$)

Quando confrontadas com *E. weberi*, fungo parasita do sistema, as três linhagens de *Pseudonocardia* sp. apresentaram variações no efeito do crescimento do fungo (nparLD, Wald-type, g.l.= 3, $p < 0,05$, Figura 5A, Tabela A5). *Pseudonocardia* sp. TCP 15a inibiu significativamente mais que *Pseudonocardia* sp. TCP 21a (Teste de Tukey, $p < 0,05$, Figura 5A, Tabela A5). Por outro lado, a linhagem *Pseudonocardia* sp. TCP 30a não diferiu significativamente do controle (Teste de Tukey, $p > 0,05$, Figura 5A, Tabela A5).

Quando analisamos o último dia de experimento, foram observadas diferenças significativas no crescimento de *E. weberi*, frente as linhagens de *Pseudonocardia* (Kruskal-Wallis, $\chi^2 = 57.895$, g.l = 5, $p < 0,05$, Figura 3D, Tabela 1A). *Escovopsis weberi* na presença da linhagem *Pseudonocardia* sp. TCP 30a não apresentou diferença de crescimento em relação ao controle (Pairwise Wilcox, $p < 0,05$, Figura 3D, Tabela A1), entretanto, frente às linhagens *Pseudonocardia* sp. TCP 15a e TCP 21a, *E. weberi* foi inibido significativamente, porém não diferiram entre si (Pairwise Wilcox, $p < 0,05$, Figura 3D, Tabela A1).

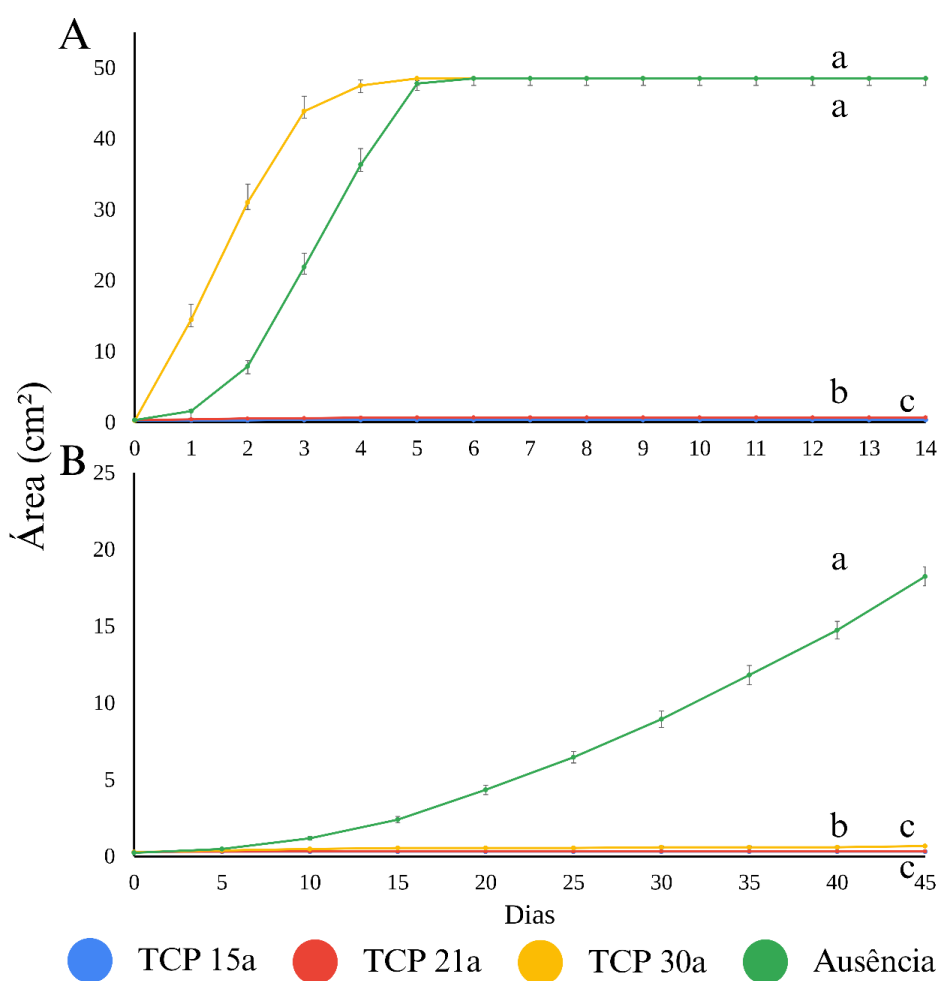


Figura 5. Curvas de crescimento de *Escovopsis weberi* (A) e *Leucocoprinus gongylophorus* (B) associados às formigas-cortadeiras do gênero *Acromyrmex*, na presença e ausência de três linhagens de *Pseudonocardia* sp. (TCP 15a, TCP 21a e TCP 30a). Letras distintas denotam diferenças significativas (NparLD, Tukey, $p < 0,05$).

O crescimento do fungo mutualista das formigas, *L. gongylophorus*, foi inibido significativamente frente a todas as linhagens de *Pseudonocardia* sp. (nparLD, Wald-type, g.l.= 3, $p < 0,05$, Figura 5B, Tabela A6). Entre as linhagens de *Pseudonocardia*, TCP 30a proporcionou uma menor inibição ao longo do tempo, quando comparada com as demais linhagens (Teste de Tukey, $p < 0,05$, Figura 5B, Tabela A6), que não diferiram entre si (Teste de Tukey, $p > 0,05$, Figura 5B, Tabela A6). Os resultados no 45º dia de co-cultivo refletiram os resultados obtidos nas curvas de crescimento (Kruskal-Wallis, $\chi^2 = 36,18$, g.l = 3, $p < 0,05$, Pairwise Wilcox) (Figura 2E, Tabela A1).

Com relação aos padrões de interação nos ensaios de co-cultivo, observamos que o principal foi o de inibição por *Pseudonocardia*, combinado com repulsão do micélio dos fungos. Esse padrão foi observado com maior intensidade quando *E. nivea* foi desafiado frente à linhagem TCP 15a. (Figura 6). Dentre todas as combinações de co-cultivo, apenas no confronto entre o isolado *E. weberi* LESF 024 e a linhagem *Pseudonocardia* sp. TCP 30a, observamos um padrão de crescimento do fungo sobre a colônia da bactéria (Figura 6).

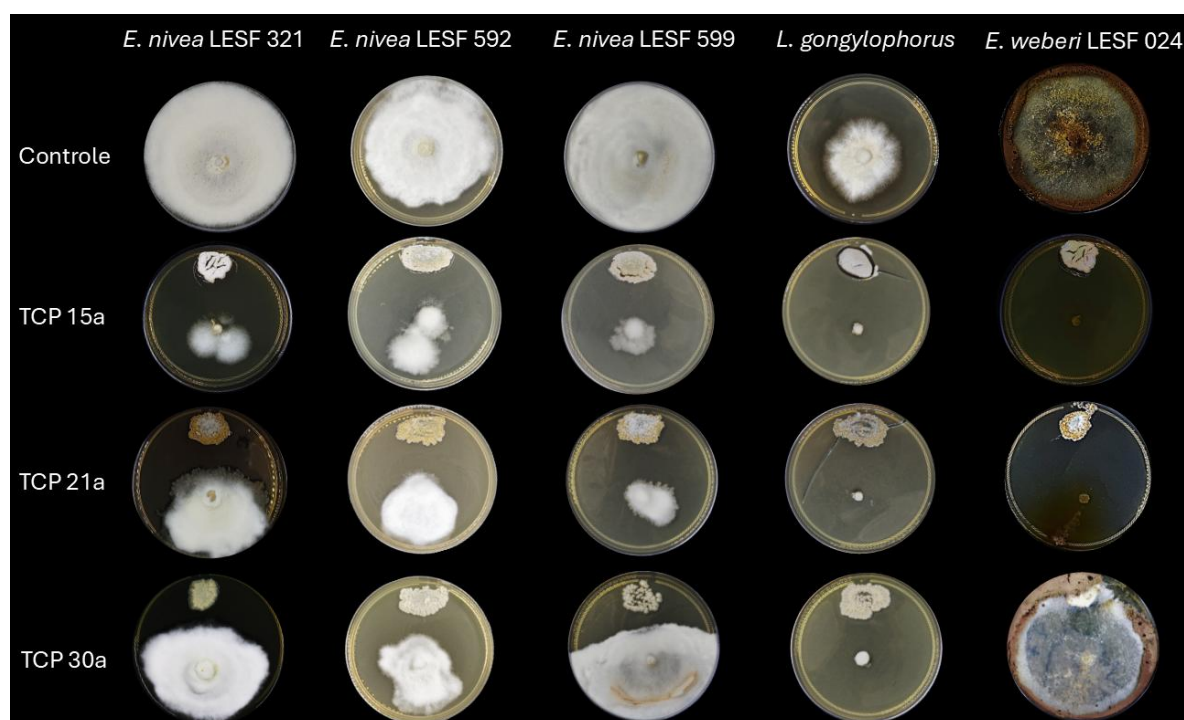


Figura 6. Padrões de interação entre linhagens de *Pseudonocardia* (códigos TCP, colônias na parte de cima das placas) e fungos associados às formigas-cortadeiras (colônias no centro das placas). Controle: fungos semeados no centro da placa, na ausência de *Pseudonocardia*.

5 DISCUSSÃO

Nossos resultados sugerem que *Pseudonocardia* desempenha um papel na defesa do jardim de fungo das formigas, não apenas contra a *E. weberi*, como já é conhecido (Currie *et al.*, 1999), mas também, contra outros fungos filogeneticamente relacionados, como *E. nivea*. A capacidade de *Pseudonocardia* em inibir múltiplos antagonistas fúngicos reforça a importância dessas bactérias como simbiontes defensivos no sistema das formigas cultivadoras de fungos (Batey *et al.*, 2020). *Escovopsioides nivea* é considerado como um antagonista não específico do fungo cultivado pelas atíneas (Osti; Rodrigues, 2018; Mendonça *et al.*, 2021; Pietrobon *et al.*, 2022). Nossos resultados indiretamente reforçam esse papel ecológico, pois foi observada inibição frente a um simbiote responsável pela defesa química do formigueiro.

As actinobactérias encontradas nas colônias de *Acromyrmex* são organismos notórios pela secreção de metabólitos secundários com propriedades antibacterianas e antifúngicas (Haeder *et al.*, 2009; Batey *et al.*, 2020; Goldstein; Klassen, 2020). Esses metabólitos podem não ser específicos para os antagonistas do sistema (Waksman; Lechevalier; Schaffner, 1965; Sen *et al.*, 2009; Sousa *et al.*, 2023), portanto, a inibição observada frente a todos os fungos avaliados neste estudo poderia ser esperada, entretanto, os ensaios demonstraram que alguns fungos, são capazes de resistir a esses compostos e manter seu crescimento mesmo na presença das actinobactérias.

A inibição do crescimento de *E. nivea*, que ocorreu frente a todas as linhagens de actinobactérias, não foi semelhante àquela observada para outro representante presente no formigueiro, o fungo *Escovopsis*. Embora seja um parasita, *Escovopsis* também pode se comportar como um oportunista, dependendo do contexto (Jiménez-Gómez *et al.*, 2021). Entretanto, estudos apontam para uma coevolução entre *Escovopsis* e *Pseudonocardia*, com o primeiro produzindo metabólitos anti-*Pseudonocardia*, quando em contato com o fungo mutualista (Poulsen *et al.*, 2010; Heine *et al.*, 2018). Portanto, ao longo do tempo de coexistência, esse fungo pode ter desenvolvido mecanismos capazes de sobrepujar a inibição por algumas linhagens de *Pseudonocardia*, como o observado para a linhagem TCP 30a.

Neste estudo observamos que todas as linhagens de *Pseudonocardia* inibiram o fungo mutualista, semelhante ao observado em outros estudos (Sen *et al.*, 2009; Poulsen; Currie, 2010). Tal observação parece contraditória, pois o fungo cultivado e *Pseudonocardia* mantêm um mutualismo defensivo, sendo que, quanto maior a cobertura da formiga por actinobactérias, mais provável que as responsabilidades no formigueiro estejam relacionadas com o cuidado do jardim de fungo (Fladerer; Bucar, 2022). É possível que a inibição observada seja devida a

ausência de toda a microbiota associada a *L. gongylophorus* e ao jardim de fungo, já que esse fungo não vive isolado de outros microrganismos presentes no jardim (Barcoto *et al.*, 2020; Martiarena *et al.*, 2023). A comunidade bacteriana associada ao mutualista pode ser fator importante em suas interações com outros microrganismos associados ao sistema. Portanto, estudos futuros deverão tentar elucidar a relação entre esses simbioss, demonstrando como a inibição observada *in vitro* pode ser evitada dentro das colônias.

Diferença da intensidade de inibição de *Escovopsis* por diferentes linhagens de actinobactérias é algo que já foi observado (Poulsen *et al.*, 2010). Neste estudo, demonstramos que isso também ocorre para *E. nivea*. Esse resultado pode estar relacionado: (i) o quanto o isolado fúngico é suscetível aos compostos, (ii) a diferenças na taxa de produção dos compostos e (iii) potenciais diferenças entre linhagens bacterianas em relação à composição de compostos produzidos (Poulsen *et al.*, 2010). Além disso, em um cenário com múltiplas linhagens de *Pseudonocardia* em uma única colônia, a proteção do formigueiro pode ser mantida através da seleção de linhagens com maior capacidade de inibir os invasores (Worsley *et al.*, 2021).

Também é cabível considerar que a inibição dos fungos por *Pseudonocardia* pode ter sido influenciada por procedimentos laboratoriais, uma vez que foi utilizado apenas um meio de cultivo e uma temperatura de incubação. Sabe-se que interações entre diferentes organismos variam conforme o meio onde eles estão inseridos (Méthot; Alizon, 2014; Mathis; Bronstein, 2020). Portanto, estudos em outras condições de incubação são essenciais para o melhor entendimento das relações entre todos os microrganismos presentes nos formigueiros das atíneas.

Em um viés aplicado, este estudo demonstra a ação antimicrobiana entre os microrganismos presentes no formigueiro, sugerindo a presença de compostos com potencial antimicrobiano, como já observado anteriormente (Haeder *et al.*, 2009; Batey *et al.*, 2020; Grundmann *et al.*, 2024). Com a crescente necessidade do uso de substâncias naturais provenientes de microrganismos na agricultura (Boro *et al.*, 2022), o sistema das atíneas pode ser alvo de prospecção de compostos ativos, algo essencial para escapar das consequências da resistência antimicrobiana frente a compostos já empregados.

6 CONCLUSÃO

As actinobactérias do gênero *Pseudonocardia*, associadas às formigas-cortadeiras do gênero *Acromyrmex*, podem ser uma linha de defesa para combater fungos antagonistas, dentre eles, *E. nivea* e *Escovopsis*, entretanto também podem interagir negativamente com o fungo mutualista. Tal resultado aponta que mais estudos são necessários para compreender a dinâmica da proteção conferida por *Pseudonocardia* e a interação desta com a microbiota do jardim, de modo a não prejudicar o fungo cultivado que nutre a colônia.

REFERÊNCIAS

- AUGUSTIN, J. O. *et al.* Yet more “weeds” in the garden: Fungal novelties from nests of leaf-cutting ants. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 12, 2013.
- BARCOTO, M. O. *et al.* Fungus-growing insects host a distinctive microbiota apparently adapted to the fungiculture environment. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2020.
- BATEY, S. F. D. *et al.* Chemical warfare between fungus-growing ants and their pathogens. **Current Opinion in Chemical Biology**, [s. l.], v. 59, p. 172–181, 2020.
- BIZARRIA, R.; DE CASTRO PIETROBON, T.; RODRIGUES, A. Uncovering the Yeast Communities in Fungus-Growing Ant Colonies. **Microbial Ecology**, [s. l.], v. 86, n. 1, p. 624–635, 2023.
- BORO, M. *et al.* Microorganisms in biological control strategies to manage microbial plant pathogens: a review. **Archives of Microbiology**, [s. l.], v. 204, n. 11, p. 666, 2022.
- BROOKS, M. *et al.* **glmmTMB: Generalized Linear Mixed Models using Template Model Builder**. Versão 1.1.11. [S. l.: s. n.], 2025. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/glmmTMB/index.html>. Acesso em: 3 jul. 2025.
- CAFARO, M. J. *et al.* Specificity in the symbiotic association between fungus-growing ants and protective *Pseudonocardia* bacteria. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s. l.], v. 278, n. 1713, p. 1814–1822, 2010.
- CRISTIANO, M. P. *et al.* *Amoimyrmex* Cristiano, Cardoso & Sandoval, gen. nov. (Hymenoptera: Formicidae): a new genus of leaf-cutting ants revealed by multilocus molecular phylogenetic and morphological analyses. **Austral Entomology**, [s. l.], v. 59, n. 4, p. 643–676, 2020.
- CURRIE, C. R. *et al.* Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, [s. l.], v. 398, n. 6729, p. 701–704, 1999.
- CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 96, n. 14, p. 7998–8002, 1999.
- DE OLIVEIRA, K. B. *et al.* Fungal Cultivars of Higher Attine Ants Promote Escovopsis Chemotropism. **Current Microbiology**, [s. l.], v. 81, n. 1, p. 37, 2023.
- DELLA LUCIA, T. M.; GANDRA, L. C.; GUEDES, R. N. Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. **Pest Management Science**, [s. l.], v. 70, n. 1, p. 14–23, 2014.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004.
- FABRICIUS, J. C. **Systema Piezatorum secundum ordines, genera, species, adjectis synonymis, locis, observationibus, descriptionibus**. Brunswick: C. Reichard, 1804.
- FERNÁNDEZ-MARÍN, H. *et al.* Reduced biological control and enhanced chemical pest

management in the evolution of fungus farming in ants. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s. l.], v. 276, n. 1665, p. 2263–2269, 2009.

FLADERER, J.-P.; BUCAR, F. Behavioral Specialization of Workers of the Leafcutter Ant *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera: Formicidae) with an External Bacterial Layer. **Journal of Insect Behavior**, [s. l.], v. 35, n. 5, p. 127–135, 2022.

GOLDSTEIN, S. L.; KLASSEN, J. L. Pseudonocardia Symbionts of Fungus-Growing Ants and the Evolution of Defensive Secondary Metabolism. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 11, 2020.

GRUNDMANN, C. O. *et al.* The insect microbiome is a vast source of bioactive small molecules. **Natural Product Reports**, [s. l.], 2024. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2024/np/d3np00054k>. Acesso em: 23 abr. 2024.

HAEDER, S. *et al.* Candidicin-producing *Streptomyces* support leaf-cutting ants to protect their fungus garden against the pathogenic fungus *Escovopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 106, n. 12, p. 4742–4746, 2009.

HARTIG, F.; LOHSE, L.; LEITE, M. de S. **DHARMA: Residual Diagnostics for Hierarchical (Multi-Level / Mixed) Regression Models**. Versão 0.4.7. [S. l.: s. n.], 2024. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/DHARMA/index.html>. Acesso em: 3 jul. 2025.

HEIM, R. A propos du *Rozites gongylophora* A. Möller. **Revue de Mycologie**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 293–299, 1957.

HEINE, D. *et al.* Chemical warfare between leafcutter ant symbionts and a co-evolved pathogen. **Nature Communications**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 2208, 2018.

HUANG, Y.; GOODFELLOW, M. Pseudonocardia. In: **BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATICS OF ARCHAEA AND BACTERIA**. [S. l.]: John Wiley & Sons, Ltd, 2015. p. 1–32. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118960608.gbm00184>. Acesso em: 25 out. 2024.

INKSCAPE PROJECT. **Inkscape**. Versão 1.3.2. [S. l.: s. n.], 2023. windows. Disponível em: <https://inkscape.org/>.

JIMÉNEZ-GÓMEZ, I. *et al.* Host Susceptibility Modulates *Escovopsis* Pathogenic Potential in the Fungiculture of Higher Attine Ants. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 12, 2021.

KOOIJ, P. W. *et al.* Evolutionarily advanced ant farmers rear polyploid fungal crops. **Journal of Evolutionary Biology**, [s. l.], v. 28, n. 11, p. 1911–1924, 2015.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA Sequencing. In: **STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic**. [S. l.]: John Wiley and Sons, 1991. p. 115–175.

LARSSON, A. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. **Bioinformatics (Oxford, England)**, [s. l.], v. 30, n. 22, p. 3276–3278, 2014.

LENTH, R. V. *et al.* **Emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means.** Versão 1.11.1. [S. l.: s. n.], 2025. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/emmeans/index.html>. Acesso em: 3 jul. 2025.

LI, H. *et al.* Convergent evolution of complex structures for ant-bacterial defensive symbiosis in fungus-farming ants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 115, n. 42, p. 10720–10725, 2018.

MARTIARENA, M. J. S. *et al.* The Hyphosphere of Leaf-Cutting Ant Cultivars Is Enriched with Helper Bacteria. **Microbial Ecology**, [s. l.], v. 86, n. 3, p. 1773–1788, 2023.

MATHIS, K. A.; BRONSTEIN, J. L. Our Current Understanding of Commensalism. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, [s. l.], v. 51, n. Volume 51, 2020, p. 167–189, 2020.

MAYR, G. Formicidae. In: NOVARA EXPEDITION. **Reise der österreichischen Fregatte Novara um die Erde in den Jahren 1857, 1858, 1859 unter den Befehlen des Commodore B. von Wüllerstorff-Urbair**. Viena: K. Gerold's Sohn, 1865. v. 2, p. 119.

MEIRELLES, L. A. *et al.* Broad Escovopsis-inhibition activity of *Pseudonocardia* associated with *Trachymyrmex* ants. **Environmental Microbiology Reports**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 339–345, 2014.

MENDONÇA, D. M. F. de *et al.* Low Virulence of the Fungi *Escovopsis* and *Escovopsioides* to a Leaf-Cutting Ant-Fungus Symbiosis. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 12, 2021.

MÉTHOT, P.-O.; ALIZON, S. What is a pathogen? Toward a process view of host-parasite interactions. **Virulence**, [s. l.], v. 5, n. 8, p. 775–785, 2014.

MIYASHIRA, C. H. *et al.* Comparison of radial growth rate of the mutualistic fungus of *Atta sexdens rubropilosa* forel in two culture media. **Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, [s. l.], v. 41, n. 2, p. 506–511, 2010.

MONTOYA, Q. V. *et al.* Fungi inhabiting attine ant colonies: reassessment of the genus *Escovopsis* and description of *Luteomyces* and *Sympodiorosea* gens. nov. **IMA Fungus**, [s. l.], v. 12, n. 1, 2021.

MONTOYA-LERMA, J. *et al.* Leaf-cutting ants revisited: Towards rational management and control. **International Journal of Pest Management**, [s. l.], v. 58, n. 3, p. 225–247, 2012.

MUCHOVEJ, J. J.; DELLA LUCIA, T. M. *Escovopsis*, a new genus from leaf cutting ant nests to replace *Phialocladus* nomen invalidum. **Mycotaxon**, [s. l.], v. 37, p. 191–195, 1990.

NOGUCHI, K. *et al.* **npard: Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiments.** Versão 2.2. [S. l.: s. n.], 2022. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/npard/index.html>. Acesso em: 3 jul. 2025.

OKONECHNIKOV, K. *et al.* Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 28, n. 8, p. 1166–1167, 2012.

OSTI, J. F.; RODRIGUES, A. *Escovopsioides* as a fungal antagonist of the fungus cultivated

by leafcutter ants. **BMC Microbiology**, [s. l.], v. 18, n. 1, 2018.

PIETROBON, T. de C. *et al.* Escovopsioides nivea is a non-specific antagonistic symbiont of ant-fungal crops. **Fungal Ecology**, [s. l.], v. 56, p. 101140, 2022.

POULSEN, M. *et al.* Variation in Pseudonocardia antibiotic defence helps govern parasite-induced morbidity in Acromyrmex leaf-cutting ants. **Environmental Microbiology Reports**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 534–540, 2010.

POULSEN, M.; CURRIE, C. R. Symbiont interactions in a tripartite mutualism: exploring the presence and impact of antagonism between two fungus-growing ant mutualists. **PloS One**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. e8748, 2010.

R CORE TEAM. **R**. Versão 4.5.1. Viena, Áustria: R Foundation for Statistical Computing, 2025. Multiplataforma (Windows, macOS, Linux). Disponível em: <https://www.r-project.org/>. Acesso em: 14 jun. 2025.

RAMBAUT, A. **FigTree**. Versão 1.4.4. Edimburgo: Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, 2018. Windows, macOS, Linux. Disponível em: <https://github.com/rambaut/figtree>. Acesso em: 7 jul. 2025.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis. **Nature methods**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 671–675, 2012.

SCHULTZ, T. R. *et al.* The coevolution of fungus-ant agriculture. **Science**, [s. l.], v. 386, n. 6717, p. 105–110, 2024.

SCHULTZ, T. R. The Convergent Evolution of Agriculture in Humans and Fungus-Farming Ants. In: SCHULTZ, T. R.; GAWNE, R.; PEREGRINE, P. N. (org.). **The Convergent Evolution of Agriculture in Humans and Insects**. [S. l.]: The MIT Press, 2022. p. 281–314. Disponível em: <https://direct.mit.edu/books/book/5272/chapter/3612463/The-Convergent-Evolution-of-Agriculture-in-Humans>. Acesso em: 4 jun. 2024.

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**, [s. l.], v. 105, n. 14, p. 5435–5440, 2008.

SEN, R. *et al.* Generalized antifungal activity and 454-screening of Pseudonocardia and Amycolatopsis bacteria in nests of fungus-growing ants. [s. l.], 2009. Disponível em: www.pnas.org/cgi/content/full/.

SOUSA, F. *et al.* Reviving the interest in the versatile drug nystatin: A multitude of strategies to increase its potential as an effective and safe antifungal agent. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 199, p. 114969, 2023.

SPINOLA, M. Compte rendu des Hyménoptères inédits provenants du voyage entomologique de M. Ghiliani dans le Para en 1846. **Extrait des Mémoires de l'Académie des Sciences de Turin**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 3–78, 1851.

TRIFINOPOULOS, J. *et al.* W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 44, n. W1, p. W232–W235, 2016.

WAKSMAN, S. A.; LECHEVALIER, H. A.; SCHAFFNER, C. P. Candicidin and other polyenic antifungal antibiotics. **Bulletin of the World Health Organization**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 219–226, 1965.

WEBER, N. A. **Gardening Ants, the Attines**. [S. l.]: American Philosophical Society, 1972.

WORSLEY, S. F. *et al.* Competition-based screening helps to secure the evolutionary stability of a defensive microbiome. **BMC Biology**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 205, 2021.

APÊNDICE

Tabela A1. Área micelial dos fungos associados às atíneas (média $\pm$ erro padrão, em cm²) na presença e ausência de *Pseudonocardia* sp. Ensaios de co-cultivo foram realizados em meio YMA durante 14 a 45 dias. As bactérias estão representadas pelos códigos TCP. - Letras diferentes indicam diferenças significativas apenas dentro dos tratamentos do mesmo fungo

Tratamentos	Média $\pm$ erro padrão (cm ²)
<i>Escovopsioides nivea</i> LESF 321	
Ausência	48,5 $\pm$ 0 a
vs TCP 15a	1,48 $\pm$ 0,45 b
vs TCP 21a	14,65 $\pm$ 1,93 c
vs TCP 30a	33,61 $\pm$ 1,4 d
<i>Escovopsioides nivea</i> LESF 592	
Ausência	42,94 $\pm$ 1,97 $\pm$ 0 a
vs TCP 15a	6,80 $\pm$ 1,40 b
vs TCP 21a	14,03 $\pm$ 2,02 c
vs TCP 30a	20,05 $\pm$ 1,59 d
<i>Escovopsioides nivea</i> LESF 599	
Ausência	48,5 $\pm$ 0 a
vs TCP 15a	2,40 $\pm$ 0,21 b
vs TCP 21a	6,16 $\pm$ 0,27 c
vs TCP 30a	37,10 $\pm$ 3,15 d
<i>Escovopsis weberi</i> LESF 024	
Ausência	47,78 $\pm$ 0,41 a
vs TCP 15a	0,37 $\pm$ 0,07 b
vs TCP 21a	0,69 $\pm$ 0,23 b
vs TCP 30a	48,5 $\pm$ 0 a
<i>Leucocoprinus gongylophorus</i>	
Ausência	18,24 $\pm$ 0,61 a
vs TCP 15a	0,31 $\pm$ 0,01 b
vs TCP 21a	0,34 $\pm$ 0,03 b
vs TCP 30a	0,68 $\pm$ 0,09 c

Fonte: Autor, 2025

Tabela A2. Crescimento micelial de *Escovopsioides nivea* LESF 321 (média ± erro padrão, em cm2) na presença e ausência de *Pseudonocardia* sp. Ensaios de co-cultivo foram realizados em meio YMA durante 14 dias. As bactérias estão representadas pelos códigos TCP.

Tratamentos	Dias de crescimento														
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Ausência	0,30±0,02	0,74±0,11	2,71±0,4	5,91±0,69	15,93±4,25	19,37±1,68	30,42±2,05	34,91±2,09	38,92±1,81	43,01±1,34	46±0,73	47,85±0,34	48,25±0,19	48,5±0	48,5±0
vs TCP 15a	0,28±0,01	0,28±0,01	0,40±0,05	0,42±0,05	0,49±0,06	0,49±0,06	0,56±0,07	0,58±0,09	0,65±0,12	0,78±0,17	0,9±0,24	1,06±0,31	1,21±0,39	1,49±0,46	1,89±0,59
vs TCP 21a	0,28±0,02	0,59±0,11	0,96±0,16	1,45±0,19	2,91±0,71	4,58±1,57	7,4±2,46	8,5±2,43	9,7±2,34	11,15±2,31	12,57±2,26	13,43±2,12	14,16±2	14,65±1,93	15,7±1,8
vs TCP 30a	0,2±0,01	0,71±0,07	1,68±0,15	3,49±0,09	7,22±0,18	12,75±0,53	20,48±0,58	24,8±0,74	29,27±0,96	31,61±1,01	32,9±1,27	33,35±1,38	33,54±1,42	33,61±1,4	33,78±1,39

Fonte: Autor, 2025

Tabela A3. Crescimento micelial de *Escovopsioides nivea* LESF 592 (média ± erro padrão, em cm2) na presença e ausência de *Pseudonocardia* sp. Ensaios de co-cultivo foram realizados em meio YMA durante 14 dias. As bactérias estão representadas pelos códigos TCP.

Códigos TCT.																
Tratamentos	Dias de crescimento															
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Ausência	0,32±0,01	1,95±0,24	5,95±0,87	10,19±1,12	14,26±1,06	19,89±1,23	30,37±2,07	35,76±2,46	39,94±2,37	41,4±2,31	42,37±2,14	42,63±2,06	42,94±1,97	42,94±1,97	42,94±1,97	
vs TCP 15a	0,31±0,01	1,43±0,16	3,04±0,51	3,93±0,75	4,10±0,78	4,19±0,79	4,41±0,85	4,74±0,94	5,02±0,99	5,56±1,11	5,81±1,19	6,06±1,28	6,62±1,35	6,80±1,40	6,80±1,40	
vs TCP 21a	0,32±0,01	2,30±0,24	6,93±1,03	9,45±1,59	10,12±1,66	10,68±1,78	12,08±1,96	12,52±2,02	13,84±2,05	13,92±2,06	14,01±2,04	14,01±2,04	14,02±2,03	14,03±2,02	14,03±2,02	
vs TCP 30a	0,32±0,01	1,58±0,15	5,75±0,78	9,41±1,35	11,60±1,50	14,15±1,71	16,60±1,84	17,81±1,83	18,93±1,80	19,33±1,74	19,54±1,68	19,77±1,68	20,05±1,59	20,05±1,59	20,05±1,59	

Fonte: Autor, 2025

Tabela A4. Crescimento micelial de *Escovopsioides nivea* LESF 599 (média ± erro padrão, em cm2) na presença e ausência de *Pseudonocardia* sp. Ensaios de co-cultivo foram realizados em meio YMA durante 14 dias. As bactérias estão representadas pelos códigos TCP.

Tratamentos	Dias de crescimento														
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Ausência	0,29±0,01	1,73±0,22	4,88±0,85	13,61±2,13	26,03±3,60	35,45±3,36	44,40±1,80	47,20±0,65	48,35±0,15	48,50	48,50	48,50	48,50	48,50	48,50
vs TCP 15a	0,30±0,01	0,66±0,08	0,99±0,13	1,09±0,15	1,10±0,15	1,10±0,15	1,38±0,14	1,99±0,21	2,18±0,21	2,40±0,21	2,84±0,22	3,30±0,25	3,56±0,26	4,43±0,32	4,53±0,30
vs TCP 21a	0,32±0,02	0,32±0,02	0,36±0,04	0,68±0,10	0,81±0,13	1,15±0,15	2,07±0,21	2,88±0,24	3,20±0,28	3,91±0,32	4,44±0,36	5,13±0,36	5,44±0,30	6,16±0,27	6,50±0,26
vs TCP 30a	0,27±0,02	2,67±0,95	5,26±1,52	12,80±2,67	21,65±3,46	27,28±3,36	34,38±3,66	35,71±3,45	36,58±3,23	37,10±3,15	37,10±3,15	37,36±3,07	37,36±3,07	37,36±3,07	37,36±3,07

Fonte: Autor, 2025

Tabela A5. Crescimento micelial de *Escovopsis weberi* LESF 024 (média ± erro padrão, em cm2) na presença e ausência de *Pseudonocardia* sp. Ensaios de co-cultivo foram realizados em meio YMA durante 14 dias. As bactérias estão representadas pelos códigos TCP.

Dias de crescimento																
Tratamentos																
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Ausência	0,30±0,02	1,6±0,24	7,87±0,83	21,91±1,96	36,36±2,24	47,78±0,41	48,5±0,00	48,5±0,00	48,5±0,00	48,5±0,00	48,5±0,00	48,5±0,00	48,5±0,00	48,5±0,00	48,5±0,00	
vs TCP 15a	0,30±0,01	0,30±0,01	0,30±0,01	0,37±0,07	0,37±0,07	0,37±0,07	0,37±0,07	0,37±0,07	0,37±0,07	0,37±0,07	0,37±0,07	0,37±0,07	0,37±0,07	0,37±0,07	0,37±0,07	
vs TCP 21a	0,33±0,01	0,43±0,08	0,54±0,15	0,60±0,17	0,66±0,21	0,69±0,23	0,70±0,23	0,70±0,23	0,70±0,23	0,70±0,23	0,70±0,23	0,70±0,23	0,70±0,23	0,70±0,23	0,70±0,23	
vs TCP 30a	0,25±0,01	14,50±0,01	31,02±0,01	43,89±0,01	47,51±0,01	48,50±0,00	48,5±0,00	48,5±0,00	48,5±0,00	48,5±0,00	48,5±0,00	48,5±0,00	48,5±0,00	48,5±0,00	48,5±0,00	

Fonte: Autor, 2025

Tabela A6. Crescimento micelial *Leucocoprinus gongylophorus* (média $\pm$ erro padrão, em cm²) na presença e ausência de *Pseudonocardia* sp. Ensaios de co-cultivo foram realizados em meio YMA durante 45 dias. As bactérias estão representadas pelos códigos TCP.

Tratamentos	Dias de crescimento									
	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45
Ausência	0,24 $\pm$ 0,01	0,49 $\pm$ 0,03	1,19 $\pm$ 0,4	2,4 $\pm$ 0,2	4,34 $\pm$ 0,31	6,46 $\pm$ 0,38	8,95 $\pm$ 0,53	11,82 $\pm$ 0,63	14,74 $\pm$ 0,57	18,24 $\pm$ 0,61
vs TCP 15a	0,3 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,01
vs TCP 21a	0,3 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,2	0,34 $\pm$ 0,3	0,34 $\pm$ 0,3	0,34 $\pm$ 0,3	0,34 $\pm$ 0,3	0,34 $\pm$ 0,3	0,34 $\pm$ 0,3	0,34 $\pm$ 0,3	0,34 $\pm$ 0,3
vs TCP 30a	0,29 $\pm$ 0,01	0,4 $\pm$ 0,01	0,49 $\pm$ 0,03	0,56 $\pm$ 0,05	0,56 $\pm$ 0,05	0,56 $\pm$ 0,05	0,61 $\pm$ 0,08	0,61 $\pm$ 0,08	0,61 $\pm$ 0,08	0,68 $\pm$ 0,09

Fonte: Autor, 2025