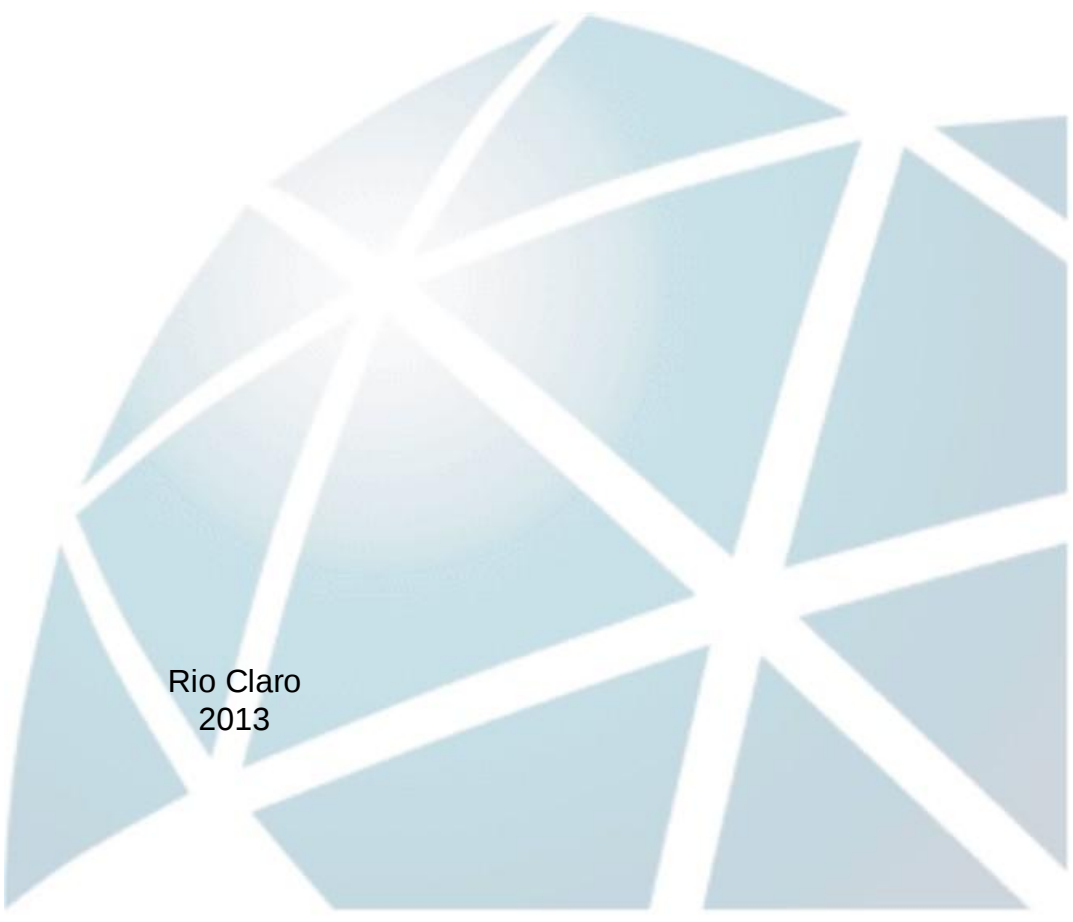

ECOLOGIA

FELIPE PEDROSA CHAGAS

**Papel de *Syncephalastrum racemosum* como
antagonista do fungo cultivado pelas formigas
cortadeiras**



Rio Claro
2013

FELIPE PEDROSA CHAGAS

Papel de *Syncephalastrum racemosum* como antagonista do fungo cultivado
pelas formigas cortadeiras

Orientador: André Rodrigues

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

Rio Claro

2013

595.796 Chagas, Felipe Pedrosa
C433p Papel de *Syncephalastrum racemosum* como antagonista
do fungo cultivado pelas formigas cortadeiras / Felipe Pedrosa
Chagas. - Rio Claro, 2013
39 f. : il., figs., tabs.

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

1. Formiga. 2. Controle biológico. 3. *Atta sexdens*
rubropilosa. 4. Attini. 5. Convenção de Estocolmo. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu pai, à minha mãe, à Marcella e ao professor André Rodrigues.

Ao pessoal do LESF (Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos), Danilo, Jaque, Lucas, Sadala, Rê, Isabela, Mariana, Rafa e Silvio, muito obrigado pela assistência, ajuda, companhia no laboratório e pelo papo amigo mantido muitas vezes.

RESUMO

A principal forma de controle das formigas cortadeiras emprega iscas tóxicas contendo o formicida sulfluramida. Tal composto químico apresenta efeitos danosos ao ambiente, fato que motiva estratégias alternativas de combate dessas formigas. Estudos prévios demonstraram que ninhos de formigas cortadeiras submetidos a tratamentos com inseticidas podem apresentar o fungo *Syncephalastrum racemosum*. Na tentativa de compreender o papel desse fungo nos ninhos das formigas cortadeiras, o presente trabalho investigou o antagonismo de *S. racemosum* frente ao fungo cultivado pelas formigas (*Leucoagaricus gongylophorus*). Em ensaios *in vitro*, o fungo mutualista das formigas foi incubado na presença de *S. racemosum* (n= 6 linhagens). Uma linhagem de *Escovopsis weberi* foi utilizada nos experimentos para fins de comparação, pois sabe-se que esse fungo é considerado parasita especializado de *L. gongylophorus*. Todas as linhagens de *S. racemosum* inibiram significativamente o crescimento de *L. gongylophorus* (ANOVA – 2 critérios, $F= 23,61$, $P < 0,01$). O mesmo ocorreu para a linhagem de *E. weberi*. Não houve diferença significativa na inibição entre as linhagens de *S. racemosum* e *E. weberi* (Teste de Bonferroni, $P > 0,05$). Adicionalmente, verificou-se que as seis linhagens de *S. racemosum*, quando inoculadas diretamente em fragmentos de jardins de fungo desprovidos de operárias, colonizaram o jardim em até 96 h. O mesmo ocorreu para os fragmentos de jardins nos quais *E. weberi* foi inoculado. Tanto *S. racemosum*, quanto *E. weberi* esporularam por completo sobre os fragmentos de jardins. Os resultados do presente estudo sugerem que *S. racemosum* atua como antagonista do fungo das formigas. A possibilidade do uso de *S. racemosum* como agente de controle biológico das formigas cortadeiras é discutida neste trabalho.

Palavras chave: *Atta sexdens rubropilosa*. Attini. Controle Biológico. Convenção de Estocolmo.

ABSTRACT

Currently, the major method for controlling leaf-cutting ants uses toxic baits containing the insecticide sulfluramide. Such compound presents harmful effects to the environment and to human health, which drive the community's concerns towards new strategies for controlling these insects. Previous studies showed the occurrence of *Syncephalastrum racemosum* in nests of the leaf-cutting ants submitted to treatments using insecticides. In order to understand the role of *S. racemosum* in nests of leaf-cutting ants, the present work investigated the antagonism of *S. racemosum* towards the leaf-cutting ant-cultivar (*Leucoagaricus gongylophorus*). Using *in vitro* essays, we co-cultivated *L. gongylophorus* and *S. racemosum* (n= 6 lineages). For comparison, we also used the same setup to test one strain of *Escovopsis weberi*, since this fungus is considered a specialized parasite of the leaf-cutting ant cultivar. All *S. racemosum* strains inhibited the growth of *L. gongylophorus* (ANOVA 2 way, $F= 23,61$, $P < 0,01$). The same was observed for *E. weberi*. There were no significant difference between *S. racemosum* and *E. weberi* inhibition (Bonferroni test, $P > 0,05$). In addition, we verified that all *S. racemosum* strains colonized and sporulated over the fungus garden up to 96 h after garden fragments without workers were inoculated with spores suspensions. Similar results were observed on gardens that were inoculated with spores of *E. weberi*. The results indicate that *S. racemosum* act as antagonist of the leaf-cutting ant cultivar. The putative possibility for using *S. racemosum* as biological control agent of leaf-cutting ants is discussed in the present work.

Keywords: *Atta sexdens rubropilosa*. Attini. Biological Control. Stockholm Convention.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
2.1 Formigas cortadeiras e o fungo mutualista	8
2.2 Micro-organismos associados ao jardim de fungo	9
2.3 Controle de formigas cortadeiras	11
3 OBJETIVOS	15
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 Cultivo e manutenção dos fungos filamentosos.....	16
4.2 Bioensaios in vitro.....	16
4.2.1 Co-cultivo	16
4.2.2 Cultivo direto no jardim de fungos	18
4.3 Testes de viabilidade dos esporos de <i>S. racemosum</i>	19
4.4 Avaliação da natureza do antagonismo de <i>S. racemosum</i>	19
4.5 Forma de análise dos resultados.....	21
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1 Bioensaios de co-cultivo in vitro: efeitos dos microfungos sobre o fungo mutualista ..	23
5.2 Bioensaios de co-cultivo in vitro: efeitos do fungo mutualista sobre os microfungos ..	27
5.3 Cultivo direto dos microfungos sobre o jardim das formigas.....	28
5.4 Avaliação da viabilidade dos esporos dos microfungos.....	30
5.5 Natureza da interação	31
5.5.1 Compostos não-voláteis.....	32
5.5.2 Compostos voláteis	33
6 CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

A Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) é um tratado internacional com o intuito de proteger a saúde humana e o ambiente de compostos químicos de difícil degradação e que apresentam efeitos danosos. Em maio de 2009 aconteceu a 4ª reunião da Convenção de Estocolmo, na qual participaram o Brasil e outros 182 países. A convenção deliberou a incorporação do ácido perfluooctano sulfônico (PFOS) e do perfluorooctano sulfonil fluoreto (PFOSF) na lista dos POPs (CONFERÊNCIA das Partes, 2009).

Dentre os compostos derivados do PFOS inclui-se a sulfluramida, um inseticida amplamente utilizado no Brasil no combate às formigas cortadeiras. A principal forma de controle desses insetos é realizada pela aplicação desse composto químico formulado em iscas tóxicas. Apesar da eficácia desse composto químico, vários estudos apontam para os efeitos persistentes no ambiente e na saúde de organismos não-alvo (OECD, 2002; COMISSÃO de Revisão dos POPs, 2006). Atualmente não existem substitutos para a sulfluramida e, por tal motivo, a Convenção de Estocolmo decidiu ser aceitável a continuidade do uso e produção de iscas formicidas derivadas de PFOS exclusivamente para controle de formigas cortadeiras. Contudo, a convenção alerta para o desenvolvimento de estratégias que visem a redução do uso desse inseticida poluente (CONFERÊNCIA das Partes, 2009). Dentre as estratégias previstas, inclui-se o controle biológico como uma alternativa ao uso de formicidas, entretanto, as pesquisas nessa áreas ainda se encontram nos estágios iniciais.

É sabido que além do fungo mutualista cultivado pelas formigas cortadeiras, o ninho desses insetos abriga uma microbiota complexa incluindo bactérias, leveduras e outros fungos filamentosos. Estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa (projeto FAPESP n. 06/58043-3 – Controle de formigas cortadeiras: estudos integrados) estabeleceram uma coleção de fungos filamentosos isolados de ninhos de formigas cortadeiras submetidos a tratamento com iscas a base de sulfluramida (isca comercial: Mirex-S®). Dentre os isolados, o fungo *Syncephalastrum racemosum* foi encontrado em 54% dos ninhos de laboratório (n= 40 ninhos). Estudos preliminares revelaram que *S. racemosum* apresenta um rápido crescimento na presença do fungo mutualista. Tais evidências sinalizam para o potencial antagonista de *S. racemosum*, entretanto, pouco foi explorado sobre o papel que tal fungo desempenha na simbiose das formigas cortadeiras.

Nesse contexto, várias questões ainda permanecem em aberto: (i) pode *S. racemosum* atuar como antagonista do fungo cultivado pelas formigas cortadeiras? (ii) Caso *S. racemosum* seja um antagonista, qual é a natureza de tal interação? (iii) A viabilidade dos

esporos de *S. racemosum* pode ser correlacionada com a capacidade antagonista do fungo? Na tentativa de responder a primeira pergunta, o presente trabalho avaliou *in vitro* o antagonismo de *S. racemosum* utilizando duas abordagens: (i) co-cultivo de *S. racemosum* e do fungo mutualista em meio de cultura e (ii) cultivo direto de *S. racemosum* nos jardins de fungo das formigas cortadeiras. Na tentativa de responder a segunda pergunta, o presente estudo avaliou se a natureza de tal antagonismo é proporcionada por contato direto entre *S. racemosum* e o fungo das formigas. Finalmente, para responder a terceira pergunta, a viabilidade dos esporos de *S. racemosum* foi avaliada *in vitro*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Formigas cortadeiras e o fungo mutualista

A tribo Attini (Hymenoptera: Formicidae) é um grupo monofilético que compreende formigas com a capacidade de cultivarem fungos como alimento (WEBER, 1972). Acredita-se que o hábito de cultivar fungos surgiu há 50 milhões de anos (MUELLER et al., 2001; SCHULTZ; BRADY, 2008) e levou à diversificação em 15 gêneros de formigas com cerca de 230 espécies descritas (SCHULTZ; BRADY, 2008; DELLA LUCIA, 2011). Os gêneros de formigas cortadeiras (*Atta* e *Acromyrmex*) são de grande importância econômica. Ambos, cortam folhas e flores frescas como substrato para o fungo mutualista, o qual é cultivado nos jardins de fungo localizados em câmaras subterrâneas. Por tal hábito, as formigas cortadeiras são consideradas os herbívoros dominantes das Américas (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990) e importantes pragas agrícolas.

A maioria das formigas cortadeiras cultiva uma única espécie de fungo mutualista, denominado *Leucoagaricus gongylophorus* (Basidiomycota: Agaricales) (MIKEYHEV et al., 2006). Apenas uma única linhagem do fungo é cultivada no interior das colônias, o que pode ser considerada uma monocultura do fungo mutualista (POULSEN; BOOMSMA, 2005; MUELLER et al., 2010).

A capacidade do fungo mutualista em suprir as necessidades nutricionais das formigas pode estar associada ao fato deste produzir inúmeras enzimas hidrolíticas, capazes de degradar polissacarídeos foliares (pectinases, xilanases, etc), transformando-os em carboidratos solúveis e açúcares simples (SILVA et al., 2006a). Associado a isso, ao longo da história evolutiva da interação formiga-fungo, *L. gongylophorus* desenvolveu estruturas especializadas denominadas de gongilídios. Tais vesículas nutritivas constituem o único alimento das pupas e larvas (WEBER, 1972). Em contrapartida, as formigas oferecem um ambiente adequado para o crescimento do fungo, além de auxiliar na sua dispersão, quando fêmeas aladas carregam um inóculo do fungo no momento da fundação de uma nova colônia (MUELLER, 2002). De acordo com Schultz e Brady (2008) cinco tipos de fungicultura podem ser encontrados na tribo Attini: i) fungicultura das formigas basais, na qual os gêneros basais na filogenia da tribo Attini utilizam fungos da família *Agaricaceae* (alguns desses fungos também podem ser encontrados no ambiente, não associado às formigas da tribo Attini); ii) fungos da família *Pterulaceae*, cultivados por algumas espécies de formigas do gênero *Apterostigma*; iii) fungicultura de leveduras, praticada por formigas do grupo *Cyphomyrmex rimosus* (esses fungos também podem ocorrer de forma livre na natureza, ou seja, o fungo pode ser encontrado em outros substratos, além do jardim de fungo das

formigas); iv) fungicultura das formigas derivadas (inclui os gêneros *Atta*, *Acromyrmex*, *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex*), na qual o fungo apresenta adaptações (gongilídios) e v) fungicultura praticada pelos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, que utilizam exclusivamente folhas e flores frescas das plantas como substrato oferecido ao fungo.

2.2 Micro-organismos associados ao jardim de fungo

O jardim de fungo das formigas da tribo Attini é considerado um ambiente favorável ao crescimento do fungo mutualista e também de outros micro-organismos. Apesar dos diversos mecanismos físicos e químicos que esses insetos utilizam para evitar o estabelecimento de micro-organismos prejudiciais às culturas do fungo mutualista, sabe-se que vários deles resistem e permanecem e podem ser encontrados nesse ambiente. Recentemente foi descoberto que os ninhos das formigas Attini abrigam uma microbiota diversa, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos (CURRIE 2001; PAGNOCCA et al., 2011). Nesse sentido, vários fungos filamentosos foram descobertos associados aos jardins de fungos, dentre eles *Escovopsis* sp., o qual é considerado parasita de *L. gongylophorus*.

Escovopsis sp. foi formalmente descrito em 1990 por Muchovej e Della Lucia; porém a ocorrência de tal fungo foi previamente relatada por Möller (1893). *Escovopsis* foi isolado dos jardins de fungos de quase todos os gêneros da tribo Attini (CURRIE et al., 1999a). Estudos moleculares demonstraram que *Escovopsis* sp., as formigas e o fungo cultivado, co-evoluíram em uma associação tripartida na qual *Escovopsis* sp. é considerado um parasita especializado (CURRIE et al., 2003). Estudos sugerem que linhagens específicas de *Escovopsis* sp. estão associadas aos diferentes tipos de fungicultura; entretanto, a relação hospedeiro-parasita dentro de cada uma é variável. Por exemplo, considerando a fungicultura das formigas cortadeiras, os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* compartilham linhagens semelhantes de *Escovopsis* sp. (TAERUM et al., 2007), sugerindo baixa especificidade entre hospedeiro e parasita na fungicultura dessas formigas. Entretanto, linhagens de *Escovopsis* sp. de formigas cortadeiras diferem de linhagens que infectam os demais tipos de fungicultura (TAERUM et al., 2007). Diferente do observado em *Atta* e *Acromyrmex*, na fungicultura dos gêneros de Attini basais, aparentemente, há uma certa especificidade hospedeiro-parasita, de modo que certas espécies de formigas estão associadas à diferentes linhagens do parasita (GERARDO et al., 2004).

Pouco se conhece sobre a biologia e o ciclo de vida de *Escovopsis* sp. O parasita apresenta um rápido crescimento micelial nos jardins de fungo na ausência das operárias, podendo recobri-lo em 72h (PAGNOCCA et al., 2011). Sabe-se que seus esporos (conídios)

apresentam baixa viabilidade (cerca de 3% são viáveis; RODRIGUES et al., 2008a). Quando um jardim é infectado por *Escovopsis* sp., o parasita pode ser controlado pelas operárias, através da remoção de fragmentos do jardim infectado (CURRIE; STUART, 2001) e de antibióticos produzidos por bactérias *Pseudonocardia* sp., as quais encontram-se associadas à cutícula das operárias (CURRIE et al., 1999b). Tais bactérias ocorrem amplamente nos diferentes gêneros de Attini (CURRIE et al., 1999b). Localizadas em regiões específicas da cutícula, *Pseudonocardia* sp. coevoluiu juntamente com a associação tripartida *Escovopsis*-fungo-formiga (CAFARO; CURRIE, 2005). Ainda no integumento das formigas, foi descoberta uma levedura negra (relacionada ao gênero *Phialophora*), que indiretamente inibe o crescimento de *Pseudonocardia* sp. (LITTLE; CURRIE, 2007, 2008).

Além de *Escovopsis* sp., outros micro-organismos tais como leveduras e fungos filamentosos também foram encontrados nos jardins desses insetos. Até o presente, três espécies novas de leveduras foram descritas dos jardins de fungos das formigas da tribo Attini (PAGNOCCA et al., 2010) e uma variedade de espécies de fungos filamentosos também foi relatada nesse ambiente (RODRIGUES et al., 2008b, 2011 e resultados do projeto FAPESP n. 06/58043-3 – Controle de formigas cortadeiras: estudos integrados). Todavia, pouco se conhece a respeito da função que esses micro-organismos desempenham nos ninhos. Muitos podem ser considerados transitórios nos jardins, contudo, outros podem desempenhar papéis ainda desconhecidos na colônia.

Rodrigues et al. (2005) demonstraram que diferentes fungos filamentosos podem ocorrer em ninhos de *A. sexdens rubropilosa* após tratamento com iscas tóxicas. Segundo esse estudo, em ninhos de campo foi predominante a ocorrência dos fungos *Trichoderma harzianum*, *Fusarium oxysporum* e *Escovopsis weberi*. Já em ninhos de laboratório, os fungos predominantes foram *S. racemosum*, *E. weberi* e *F. oxysporum*. Destaque para *S. racemosum*, cuja ocorrência em ninhos de campo não foi observada, no entanto, ocorreu em 56% dos ninhos de laboratório (n= 40, RODRIGUES et al., 2005). Nestes ninhos, pode-se observar a deterioração rápida dos jardins de fungos na presença de *S. racemosum* (RODRIGUES et al., 2005; PAGNOCCA et al., 2011). Estudos adicionais revelaram a ocorrência de *S. racemosum* em ninhos de campo de *Acromyrmex* spp. da região sul do país (RODRIGUES et al., 2008b) e sua ausência em ninhos de campo de três gêneros de Attini amostrados no estado do Texas, EUA (RODRIGUES et al., 2011).

Apesar da ocorrência variável de *S. racemosum* em ninhos de campo, poucos estudos avaliaram o potencial antagonista desse fungo frente a *L. gongylophorus*. Quando ninhos de laboratório de *A. sexdens rubropilosa* foram experimentalmente infectados com esporos de *S.*

racemosum, foi observada a remoção ativa de fragmentos de jardins de fungos pelas operárias (RODRIGUES et al., 2004). Tais fragmentos foram depositados nas câmaras de lixo 12 horas após o início do tratamento. Os fragmentos rapidamente revelaram a presença de *S. racemosum* quando inoculados em meios de cultura. O comportamento de remoção de fragmentos de jardins de fungos foi descrito como um mecanismo de defesa para infecções com *Escovopsis* sp. (CURRIE; STUART, 2001); no entanto, Rodrigues et al. (2004) observaram o mesmo mecanismo para *S. racemosum*, o que sinaliza para o potencial antagonista desse fungo. Além disso, estudos preliminares demonstraram que *S. racemosum* reduz o crescimento micelial do fungo mutualista (SILVA et al., 2006b) em experimentos *in vitro*.

2.3 Controle de formigas cortadeiras

Dentre as formas existentes de controle das formigas cortadeiras destacam-se o controle químico, tratos culturais e o controle biológico. O controle químico empregado atualmente se faz, principalmente, pela utilização de iscas granuladas compostas por um substrato atrativo misturado ao um princípio ativo. No Brasil, por muitos anos utilizou-se iscas tóxicas contendo o princípio ativo dodecacloro no controle químico das formigas cortadeiras. Após a proibição do uso desse formicida na década de 1990, a sulfluramida foi estabelecida no mercado como substituto do dodecacloro (BOARETTO; FORTI, 1997).

A sulfluramida é derivada de um composto químico pertencente à família do PFOS, um poluente orgânico persistente, biocumulativo e carcinogênico (OECD, 2002; COMISSÃO de Revisão dos POPs, 2006). O PFOS foi desenvolvido pela multinacional 3M há pelo menos 50 anos atrás e pode-se dividir as aplicações desses compostos em três categorias: tratamento de superfícies; proteção para papéis e embalagens; e manufatura de químicos (OECD, 2002). Suas cadeias carbono-flúor apresentam ligações coesas e, por esse motivo, essa substância é extremamente persistente. O PFOS não hidrolisa, fotolisa ou sofre biodegradação em condições ambientais (OECD, 2002).

A ação inseticida da sulfluramida ocorre através da interrupção do processo de fosforilação oxidativa (respiração aeróbia) do inseto, levando-o a morte por impedir o fluxo de elétrons e produção de ATPs nas mitocôndrias (BCPC, 2003). Apesar do sucesso dessa forma de controle, sabe-se que a sulfluramida apresenta algumas desvantagens, principalmente, no que diz respeito aos efeitos deletérios ao ecossistema e por atuar em organismos não alvos (OECD, 2002), típico problema encontrado no uso de pesticidas químicos.

Formas alternativas de controle das formigas cortadeiras constituem no principal mote para encontrar formas mais “verdes” de controlar essas pragas agrícolas. Considerando o uso de espécies vegetais no combate a esses insetos, o gergelim (*Sesamum indicum*) apresenta efeito tóxico o fungo das formigas cortadeiras (PAGNOCCA et al., 1990). Bueno et al. (1995) demonstraram o efeito tóxico do gergelim no desenvolvimento de colônias de *A. sexdens rubropilosa*. Efeito formicida foi observado nos extratos de *Cedrela fissilis* (BUENO et al., 2005) e *Azadirachta indica* (SANTOS-OLIVEIRA et al., 2006), os quais são tóxicos às operárias de *A. sexdens rubropilosa* mantidas no laboratório.

As perspectivas atuais de controle biológico das formigas cortadeiras encontram-se relacionadas, principalmente, à investigação de micro-organismos antagonistas aos ninhos como possíveis substitutos aos inseticidas químicos (no caso, a sulfluramida). Seguindo a mesma lógica, vários trabalhos, incluindo este, tem se debruçado sobre a avaliação do antagonismo de fungos frente às formigas e ao fungo cultivado por esses insetos.

Os estudos concentram-se na avaliação do efeito de fungos micoparasitas frente ao fungo cultivado e efeitos de fungos entomopatogênicos nas formigas. Dentre os micro-organismos entomopatogênicos destacam-se *Metarhizium* sp. (LOPEZ; ORDUZ, 2003; LOUREIRO; MONTEIRO, 2004; SANTOS et al., 2007; AUGUSTIN et al., 2011), *Beauveria* sp. (LOUREIRO; MONTEIRO, 2004; SANTOS et al., 2007; AUGUSTIN et al., 2011) e *Isaria farinosa* (= *Paecilomyces farinosus*; LOUREIRO; MONTEIRO, 2004). Já, dentre os micro-organismos micoparasitas e antagonistas ao fungo cultivado das formigas das cortadeiras, destacam-se: *Escovopsis* (CURRIE et al., 2003; FOLGARAIT et al., 2011), *Trichoderma* sp. (ORTIZ; ORDUZ, 2001; LOPEZ; ORDUZ, 2003, SILVA et al., 2006b) e *Gliocladium* sp. (ORTIZ; ORDUZ, 2001).

Diferentes espécies de fungos ascomicetos considerados inimigos naturais de insetos foram utilizados como agentes no controle biológico das formigas cortadeiras (AUGUSTIN et al., 2011). Outro fungo amplamente usado no controle biológico é *Trichoderma* sp. De ocorrência natural no solo, algumas espécies desse gênero são especialmente utilizadas para controlar fungos fitopatogênicos que ocasionam prejuízos na agricultura, mas algumas linhagens já foram testadas frente ao fungo cultivado pelas formigas cortadeiras. Por exemplo, Ortiz e Orduz (2001) demonstraram o efeito antagonista de *Trichoderma* sp. e *Gliocladium* sp. como antagonistas do fungo cultivado por *Atta cephalotes*. Em uma abordagem conjugada, Lopez e Orduz (2003) trataram ninhos de campo (n= 10 ninhos) e laboratório (n= 12) de *A. cephalotes* com iscas formuladas com esporos de *Trichoderma viride* e *Metarhizium anisopliae* e demonstraram alta virulência de *M. anisopliae* para *A. cephalotes*. As iscas foram

formuladas na tentativa de *T. viride* ocasionar antagonismo ao fungo mutualista e *M. anisopliae* infectar as formigas. Nesse experimento, para os ninhos de laboratório, não foi observado a morte das rainhas e tanto para campo como para laboratório o tempo necessário para atingir o controle excedeu 60 dias. Loureiro e Monteiro (2004) executaram um experimento no qual operárias de *Atta sexdens sexdens* foram imersas em suspensões contendo conídios de diferentes linhagens de *M. anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *I. farinosa*. Dentre os três fungos aquele que demonstrou maior virulência à *A. sexdens sexdens* foi *I. farinosa*, ocasionando mais de 90% de mortalidade das operárias em três dias após a inoculação.

Dentro da perspectiva conservacionista, o controle biológico exercido pelos inimigos naturais, tais como pássaros, aranhas, ácaros, formigas predadoras e coleópteros é um fator relevante na dinâmica populacional desses insetos, uma vez que eles são responsáveis pela mortalidade de 99,95% das rainhas antes mesmo da fundação dos ninhos (BOARETTO; FORTI, 1997). A supressão da vegetação nativa diminui a pressão de predação sobre as formigas cortadeiras, já que esses ecossistemas constituem hábitat dos inimigos naturais.

Alguns organismos parecem ser inimigos naturais específicos das cortadeiras. Um deles é o coleóptero do gênero *Canthon* (*C. virens* e *C. dives*), especializado atacar as rainhas de *Atta* spp. logo após o vôo nupcial, no momento em que elas procuram um local adequado para cavar seus ninhos (FORTI et al., 1992; RINALDI et al., 1993). Ainda pouco se sabe sobre as interações ecológicas existentes entre esses coleópteros e as cortadeiras, pois as pesquisas nesse campo ainda são incipientes. *Escovopsis* sp. é outro organismo que pode ser considerado inimigo natural especialista do fungo cultivado pelas formigas. Folgarait et al. (2011) demonstraram *in vitro* o antagonismo de diferentes linhagens de *Escovopsis* sp. frente ao fungo mutualista de *Acromyrmex lundii*. As linhagens testadas inibiram o crescimento do fungo mutualista em diferentes magnitudes. Apesar de *Escovopsis* sp. ser um fungo com potencial para ser utilizado como agente biológico, as formigas desenvolveram ao longo da evolução, diversas estratégias de defesa contra esse parasita especializado (CURRIE; STUART, 2001). Além de mecanismos comportamentais, as formigas estabeleceram associação com actinobactérias, as quais produzem antibióticos para o controle de *Escovopsis* sp. Tendo em vista as diferentes estratégias adotadas pelas formigas no controle dos parasitas dos jardins de fungo, Folgarait et al. (2011) e Silva et al. (2006b) sugerem a utilização combinada de diferentes microfungos micoparasitas (*Escovopsis* sp. e *Trichoderma* sp.) e entomopatogênicos (*Metharizium* sp. e *Beauveria* sp.) para que os últimos potencializem o ação antagonista que estes possuem sobre o fungo simbiote. Além disso, foi sugerido a combinação de doses não letais de pesticidas em conjunto com esporos de micro-organismos

(SANTOS et al., 2007). No entanto, pouco se conhece sobre os efeitos sinérgicos deste tipos de combinação, assim como, pouco se sabe quais seriam os efeitos no ambiente para a comunidade microbiana e de invertebrados se fossem liberados esses micro-organismos, mesmo sendo eles de ocorrência natural no solo.

Dentre os diversos agentes biológicos utilizados para controlar as formigas, os fungos filamentosos tem apresentado bons resultados. O presente trabalho buscou, dentre os fungos filamentosos associados aos jardins das formigas, aqueles que potencialmente podem prejudicar o fungo cultivado por esses insetos. Nesse sentido, nosso trabalho procurou explorar as interações de *S. racemosum* frente ao fungo cultivado pelas formigas cortadeiras (no caso, o fungo cultivado por *A. sexdens rubropilosa*). As evidências sugerem que *S. racemosum* seja um fungo antagonista ao fungo das formigas (RODRIGUES et al., 2004; SILVA et al., 2006b). Contudo, um trabalho sistemático para avaliar esse potencial ainda não foi realizado. Tendo em vista a redução do uso de compostos químicos no combate às formigas cortadeiras, o presente trabalho constitui-se em uma iniciativa para pesquisas que desenvolvam formas alternativas de controle, como previsto nas deliberações da Convenção de Estocolmo. Além disso, o estudo de tais interações pode colaborar para um maior entendimento do papel de *S. racemosum* no jardim desses insetos.

3 OBJETIVOS

Geral:

Avaliar as interações de *Syncephalastrum racemosum* frente ao fungo cultivado pela formiga *Atta sexdens rubropilosa*.

Específicos:

1. Avaliar o antagonismo de *S. racemosum* frente ao fungo mutualista utilizando a técnica de co-cultivo.
2. Avaliar o antagonismo de *S. racemosum* diretamente no jardim de fungos de *A. sexdens rubropilosa*.
3. Verificar a natureza do antagonismo *S. racemosum*-fungo mutualista.
4. Avaliar a germinação dos esporos de *S. racemosum* como um fator de virulência no antagonismo frente ao fungo das formigas

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivo e manutenção dos fungos filamentosos

As linhagens de *S. racemosum* utilizadas nos experimentos (Tabela 1) foram isoladas em estudos prévios (RODRIGUES et al., 2005; Projeto FAPESP n. 06/58043-3 – Controle de formigas cortadeiras: estudos integrados), nos quais ninhos de *A. sexdens rubropilosa* foram tratados no laboratório com o inseticida Mirex-S[®] (princípio ativo: sulfluramida). Tais ninhos foram coletados na Fazenda Corumbataí, Corumbataí – SP, quando apresentavam três meses de idade (i.e. ninhos incipientes) em diferentes campanhas de coleta (Tabela 1).

As culturas estoque das linhagens de *S. racemosum* estão preservadas em glicerol 10% e mantidas a -80 °C, na Central de Recursos Microbianos da UNESP. Todos os isolados foram reativados e as culturas de trabalho foram mantidas em tubos contendo ágar malte 2% - MA2% (para 1 L: 20 g de extrato de malte e 15 g de ágar) inclinado e armazenadas a 8 °C. Para efeitos de comparação, uma linhagem de *E. weberi* também foi utilizada para verificar o antagonismo frente ao fungo da formiga (Tabela 1).

Tabela 1. Fungos filamentosos isolados de ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* utilizados nos ensaios de antagonismo.

CÓDIGO	FUNGO	TIPO DE NINHO	LOCAL DE COLETA	ANO DE COLETA
A086a	<i>Escovopsis weberi</i>	Ninho tratado com inseticida Myrex-S [®]	Corumbataí – SP	2002
A086b	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	Ninho tratado com inseticida Myrex-S [®]	Corumbataí – SP	2002
A101	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	Ninho tratado com inseticida Myrex-S [®]	Corumbataí – SP	2002
A130	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	Ninho tratado com inseticida Myrex-S [®]	Corumbataí – SP	2002
H1a	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	Ninho tratado com inseticida Myrex-S [®]	Corumbataí – SP	2003
H11a	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	Ninho tratado com inseticida Myrex-S [®]	Corumbataí – SP	2003
H30	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	Ninho tratado com inseticida Myrex-S [®]	Corumbataí – SP	2003
FF2006	<i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	Ninho de laboratório sem tratamento com inseticida	Corumbataí – SP	2006

4.2 Bioensaios *in vitro*

4.2.1 Co-cultivo

O fungo mutualista de *A. sexdens rubropilosa* (linhagem de FF2006) foi mantido através de repiques sucessivos e cultivado em meio A com aveia (para 1 L: 5 g de peptona, 10 g de extrato de malte, 10 g de glicose, 15 g de ágar adicionado de 50% de extrato de aveia) a 25 °C, no escuro, durante 20 a 25 dias. Após verificar a formação da biomassa do fungo

(Figura 1), fragmentos de 10 mm de diâmetro do micélio foram removidos assepticamente e inoculados a 1,5 cm distante da borda de placas de Petri contendo meio BDA (Ágar Batata-Dextrose). Tais inóculos foram cultivados a 25 °C durante 15 a 20 dias, no escuro. Após o período de incubação, fragmentos de 10 mm de diâmetro do micélio de *S. racemosum* (cultivado previamente em MA2% a 25 °C durante sete dias) foram inoculados no lado oposto ao fungo mutualista, também a 1,5 cm distante da borda da placa. As placas de co-cultivo foram mantidas a 25 °C durante 14 dias. Foram realizadas sete réplicas para cada linhagem de *S. racemosum*, sete réplicas para *E. weberi*, sete réplicas controle de *L. gongylophorus* (somente fungo mutualista) e sete réplicas controle dos microfungos (seis linhagens de *S. racemosum* e *E. weberi* na ausência de *L. gongylophorus*). O experimento como um todo foi realizado duas vezes (em dias diferentes), de forma que foram totalizadas 14 réplicas para cada tratamento. As placas foram digitalizadas em *scanner* e as áreas de crescimento dos fungos foram mensuradas (em cm²) utilizando o software ImageJ v1.38 (ABRAMOFF et al., 2004) após 3, 5, 7 e 14 dias de experimento.

Para a comparação das áreas do crescimento micelial dos microfungos na presença e na ausência de *L. gongylophorus* (controle dos microfungos), e com isso avaliar se *L. gongylophorus* eventualmente também apresenta efeito antagonista frente aos microfungos, foi adotado o seguinte critério: o dia em que houve o contato entre os micélios do microfungo e do fungo mutualista nas placas de co-cultivo, foi estabelecido como o dia de comparação do crescimento micelial na placa controle; ou seja, quando o micélio do microfungo entrou em contato com o micélio do fungo mutualista, este dia foi o dia referência para analisar o crescimento micelial nas placas controle (microfungos crescendo na ausência de FF2006).

O número de réplicas por tratamento (microfungos e controles) que efetivamente foram utilizadas nas análises estatísticas foi igual a dez por confronto e por controle. Devido ao tempo de incubação do experimento ser prolongado (20 dias de crescimento do mutualista no PDA, somado a 14 dias de crescimento do fungo mutualista na presença dos microfungos), esperava-se que algumas réplicas fossem perdidas devido à contaminação por outros fungos. Quando o número de réplicas intactas (sem contaminação) de um tratamento foi superior a dez, sorteamos aleatoriamente dez placas para serem utilizadas nas análises estatísticas.

Além das medições, outras características foram observadas nas placas de experimento, tais como crescimento de *S. racemosum* sobre micélio do fungo mutualista; e se *S. racemosum* apresentou esporulação conspícua sobre o micélio do fungo mutualista.

Figura 1. *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006, fungo mutualista da formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa*, após 20 dias de incubação a 25 °C, em meio A com aveia.



4.2.2 Cultivo direto no jardim de fungos

Foram realizados ensaios nos quais o micélio de *S. racemosum* foi inoculado diretamente no jardim de fungos, seguindo o método proposto por Taerum et al. (2007). Este método consiste em remover um fragmento de 5mm de diâmetro do micélio de *S. racemosum* (cultivado previamente em MA2% a 25 °C, no escuro, durante sete dias) e mantê-los contato direto com jardins de fungo livre de operárias e larvas. Os jardins de fungo foram removidos de uma colônia de laboratório de *A. sexdens rubropilosa* mantida no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS/UNESP/Rio Claro). Os jardins foram pesados (0,3g) e subdivididos em oito grupos contendo dez réplicas cada. Cada grupo foi submetido ao tratamento com cada uma das linhagens de *S. racemosum*, um grupo foi submetido ao tratamento com *E. weberi* e um grupo serviu de controle (sem inoculação de microfungos). Após a inoculação dos microfungos sobre os jardins, todas as réplicas foram mantidas a 25 °C durante sete dias de incubação. Os resultados foram avaliados segundo a capacidade de *S. racemosum* de colonizar o jardim de fungos durante sete dias de experimento. O número de réplicas por tratamento (microfungos e controles) que efetivamente foram utilizadas nas análises foi igual a seis por tratamento e por controle. Devido ao fato da preparação deste experimento ser mais suscetível à contaminação do que o experimento anterior (co-cultivo *in vitro*), esperava-se que algumas réplicas seriam perdidas por contaminação. Dessa forma estabeleceu-se que o número mínimo de réplicas por tratameto necessário para realizar as análises estatísticas seria igual ao número de réplicas restantes do controle que não estivessem contaminadas no final

do período de incubação. Após a remoção das placas contaminadas sortearmos aleatoriamente, para cada tratamento com os microfungos, seis réplicas para serem utilizadas nas análises.

4.3 Testes de viabilidade dos esporos de *S. racemosum*

A viabilidade dos esporos de *S. racemosum* foi avaliada com o intuito de verificar se os isolados apresentam diferentes níveis de germinação e possivelmente correlacioná-la com a virulência encontrada nos bioensaios *in vitro*. Para tanto, foi utilizada a técnica proposta por Alves e Pereira (1998), Alves e Moraes (1998) e Rodrigues et al. (2008a) na qual suspensões de esporos preparadas em 0.2% de água peptonada suplementada com 0,05% de Tween 80 foram padronizadas a uma quantidade de esporos de 10^6 esporos mL^{-1} em câmara de Neubauer. Em seguida, as suspensões foram diluídas em concentrações menores (10^3 e 10^2 esporos mL^{-1}) e, 0,1 mL da suspensão de conídios foi inoculado em meio BDA utilizando a técnica de espalhamento em superfície. As placas foram incubadas a 25 °C e durante um período de cinco dias o número de unidades formadoras de colônias que cresceram no meio BDA foi contabilizado e comparado com o número total de esporos inoculados. Três réplicas foram realizadas para cada isolado de microfungo. Na realização do experimento de viabilidade para *S. racemosum*, foi observado o cuidado de inocular uma suspensão de esporos bem diluída (menos de 100 esporos por placa), evitando que esporos germinados mais rápido se sobrepusessem sobre aqueles viáveis e tardios. As colônias recém-emergidas foram contabilizadas e comparadas com número total de esporos inoculados na placa.

4.4 Avaliação da natureza do antagonismo de *S. racemosum*

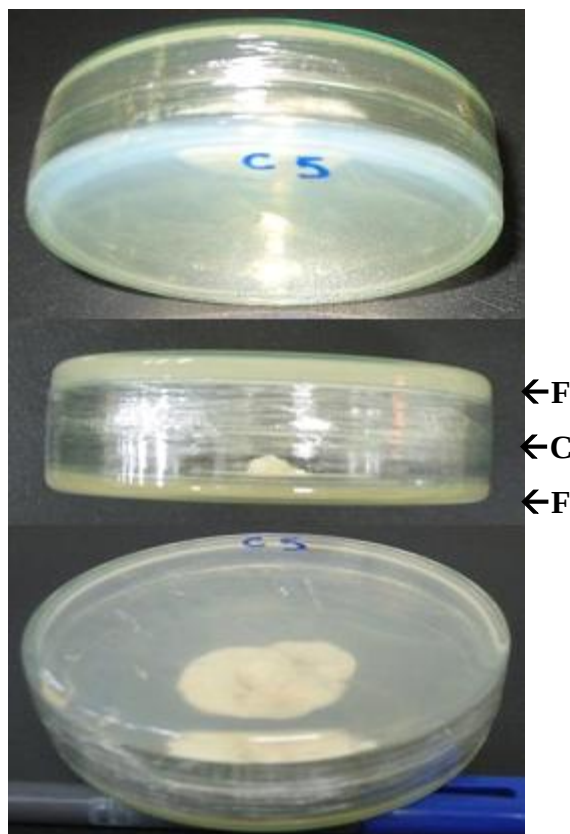
As placas resultantes dos experimentos de antagonismo *in vitro* foram avaliadas quanto à natureza da interação *S. racemosum*-fungo mutualista. Considerando o experimento de co-cultivo, fragmentos de 1 cm^2 foram removidos da área de contato entre os dois fungos e dispostos sobre uma lâmina de microscopia (ORTIZ; ORDUZ, 2001). Em seguida, os fragmentos foram lavados com água destilada estéril para remover o excesso de esporos. Após a lavagem, a preparação foi corada com azul de algodão suplementado com lactoglicerol e uma lamínula foi disposta sobre o fragmento de ágar. A preparação foi imediatamente observada em microscópio ótico. Na análise da preparação, procurou-se distinguir as hifas de *S. racemosum* (como tal fungo pertence ao filo *Zygomycota*, este apresenta *hifas não septadas*) e do fungo mutualista (pertencente ao filo *Basidiomycota* e apresenta *hifas septadas*) de modo a observar se existem zonas de contato íntimo entre os fungos.

Como método alternativo de análise da natureza da interação, e como estudo piloto, avaliamos também se a presença de compostos voláteis e não-voláteis estão envolvidos na interação entre *L. gongylophorus* e *S. racemosum*, conforme método proposto por Dennis e Webster (1971a, 1971b) e Alvindia e Natsuaki (2008). Tanto a avaliação de compostos voláteis como a avaliação de compostos não-voláteis são técnicas de co-cultivo *in vitro* que utilizam papel celofane como mediadores de culturas de fungos em confronto. O papel celofane utilizado possui a propriedade de ser semi-permeável, ou seja, permite a passagem de compostos através de sua película, mas impede a penetração das hifas de fungos no meio de cultura.

A técnica de avaliação de compostos não voláteis consistiu na preparação de placas de Petri contendo meio de cultura BDA, sobre o qual colocou-se papel celofane (estéril e devidamente cortado em círculo, recobrimdo o meio de cultura), e então inoculou-se *S. racemosum* A101 sobre o papel, deixando-o crescer a 25 °C. Quando o micélio do fungo cresceu parcialmente no papel celofane, este foi removido. Posteriormente, fragmentos de sete mm de diâmetro de *L. gongylophorus* foram inoculados sobre o meio de cultura da placa previamente cultivada com *S. racemosum* A101. Esse sistema foi incubado a 25 °C durante 24 dias. O diâmetro inicial de *L. gongylophorus* (tempo 0) foi avaliado e também após oito, 16 e 24 dias, com o uso de uma régua. Foram utilizadas 10 réplicas por tratamento (controle e inoculação de *S. racemosum* A101) para este experimento.

Assim como no método de avaliação de compostos não-voláteis, para determinar a presença de compostos voláteis também foi empregado o papel celofane, porém, o papel utilizado apresenta um diâmetro maior que o da abertura da placa de Petri, de modo a separar dois fundos de placa, quando dispostos um de frente para o outro (Figura 2). Primeiramente, *L. gongylophorus* foi cultivado em meio BDA durante 20 a 25 dias. Então foi preparado o mesmo número de placas com meio BDA, onde foi inoculado *S. racemosum* A101, para o confronto com o fungo mutualista. Duas bases (“fundos”) de placas de Petri, ambas com meio BDA, foram unidas, porém separadas por uma fina folha de papel celofane, sendo que em um dos fundos de placa estava semeado com *L. gongylophorus*, e no outro *S. racemosum* A101. Seis réplicas foram montadas para tratamento com *S. racemosum* A101, e outras seis para tratamento controle (sem o microfungo, Figura 2). O diâmetro de crescimento do fungo mutualista foi avaliado no tempo inicial e após, oito, 16 e 24 dias de crescimento.

Figura 2. Experimento para determinação da presença de compostos voláteis produzidos por *Syncephalastrum racemosum*. Duas bases (“fundos”) de placas de Petri contendo meio PDA (indicado pela letra F, na figura), separadas por papel celofane (indicada pela letra C) e unidas para realização do experimento. Imagens de uma réplica controle, onde um dos fundos contém *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006 (F inferior) e o outro fundo permanece estéril (F superior).



4.5 Forma de análise dos resultados

As medidas de área do fungo simbiote obtidos nos bioensaios de co-cultivo foram transformadas em médias e verificadas se seguem os critérios de uma distribuição normal com variâncias homogêneas. Uma vez seguido esses critérios, as diferenças nos valores de crescimento do fungo mutualista frente aos isolados de *S. racemosum* foram verificados com análise de variância (ANOVA - 2 fatores) no programa BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007).

A fim de se obter um valor em termos de eficiência de inibição do crescimento do fungo mutualista e comparar o efeito inibitório de *S. racemosum* e *E. weberi* com outros trabalhos da literatura (SILVA et al., 2006b), procedemos para a conversão dos valores da área de crescimento, em porcentagem média de inibição do crescimento, conforme proposto por Silva et al. (2006b). Tal método consiste em dividir o diâmetro ou área de crescimento médio final (AF) de *L. gongylophorus* pelo diâmetro ou área média de crescimento inicial (AI) da

colônia, obtendo-se um índice de crescimento (LG), seguindo a equação: $LG = AF/AI$. Esse procedimento é realizado para *L. gongylophorus* nas placas controle e nas placas de co-cultivo. Os valores de LG de cada confronto de co-cultivo são então divididos pelo valor de LG do controle (valor denominado de LGC). O resultado dessa fração é transformado em porcentagem.

Os valores categóricos obtidos nos experimentos de cultivo direto nos jardins de fungos foram transformados em porcentagens de acordo com a capacidade que *S. racemosum* apresentou em crescer e esporular sobre os fragmentos de jardim. A taxa de viabilidade dos esporos foi verificada em porcentagem e comparada entre os isolados de *S. racemosum*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Bioensaios de co-cultivo *in vitro*: efeitos dos microfungos sobre o fungo mutualista

De fato, ocorreram perdas de placas no curso do experimento devido às contaminações com bactérias e fungos provenientes do ar, contudo, o número máximo de réplicas contaminadas, por tratamento, não ultrapassou duas placas.

Os resultados do teste estatístico demonstraram que houve diferença significativa nas áreas de crescimento micelial de *L. gongylophorus* entre o controle e todas as linhagens de microfungos (ANOVA 2 fatores, $n= 10$ réplicas por tratamento, $F= 23,61$, $P< 0,01$, Tabela 2). Também foram observadas diferenças significativas no crescimento de *L. gongylophorus* entre os dias de interação com os microfungos ($F= 8,29$, $P< 0,01$, Tabela 2).

O teste de Bonferroni de comparação múltipla das médias foi aplicado a fim de verificar quais isolados de microfungos diferenciavam-se significativamente ($P< 0,05$). O resultado do teste mostrou que não houve diferença significativa entre os tratamentos envolvendo os microfungos ($P> 0,05$, $n= 10$ réplicas por tratamento, Figura 3), contudo, todos os microfungos inibiram significativamente o crescimento do fungo mutualista quando comparado com o controle (Figura 3 e Tabela 3).

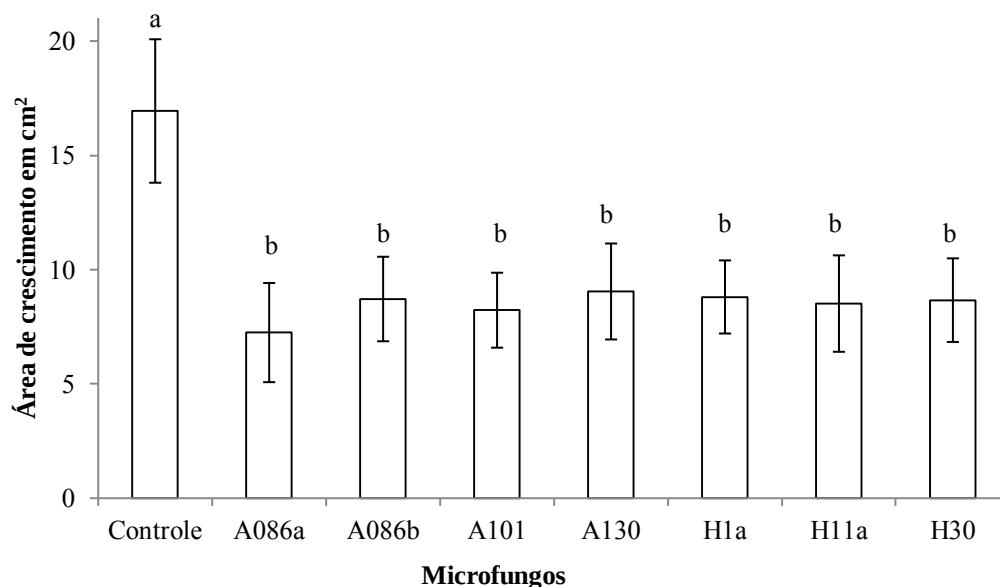
Tabela 2. Resultado da análise estatística de Anova-2 fatores dos experimentos de co-cultivo.

Variáveis	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F	P
Tratamentos ¹	7	678,79025	96,97004	23,61475	< 0,001
Tempo ²	5	170,3906	34,07812	8,29892	< 0,001
Interação	35	460,17765	13,14793	3,20187	< 0,001
Modelo	47	1309,3585	27,85869	6,78432	< 0,001
Erro	192	1773,93585	4,10633	--	--
Total corrigido	239	3083,29435	--	--	--

¹ Microfungos e controle do fungo mutualista.

² Tempo zero, três, cinco, sete, dez e 14 dias após incubação de *Leucoagaricus gongylophorus* com os microfungos.

Figura 3. Área de crescimento médio (em cm²) do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006 após 14 dias de interação frente à *Syncephalastrum racemosum* e *Escovopsis weberi* (n= 10 réplicas por tratamento). As barras de erro representam o desvio padrão.



Legenda: Controle: *L. gongylophorus* na ausência de microfungos; A086a: *Escovopsis weberi*; Demais códigos correspondem à *S. racemosum*. Tratamentos com letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$).

Tabela 3. Área de crescimento micelial (em cm²) de *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006 frente a *Escovopsis weberi* (A086a) e *Syncephalastrum racemosum* (demais códigos). Valores representam médias da área de crescimento (n= 10 réplicas por tratamento) seguidas do desvio padrão.

Dias	Microfungos							
	Controle	A086a	A086b	A101	A130	H1a	H11a	H30
0	7,53±2,28	7,71±2,10	7,49±1,85	7,37±1,78	7,72±1,71	7,99±1,92	7,53±2,02	7,67±2,06
3	9,27±2,69	7,94±2,49	8,43±1,97	8,14±1,95	8,67±1,78	8,65±1,82	8,41±2,02	8,28±1,80
5	10,71±2,33	7,83±2,39	8,56±1,89	8,17±1,87	8,66±1,62	8,72±1,57	8,40±2,01	8,27±1,68
7	12,12±2,69	8,10±2,35	8,69±1,91	8,16±1,85	8,94±1,86	8,76±1,69	8,41±2,00	8,53±1,50
10	14,20±2,76	7,78±2,24	8,68±1,86	8,04±1,57	8,79±1,92	8,71±1,68	8,43±2,15	8,52±1,80
14	16,94±3,14	7,24±2,17	8,71±1,85	8,22±1,64	9,04±2,10	8,80±1,60	8,51±2,11	8,66±1,83

Houve diferença significativa no crescimento micelial de *L. gongylophorus* entre os diferentes tempos de incubação (Tabela 2). No geral, não houve crescimento abundante do fungo mutualista a partir do terceiro dia de interação com os microfungos quando comparado ao controle (Tabela 3). O fungo mutualista apresentou, frente aos isolados, uma estabilização na área de crescimento a partir do quinto dia de interação (Tabela 3). A pequena oscilação nos

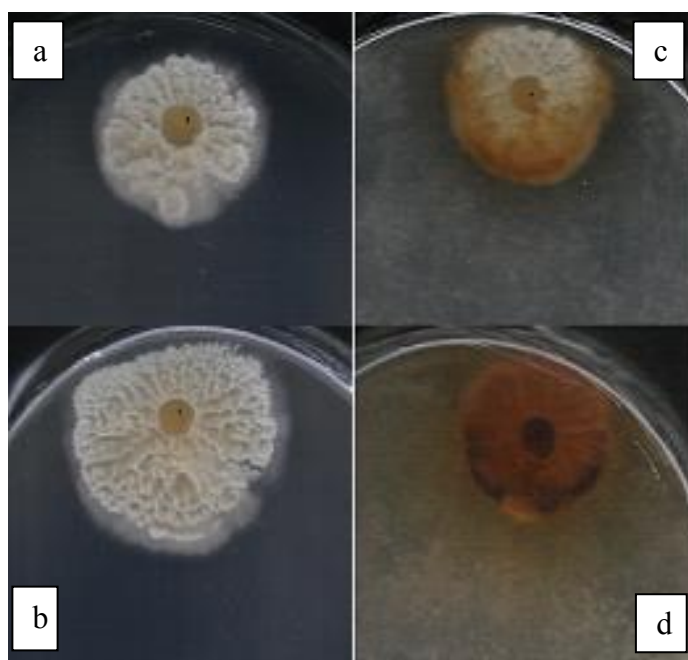
resultados observados para os microfungos entre o quinto e décimo quarto dia demonstra a dificuldade do software ImageJ em delimitar automaticamente a borda da colônia do fungo mutualista quando o micélio dos microfungos (*S. racemosum* ou *E. weberi*) entram em contato com o micélio do fungo mutualista. No caso específico do experimento frente a *E. weberi* A086a, é possível que as diferenças observadas do sétimo para o décimo quarto dia (Tabela 3), estejam relacionadas com o comportamento do parasita em consumir o micélio do fungo mutualista (REYNOLDS; CURRIE, 2004). Tal microfungo é considerado parasita especializado do fungo cultivado pelas formigas cortadeiras (CURRIE et al., 2003). Aparentemente, *E. weberi* A086a ocasionou o desaparecimento (“morte”) da colônia do fungo mutualista nos experimentos. De fato, as extremidades da colônia do fungo mutualista tornavam-se mais transparentes e de difícil medição pelo software ImageJ. Resultado semelhante também foi observado por Silva et al. (2006b) em experimentos de co-cultivo semelhantes aos realizados em nosso estudo. O resultado observado no presente trabalho corrobora estudos que demonstram a atividade antagonista de *E. weberi* frente a *L. gongylophorus* (REYNOLDS; CURRIE, 2004; SILVA et al., 2006b; FOLGARAIT et al., 2011). O presente estudo também demonstra que tal atividade não é exclusiva de *E. weberi*, pois *S. racemosum* foi igualmente eficiente em inibir o crescimento de *L. gongylophorus* (Figura 3).

Durante os experimentos de co-cultivo, ocorreram algumas modificações no aspecto morfológico das colônias do fungo mutualista. A modificação mais evidente foi o escurecimento das colônias de *L. gongylophorus* frente a todos os microfungos testados (Figura 4). Esse fenômeno foi observado em quase todas as réplicas de co-cultivo. O escurecimento também foi observado por Reynolds e Currie (2004) que realizaram experimentos de co-cultivo com *L. gongylophorus* e *Escovopsis* sp. Esses autores argumentam que a coloração formada seja possivelmente um mecanismo de resposta de *L. gongylophorus* à interação com o parasita (REYNOLDS; CURRIE, 2004; SILVA et al., 2006b). Os resultados do presente estudo sugerem que o escurecimento da colônia não é uma resposta específica ao parasita *E. weberi*, pois observamos a mesma reação frente às sete linhagens de *S. racemosum* (Figura 4).

Silva et al. (2006b) determinaram que o crescimento micelial de *L. gongylophorus*, também isolado de jardim de fungo de *A. sexdens rubropilosa*, foi inibido em 75% e 26% quando confrontado com *Trichoderma harzianum* e *Acremonium kiliense*, respectivamente. Nosso trabalho encontrou um nível de inibição intermediário de 50% para *S. racemosum* (Tabela 4). Já o nível de inibição apresentado por *E. weberi* A086a (Tabela 4) foi semelhante

ao observado por Silva et al. (2006b), que encontraram valores na faixa de 43 a 68% de inibição. Apesar de Silva et al. (2006b) terem trabalhado com diâmetro de crescimento radial e não área de crescimento (como o presente estudo), o produto da equação é um índice em porcentagem, portanto a comparação é coerente. O elevado nível de inibição proporcionado por *T. harzianum*, observado por Silva et al. (2006b), é atribuído à capacidade deste microfungo de secretar diversas enzimas ou compostos secundários com ação antifúngica, sendo um gênero de fungo frequentemente encontrado nos jardins das formigas cortadeiras (CURRIE; STUART, 2001; RODRIGUES et al., 2005) e talvez o gênero de fungo mais utilizado no mundo para controle biológico de micopatógenos (VINCENT et al., 2007).

Figura 4. Escurecimento do reverso das colônias de *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006 observado nos experimentos de co-cultivo. (a) e (b) placas controle de *L. gongylophorus*, no terceiro e décimo quarto dia, respectivamente. (c) e (d) placas de *L. gongylophorus* na presença de *Syncephalastrum racemosum* A101, no terceiro e décimo quarto dia, respectivamente. Note o escurecimento na colônia do fungo mutualista (c) e (d).



Adicionalmente, Folgarait et al. (2011) demonstraram que o fungo *L. gongylophorus*, isolado de jardim de *Acromyrmex lundii* localizada na Argentina, foi inibido em 50% frente ao fungo *Lecanicillium lecanii* (considerado um fungo entomopatogênico). O experimento realizado por esses autores foi semelhante ao do presente estudo e podem ser diretamente comparados. Portanto, considerando os dados dos trabalhos de Silva et al. (2006b) e Folgarait

et al. (2011) é evidente que *S. racemosum* pode ser considerado um antagonista do fungo cultivado pelas formigas cortadeiras.

Tabela 4. Inibição do crescimento micelial de *Leucoagaricus gongylophorus* frente aos microfungos *Escovopsis weberi* e *Syncephalastrum racemosum*, em experimentos de co-cultivo.

Fungos	AF ¹	AI ²	LG ³	LG/LGC ⁴	Inibição (%)
<i>L. gongylophorus</i> FF2006	16,94	7,53	2,25 (LGC)	1	-
<i>E. weberi</i> A086a	7,24	7,71	0,94	0,42	58
<i>S. racemosum</i> A086b	8,71	7,49	1,16	0,51	49
<i>S. racemosum</i> A101	8,22	7,37	1,11	0,49	51
<i>S. racemosum</i> A130	9,04	7,72	1,17	0,52	48
<i>S. racemosum</i> H1a	8,80	7,99	1,10	0,49	51
<i>S. racemosum</i> H11a	8,51	7,53	1,13	0,50	50
<i>S. racemosum</i> H30	8,66	7,67	1,13	0,50	50

¹ AF: Área final

² AI: Área inicial

³ LG: AF/AI

⁴ LGC: LG de *L. gongylophorus* FF2006 (controle)

5.2 Bioensaios de co-cultivo *in vitro*: efeitos do fungo mutualista sobre os microfungos

Folgarait et al. (2011) observaram que o fungo mutualista também pode apresentar um efeito inibitório no crescimento micelial de microfungos. Esses autores demonstraram que *L. lecanii* inibiu o fungo mutualista, entretanto, *L. gongylophorus* também inibiu o crescimento desse microfungo. Outros relatos da literatura também sinalizaram que o fungo mutualista inibe o crescimento de outros fungos (HERVEY et al. 1977). Nesse sentido, resolvemos avaliar se o crescimento de *S. racemosum* e *E. weberi* também é afetado na interação com o fungo das formigas. Portanto, avaliamos o crescimento destes microfungos na presença e ausência de *L. gongylophorus* FF2006.

Tabela 5. Área de crescimento micelial (em cm²) de microfungos frente a *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006. Valores representam médias da área de crescimento (n= 10 réplicas por tratamento) na presença e ausência do fungo mutualista, seguidas do desvio padrão.

Microfungo	Presença	Ausência	P ¹
<i>Escovopsis weberi</i> A086a	57,79 ±7,48	30,52 ±16,51	0,00308
<i>Syncephalastrum racemosum</i> A086b	47,81 ±5,69	55,6 ±10,06	0,07929
<i>Syncephalastrum racemosum</i> A101	56,13 ±5,25	55,98 ±4,54	0,95066
<i>Syncephalastrum racemosum</i> A130	53,27 ±6,54	57,33 ±4,66	0,16623
<i>Syncephalastrum racemosum</i> H1a	50,18 ±2,42	60,44 ±3,71	0,00027
<i>Syncephalastrum racemosum</i> H11a	54,61 ±7,35	52,71 ±9,52	0,30435
<i>Syncephalastrum racemosum</i> H30	48,44 ±5,01	59,22 ±3,98	0,00150

¹ Valores de P foram calculados segundo o teste t de Student (p= 0,05)

Analisando os resultados do teste estatístico apresentados na tabela 5, pode-se perceber que os resultados com valores de $P < 0,05$, ou seja, aqueles cuja diferença entre presença e ausência de *L. gongylophorus* é significativa, aparecem tanto para *E. weberi* A086a, quanto para *S. racemosum* H1a e H30. No entanto, percebe-se que o efeito sobre *S. racemosum* foi o oposto ao efeito sobre *E. weberi*. No caso, *S. racemosum* H1a e H30 apresentaram áreas de crescimento maiores na ausência de *L. gongylophorus*, já *E. weberi* apresentou área de crescimento maior na presença de *L. gongylophorus*. Visto que *E. weberi* é considerado parasita especializado nos ninhos de formigas cortadeiras (CURRIE et al., 2003), é possível que os produtos do metabolismo de *L. gongylophorus* estimulem o crescimento e desenvolvimento da colônia de *E. weberi*. No trabalho de Gerardo et al. (2006), os autores demonstraram que linhagens específicas de *Escovopsis*, quando confrontados *in vitro* com fungos cultivados pelas formigas do gênero *Apterostigma*, crescem preferencialmente sobre as colônias de fungos mais associados aos seu parasita. Em outras palavras, existe uma relação de especificidade, mediada por compostos químicos (i.e. quimiotaxia), entre o parasita *Escovopsis* e os diferentes fungos cultivados pelas formigas do gênero *Apterostigma* (CURRIE et al., 2003; GERARDO et al., 2006).

O efeito inibitório do fungo mutualista no crescimento de microfungos foi notado pela primeira vez por Hervey et al. (1977), que atribuíram os efeitos observados à produção de metabólitos secundários pelo fungo mutualista. Levando em consideração o argumento colocado pelos autores, é possível que a linhagem FF2006 também produza metabólitos secundários difusíveis em meio de cultivo, o que provavelmente afetou o crescimento de algumas linhagens de *S. racemosum*. Se esses metabólitos são os mesmos que estimulam os efeitos de promoção de crescimento de *E. weberi*, é um assunto para estudos futuros que visem elucidar a classe química a qual pertence esses compostos.

Este experimento demonstrou que existe uma sensibilidade de *S. racemosum* frente ao fungo mutualista. Este é um dado importante, e deve ser levado em consideração caso *S. racemosum* venha ser utilizado como um agente de controle de formigas cortadeiras.

5.3 Cultivo direto dos microfungos sobre o jardim das formigas

De fato, no curso do experimento ocorreram contaminações nos jardins de fungo utilizados como controle, contudo, o número máximo de réplicas contaminadas nesse tratamento não ultrapassou a quatro

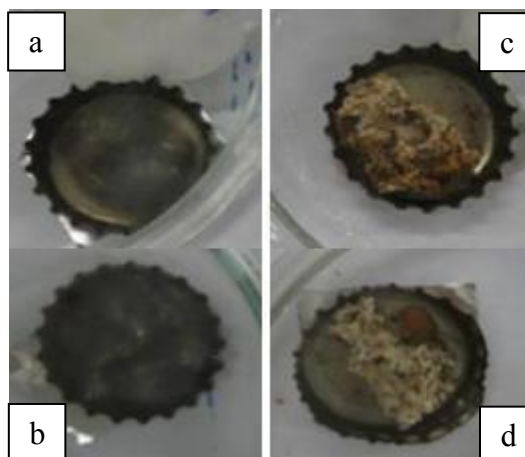
Os sinais de infecção dos jardins pelos microfungos iniciaram a partir do segundo dia de incubação. Ao quarto dia todos os fragmentos de jardim ($n = 42$, seis réplicas por

tratamento) estavam inteiramente recobertos por micélios dos microfungos e por esporos (Tabela 6 e Figura 5). A velocidade com que *S. racemosum* cresceu sobre os fragmentos de jardim e esporulou sobre eles foi rápida. As linhagens H1a e H11a recobriram e esporularam por completo os fragmentos de jardim ao segundo dia, em cinco das seis réplicas (83% das réplicas inteiramente tomadas por micélio e esporos de *S. racemosum*). *E. weberi* apresentou a menor velocidade de crescimento e esporulação, dentre todos os microfungos. Ao terceiro dia, as linhagens A101, A130, H11a e H30 recobriram inteiramente o fragmento de jardim e haviam esporulado sobre ele, em todas as réplicas; cinco das seis réplicas das linhagens A086b e H1a encontravam-se na mesma situação ao terceiro dia (83%). Os resultados desse experimento demonstram a alta virulência de *S. racemosum* sobre o jardim das formigas cortadeiras. O crescimento e esporulação de *S. racemosum* nos fragmentos de jardim restringiram-se à superfície dos mesmos, já *E. weberi* esporulou de forma expansiva, com conídios e micélio por toda a placa de Petri (Figura 6).

Tabela 6. Porcentagem das réplicas (n= 6) por tratamento (microfungos e controle) que esporularam sobre os fragmentos de jardim de *Atta sexdens rubropilosa*, após inoculação dos microfungos nos fragmentos do jardim, ao longo de quatro dias.

Microfungo	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia
<i>Escovopsis weberi</i> A086a	0%	0%	67%	100%
<i>Syncephalastrum racemosum</i> A086b	0%	0%	83%	100%
<i>Syncephalastrum racemosum</i> A101	0%	17%	100%	100%
<i>Syncephalastrum racemosum</i> A130	0%	17%	100%	100%
<i>Syncephalastrum racemosum</i> H1a	0%	83%	83%	100%
<i>Syncephalastrum racemosum</i> H11a	0%	83%	100%	100%
<i>Syncephalastrum racemosum</i> H30	0%	50%	100%	100%

Figura 5. Cultivo direto de *Syncephalastrum racemosum* A101 (a) e H30 (b) sobre fragmento de jardim de *Atta sexdens rubropilosa*, ao terceiro dia. As letras (c) e (d) são fragmentos de jardins controle (sem inoculação de microfungos).



Tampas de garrafa foram utilizadas no experimento, pois resistiam ao processo de esterilização (autoclave). Uma tampa foi disposta em cada placa de Petri (60 x 15 mm). No interior da tampa foi pesado 0,3 g de jardim de fungo.

Figura 6. Cultivo direto de *Syncephalastrum racemosum* (a) e *Escovopsis weberi* (b) sobre fragmento de jardim de *Atta sexdens rubropilosa*, ao quarto dia. Note que em (b) a esporulação expansiva não se limitou somente à superfície do jardim.



5.4 Avaliação da viabilidade dos esporos dos microfungos

Conforme descrito no item 4.3, a germinação de esporos dos diferentes microfungos foi contabilizada utilizando a média entre as três réplicas por isolado e os resultados estão reunidos na tabela 7.

Tabela 7. Viabilidade dos esporos de *Escovopsis weberi* (A086a) e *Syncephalastrum racemosum* (demais códigos).

Esporos	Microfungos						
	A086a	A086b	A101	A130	H1a	H11a	H30
Inoculados ¹	580	30	60	60	40	90	60
Germinado ²	4,7	7	18	14	19,5	29	30,3
Proporção	0,8%	23,3%	30%	23,3%	48,7%	32,2%	50,5%

¹ Número estimado de esporos inoculados em cada placa de PDA (n= 3 placas)

² Média de UFCs que cresceram nas três placas de PDA

Em estudos sobre os efeitos da secreção mandibular e do fluído fecal de operárias de *A. sexdens rubropilosa* na germinação de esporos de microfungos, Rodrigues et al. (2008a) demonstraram que esporos de *Escovopsis* (sem tratamento com secreções da formiga) apresentaram uma taxa de germinação menor que 3%. Comparado ao *E. weberi* A086a, todas as linhagens de *S. racemosum* apresentaram maiores taxas de germinação (Tabela 7).

Visto que todos os isolados inibiram significativamente o crescimento de *L. gongylophorus*, não se diferenciando quanto à maior ou menor potencial inibitório (Figura 3 e Tabelas 2 e 3), e na tentativa de correlacionar a virulência de *S. racemosum* (Tabelas 4 e 6) com a viabilidade dos esporos (Tabela 7), percebe-se que os isolados A101, H1a, H11a e H30, que apresentaram, respectivamente, 30%, 48,7%, 32,2% e 50,5% de taxa germinativa dos esporos, são aqueles que esporularam com maior velocidade sobre fragmentos de jardim, quando comparados aos outros isolados. Nossos resultados sugerem que a viabilidade dos esporos pode correlacionar-se com a virulência de *S. racemosum*, conforme apresentado na tabela 7. Contudo, estudos adicionais devem ser realizados.

5.5 Natureza da interação

Encontramos dificuldades para detectar o mecanismo físico pelo qual *S. racemosum* utiliza para afetar o crescimento do fungo mutualista. Apesar da presença de septos nas hifas do fungo mutualista e da ausência destes nas hifas de *S. racemosum*, não foi possível distinguir com clareza a interação das hifas de cada fungo.

Devido aos resultados obtidos nesses ensaios, buscamos avaliar se a presença de compostos voláteis e não-voláteis estão envolvidos na interação química entre os fungos.

5.5.1 Compostos não-voláteis

Os resultados do teste estatístico apontam diferenças não significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos com *S. racemosum* A101 e o controle (Tabelas 8 e 9). Assim, os resultados sugerem que *S. racemosum* A101 não produz compostos solúveis em água com efeito inibitório sobre o crescimento micelial de *L. gongylophorus*. A explicação alternativa pode ser que *S. racemosum* produza tais compostos, porém nosso experimento falhou em detectar os compostos provavelmente devido a um problema do método empregado. Tal problema pode estar relacionado à velocidade com que o micélio de *S. racemosum* cresceu sobre a superfície do papel celofane (entre 36h a 48h). Nesse intervalo de tempo, houve a necessidade de se retirar o papel com o micélio antes de este entrar em contato com o meio de cultura pelas bordas do papel, portanto este breve intervalo de tempo pode ter sido insuficiente para a difusão dos compostos químicos no meio de cultura. Uma vez contornado esse problema, outras linhagens de *S. racemosum* deveriam ser estudadas para avaliar o mecanismo do antagonismo frente ao fungo das formigas.

Um método alternativo seria cultivar *S. racemosum* em meio líquido e incorporar o filtrado do meio de cultivo em meio sólido. Posteriormente, inocula-se *L. gongylophorus* neste meio.

Tabela 8. Resultado do teste ANOVA 2-fatores do experimento de compostos não-voláteis.

Variáveis	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F	P
Tratamento ¹	1	1,37813	1,37813	0,34456	0,55904
Dias ²	3	8518,75938	2839,58646	709,95824	0
Interação	3	6,10938	2,03646	0,50916	0,67722
Modelo	7	8526,24687	1218,03527	304,53525	0
Erro	72	287,975	3,99965	--	--
Total corrigido	79	8814,22187	--	--	--

¹ *Syncephalastrum racemosum* e controle do fungo mutualista

² Zero, oito, 16 e 24 dias após incubação de *Leocagaricus gongylophorus*.

Tabela 9. Diâmetro de crescimento micelial (em mm) de *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006 frente a *Syncephalastrum racemosum* A101, no experimento de compostos não-voláteis. Valores representam médias do diâmetro de crescimento (n= 10 réplicas por tratamento) seguidas do desvio padrão.

Dias	Tratamentos	
	Controle	<i>S. racemosum</i> A101
0	8,25 ±0,98	8,1 ±0,88
8	14,7 ±1,00	14,45 ±0,64
16	26,1 ±2,77	26,55 ±2,05
24	35,4 ±2,80	34,3 ±3,03

5.5.2 Compostos voláteis

A colônia de *L. gongylophorus* apresentou características de “desfalecimento”, que são a perda da coloração e posterior paralisação do crescimento e transparência da colônia, em todas as placas tratamento e em duas placas controle. Como esses sinais apareceram primeiro nas placas tratamento, acredita-se que se tratava do efeito dos compostos voláteis produzidos por *S. racemosum* A101. Após verificar que as colônias de *S. racemosum* não cresceram como o observado em outras réplicas, imaginamos que *L. gongylophorus* também poderia estar produzindo compostos e inibindo o crescimento de *S. racemosum*, como observado para algumas linhagens de *S. racemosum* nos experimentos de co-cultivo. Os mesmos sinais também foram observados em *L. gongylophorus* nas placas controle, assim, é possível que o gás carbônico resultante do metabolismo das colônias, seja o fator que ocasionou o colapso dos cultivos nesse sistema fechado, elaborado no presente estudo (Figura 2).

Dessa forma, o método utilizado neste trabalho para verificar a presença de compostos voláteis, seguindo o proposto pela literatura (DENNIS; WEBSTER, 1971a, 1971b; ALVINDIA; NATSUAKI, 2008), mostrou-se pouco eficiente, e não encontramos sucesso na execução do experimento, de modo que a natureza da interação entre *S. racemosum* e *L. gongylophorus* será avaliada em estudos futuros, utilizando outras técnicas.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho contribuiu no avanço do conhecimento de *S. racemosum* e sua associação com o jardim de formigas cortadeiras. Estudando de modo sistemático a ação de *S. racemosum* sobre o fungo *L. gongylophrous*, foi possível observar a ação antagonista de *S. racemosum*, confirmando observações realizadas por pesquisadores ou mesmo nos resultados de trabalhos prévios. Os experimentos de cultivo direto demonstraram a habilidade de *S. racemosum* em colonizar rapidamente o jardim de fungo. Tais características constituem em evidências de que *S. racemosum* pode atuar como antagonista do fungo das formigas. Estudos adicionais devem ser desenvolvidos para explorar a possibilidade do emprego desse micro-organismo no combate às formigas cortadeiras.

REFERÊNCIAS

- ABRAMOFF, M. D. et al. Image processing with ImageJ. **Biophotonics International**, South Molton, v. 11, n. 7, p. 36-42, 2004.
- AUGUSTIN, J. O. et al. Fungos parasitas de formigas-cortadeiras e do seu fungo simbionte. In: DELLA-LUCIA, T. M. C. (Ed.) **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Editora da UFV, 2011, p. 262-283.
- ALVES, S. B.; MORAES, S. A. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. IN: ALVES, S. B. (Ed.) **Controle microbiano de insetos**. 2 ed. Piracicaba: Editora Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz FEALQ, 1998. 1163p.
- ALVES, S. B.; PEREIRA, R. M. Produção de fungos entomopatogênicos. IN: ALVES, S. B. (Ed.) **Controle microbiano de insetos**. 2 ed. Piracicaba: Editora Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz FEALQ, 1998. 1163p.
- ALVINDIA, D. G.; NATSUAKI, K. T. Evaluation of fungal epiphytes isolated from banana fruit surfaces for biocontrol of banana crown rot disease. **Crop Protection**, v. 27, p. 1200–1207, 2008.
- AYRES, M. et al. **BioEstat 5.0**: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Imprensa Oficial do Estado do Pará, 2007. 364 p.
- BCPC. **The pesticide manual**: a world compendium. 13 ed. Hampshire: BCPC, 2003. 1344p.
- BOARETTO, M. A. C.; FORTI, L. C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. **Série Técnica IPEF**, Piracicaba, v.11, n.30, p. 31-46, 1997.
- BUENO, F. C. et al. Toxicity of *Cedrela fissilis* to *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and its symbiotic fungus. **Sociobiology**, Chico, v. 45, p. 389-399, 2005.
- BUENO, O. C. et al. Effect of sesame (*Sesamum indicum* L.) on nest development of *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hym., Formicidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 119, p. 341-343, 1995.
- CAFARO, M. J.; CURRIE, C. R. Phylogenetic analysis of mutualistic filamentous bacteria associated with fungus-growing ants. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 51, n. 6, p. 441-446, 2005.
- COMISSÃO de Revisão dos Poluentes Orgânicos Persistentes. Perfluorooctane sulfonate: risk profile. In: ENCONTRO DA COMISSÃO DE REVISÃO DOS POLUENTES ORGÂNICOS PERSISTENTES, n. 2., 2006, Geneva. UNEP/POPS/POPRC.2/17/Add.5. Disponível em: <<http://chm.pops.int/Convention/POPsReviewCommittee/Reviewedchemicals/tabid/781/Default.aspx>> Acesso em: 11 dez. 2011.
- CONFERÊNCIA das Partes. COP4-SC4/17. In: ENCONTRO DA CONFERÊNCIA DAS PARTES PARA A CONVENÇÃO DE ESTOCOLMO SOBRE POLUENTES ORGÂNICOS PERSISTENTES, n. 4., 2009, Geneva. Disponível em: <<http://chm.pops.int/Convention/COP/COPDecisions/tabid/208/Default.aspx>>. Acesso em: 11 dez. 2011.

- CURRIE, C. R. A community of ants, fungi, and bacteria: a multilateral approach to studying symbiosis. **Annual Review Microbiology**, v. 55, p. 357-380, 2001
- CURRIE, C. R.; STUART, A. E. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, London, v. 268, n. 1471, p. 1033-1039, 2001.
- CURRIE, C. R. et al. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 96, n. 7, p. 7998-8002, 1999a.
- CURRIE, C. R. et al. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, London, v. 398, n. 6729, p. 701-704, 1999b.
- CURRIE, C. R. et al. Ancient tripartite coevolution in the attine ant-microbe symbiosis. **Science**, Washington, v. 299, p.386-388, 2003.
- DELLA-LUCIA, T. M. C. (Ed.) **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Editora da UFV, 2011. 421 p.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: I. Production of non-volatile antibiotics. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 57, n. 1, p. 25-39, 1971a.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: II. Production of volatile antibiotics. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 57, n. 1, p. 41-48, 1971b.
- FOLGARAIT, P. et al. Preliminary In Vitro Insights into the Use of Natural Fungal Pathogens of Leaf-cutting Ants as Biocontrol Agents. **Current Microbiology**, v. 63, p.250-258, 2011.
- FORTI, L. C. et al. Dependência de densidade na predação de rainhas de *Atta* (Hymenoptera: Formicidae) pelo besouro *Canthon virens* (Mannerhein) (Coleoptera: Scarabaeidae). In: Simpósio De Controle Biológico, 3, 1992, Águas de Lindóia, SP. **Anais. Águas de Lindóia: CNPDA/EMBRAPA**, 1992, p. 180.
- GERARDO, N. M. et al. Exploiting a mutualism: parasite specialization on cultivars within the fungus-growing ant symbiosis. **Proceeding of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 271, p. 1791–1798, 2004.
- GERARDO, N. M. *et al.* Ancient host–pathogen associations maintained by specificity of chemotaxis and antibiosis. **Plos Biology**, v. 4, n. 8, p. 1358-1363, 2006.
- HERVEY, A. et al. Studies on fungi cultivated by ants. **Brittonia**, v. 29, p. 606-619, 1977.
- HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The Ants**. Berlin; Heidelberg: Springer Verlag, 1990. 732 p.
- LITTLE, A. E. F.; CURRIE, C. R. Symbiotic complexity: discovery of a fifth symbiont in the attini-microbe symbiosis. **Biology Letters**, London, v. 3, n.5, p. 501-504, 2007.

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

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

LOUREIRO, E. S.; MONTEIRO, A. C. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Paecilomyces farinosus*, patogênicos para operárias de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Formicidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 1, p. 35-40, 2004.

MIKHEYEV, A. S. et al. Cryptic sex and many-to-one coevolution in the fungus growing ant symbiosis. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 28, p. 10702-10706, 2006.

MÖLLER, A. **Die Pilzgärten einiger südamerikanischer Ameisen**. Alemanha: Botanische Mitteilungen aus den Tropen, 1893. v. 6, p. 1-27.

MUELLER, U. G. Ant versus fungus versus mutualism: Ant-cultivar conflict and the deconstruction of the Attine ant–fungus symbiosis. **The American Naturalist**, Chicago, v. 160, n. S4, p. S67-S98, 2002.

MUELLER, U. G. et al. The Origin of the Attini Ant-Fungus Mutualism. **The Quarterly Review of Biology**, v.76, n. 02, p. 170-197, 2001.

MUELLER, U. G. et al. Monoculture of leafcutter ants gardens. *Plos One*, v. 5, n. 9, 2010.

MUCHOVEJ, J. J.; DELLA-LUCIA, T. M. C. *Escovopsis*, a new genus from leaf-cutting ant nests to replace *Phialocladus* nomem invalidum. **Mycotaxon**, v. 37, n. 1, p. 191-195, 1990.

OECD. Cooperation on existing chemicals hazard assessment of perfluorooctane sulfonate (pfos) and its salts. IN: ENVIRONMENT DIRECTORATE, JOINT MEETING OF THE CHEMICALS COMMITTEE AND THE WORKING PARTY ON CHEMICALS, PESTICIDES AND BIOTECHNOLOGY, 2002, Paris. ENV/JM/RD(2002)17/FINAL. Disponível em: <<http://www.oecd.org/dataoecd/23/18/2382880.pdf>> Acesso em 31 jan. 2012

ORTIZ, A.; ORDUZ, S. *In vitro* evaluation of *Trichoderma* and *Gliocladium* antagonism against the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 150, p. 53-60, 2001.

PAGNOCCA, F. C. et al. Toxicity of sesame extracts to the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. **Bulletin of Entomological Research**, v. 80, p. 349-352, 1990.

PAGNOCCA, F. C. et al. Yeasts isolated from a fungus-growing ant nest, including the description of *Trichosporon chiarellii* sp. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 60, n. 6, p. 1454-1459, 2010.

PAGNOCCA, F. C. et al. Micro-organismos associados às formigas-cortadeiras. IN: DELLA-LUCIA, T. M. C. (Ed.) **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Editora da UFV, 2011, p. 262-283.

- POULSEN, M.; BOOMSMA, J. Mutualistic fungi control crop diversity in fungus-growing ants. **Science**, Washington, v. 307, n. 5710, p.741-744, 2005.
- REYNOLDS, H. T.; CURRIE, C. R. Pathogenicity of *Escovopsis weberi*: The parasite of the attine ant-microbe symbiosis directly consumes the ant-cultivated fungus. **Mycologia**, v. 96, n. 5, p. 955–959, 2004.
- RINALDI, I. M. P. et al. Biologia de *Canthon virens* (Coleoptera, Scarabaeidae) predador de rainhas de *Atta* (Hymenoptera, Formicidae) em condições de campo. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 14, 1993, Piracicaba, SP. **Resumos**. Piracicaba: SEB, 1993, p.51.
- RODRIGUES, A. et al. Contaminação de ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae) com esporos de fungos filamentosos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo v. 71, supl., p. S149–S227, 2004.
- RODRIGUES, A. et al. Variability of non-mutualistic filamentous fungi associated with *Atta sexdens rubropilosa* nests. **Folia Microbiologica**, Praga, v. 50, n. 5, p.421-425, 2005.
- RODRIGUES, A. et al. Leaf-cutting ant faecal fluid and mandibular gland secretion: effects on microfungi spore germination. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 64-67, 2008a.
- RODRIGUES, A. et al. Microfungal “weeds” in the leafcutter ant symbiosis. **Microbial Ecology**, Washington, v. 56, n. 4, p. 604-614, 2008b
- RODRIGUES, A. et al. Ecology of microfungal communities in gardens of fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae): A year-long survey of three species in Central Texas. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 78, n. 2, p. 244-255, 2011.
- SANTOS, A. V. et al. Selection of entomopathogenic fungi for use in combination with sub-lethal doses of imidacloprid: perspectives for the control of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). **Micopathologia**, v. 163, n. 233, 2007.
- SANTOS-OLIVEIRA, M. F. S. et al. Toxicity of *Azadirachta indica* to leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 47, n. 2, p. 423-431, 2006.
- SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 105, n.14, p. 5435-5440, 2008.
- SILVA, A. et al. Starch metabolism in *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. **Current Microbiology**, New York, v. 53, n.1, p. 68- 71, 2006a.
- SILVA, A. et al. Susceptibility of the ant-cultivated fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales: Basidiomycota) towards microfungi. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 162, n. 2, p. 115-119, 2006b.
- TAERUM, S. J. et al. Low host-pathogen specificity in the leaf-cutting ant-microbe symbiosis. **Proceeding of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, Inglaterra, v. 274, n. 1621, p. 1971-1978, 2007.

VINCENT, C.; GOETTEL, M. S.; LAZAROVITS, G. (Eds.) **Biological Control: a Global Perspective**. Oxfordshire: CABInternational, 2007, 440p.

WEBER, N.A. **Gardening ants: the attines**. Philadelphia: Memoirs of the American Philosophical Society, 1972. v. 92, 146p.