

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 28/02/2022.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE RIO CLARO



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

KARINA BUENO DE OLIVEIRA

METABÓLITOS DO FUNGO MUTUALISTA DAS FORMIGAS ATÍNEAS COMO
MEDIADORES DA INTERAÇÃO COM O PARASITA *ESCOVOPSIS*

Rio Claro – SP
Fevereiro – 2020

KARINA BUENO DE OLIVEIRA

**METABÓLITOS DO FUNGO MUTUALISTA DAS FORMIGAS ATÍNEAS COMO
MEDIADORES DA INTERAÇÃO COM O PARASITA *ESCOVOPSIS***

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

Orientador: Prof. Dr. André Rodrigues

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira

Rio Claro – SP
Fevereiro – 2020

O48m

Oliveira, Karina Bueno de

Metabólitos do fungo mutualista das formigas atíneas como mediadores da interação com o parasita Escovopsis / Karina Bueno de Oliveira. -- Rio Claro, 2020

66 f. : il., tabs., fotos

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

Orientador: André Rodrigues

Coorientador: Paulo Cezar Vieira

1. Microbiologia. 2. Crescimento. 3. Escovopsis. 4. Metabólitos. 5. Crescimento microbiano. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

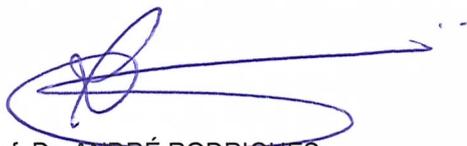
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: METABÓLITOS DO FUNGO MUTUALISTA DAS FORMIGAS ATÍNEAS COMO MEDIADORES DA INTERAÇÃO COM O PARASITA *ESCOVOPSIS*

AUTORA: KARINA BUENO DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: ANDRÉ RODRIGUES

COORIENTADOR: PAULO CÉZAR VIEIRA

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



Prof. Dr. ANDRÉ RODRIGUES
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro

Prof. Dr. FERNANDO CARLOS PAGNOCCA
CEIS / IB Rio Claro



Profa. Dra. CAMILA RAQUEL PALUDO
ICBS - Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde / Universidade Federal de Mato Grosso, Câmpus
Universitário do Araguaia

Rio Claro, 28 de fevereiro de 2020

“A ciência nunca resolve um problema sem criar, pelo menos, outros dez.”

George Bernard Shaw

Dedico este trabalho aos meus pais, que me deram a vida, e ao meu noivo, que dela comigo compartilha.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de, em sua imensa grandeza, permitir-me desvendar parte dos mistérios que envolvem Suas obras. Traduzir em palavras as maravilhas de Sua natureza é um desafio o qual não poderia aceitar se não fosse por Ti capacitada.

Agradeço aos meus pais que, mesmo em meio às tantas dificuldades nessa vida, e na simplicidade de seus conhecimentos, me ajudaram a concluir este trabalho.

Aos meus irmãos (Eric, Jô e Samuca), muito obrigada pelo amor. Vocês são parte do melhor que há em mim! Ao Eric, um agradecimento especial por sempre me socorrer com meu computador que, nos momentos de maior necessidade, simplesmente deixou de funcionar e você o consertou!

Ao meu noivo, Victor, agradeço imensamente o amor e a paciência dedicados neste período em que fui mestranda. Sua compreensão e tempo investido em mim foram determinantes na conclusão deste trabalho. Em você me apoio e no seu sorriso, ganho forças...

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Rodrigues, agradeço por ter me dado a oportunidade de trabalhar em seu laboratório desde 2013. Mesmo diante de minha inexperiência com relação a ciência e os assuntos que a compreendem, foi paciente. Dedicou boa parte do seu escasso tempo para me auxiliar na compreensão do meu trabalho e na escrita desse. Foi também um exemplo para mim em sala de aula durante o estágio docência. Um verdadeiro mestre, ao qual eu certamente irei me recordar e, quem sabe algum dia, possa espelhar.

Agradeço também ao meu coorientador, Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira, por todo o suporte fornecido para a realização deste estudo. Sem ele, certamente não haveríamos avançado as fronteiras do conhecimento nas áreas de abrangência deste trabalho, como o fizemos.

Nesse contexto, aproveito para agradecer ao Airton. Eu seria incapaz de mensurar as horas e o imenso trabalho que você dedicou a este trabalho. Apenas os nossos resultados talvez possam sugerir, dado o sucesso que obtivemos, tamanha a sua dedicação!

Carinhosamente, agradeço meus amigos do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF), tanto aqueles presentes, como aqueles que já deixaram o laboratório. Foi neles que me apoiei sempre que precisei enquanto dividíamos o mesmo espaço de trabalho. Com vocês, ri muito, chorei e aprendi. Aprendi sobre ciência e sobre a vida. Morgana, Tati, Rodolpho, Enzo, Aryel, Quimi e Maria (os atuais). De cada um de vocês, eu poderia citar uma particularidade. No entanto, o que torna o ambiente do LESF tão especial não são essas particularidades. Mas sim, o todo de si que cada um doa diariamente ao trabalho que

desempenha e ao próximo para que o ambiente funcione perfeitamente bem. Isso fez toda diferença em minha vida e na conclusão deste trabalho.

Aos amigos de “fora” do LESF (Raíssa, Luciana e Mirella), agradeço imensamente o carinho que têm por mim. Com palavras e por vezes abraços, me ajudaram muito nessa caminhada. Me deram força quando precisei e, principalmente, esperança de que “tudo passa”. À Mirella, um agradecimento especial pela parceria em sala de aula e também fora dela, a qual resultou em uma grande amizade!

A Daiane do CEIS e ao Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca, deixo um agradecimento especial. Vocês que sempre me atenderam fornecendo, em boa parte do meu projeto, material e equipamentos para que eu pudesse trabalhar. Muito obrigada!

Agradeço também aos colegas (alunos, professores e técnicos) do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, pela amizade e os socorros prestados sempre que necessário. Agradeço principalmente à Prof^a Dr^a Daiane Cristina Sass e seus alunos que me atenderam todas as vezes em que precisei, seja de uma orientação relacionada a parte química de meus experimentos ou por liofilizarem os extratos orgânicos. Também agradeço ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada), por fornecer o apoio acadêmico necessário para concluir o mestrado.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de mestrado concedida (Processo nº 2018/12481-7). O presente estudo está vinculado ao Projeto Temático (Processo nº 2012/25299-6), coordenado pelo Prof. Dr. João Batista Fernandes (Departamento de Química, UFSCar – São Carlos). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

O jardim de fungo das formigas atíneas abriga uma microbiota diversa, que contempla interações microbianas mediadas por compostos químicos. Embora estudos investigaram os metabólitos produzidos pelos fungos cultivados (*Leucoagaricus* spp.) por esses insetos, nada se sabe a respeito dos compostos químicos que atuam na interação com *Escovopsis* sp., um fungo considerado parasita do parceiro fúngico das atíneas. Neste trabalho investigamos os metabólitos produzidos por três fungos mutualistas cultivados por diferentes formigas atíneas, para responder as seguintes perguntas: a) os metabólitos produzidos pelos fungos mutualistas medeiam a interação com *Escovopsis* sp.?; b) o dia de crescimento e a concentração dos metabólitos dos fungos mutualistas interferem na resposta de *Escovopsis* sp.?; c) compostos solúveis e voláteis estão envolvidos na interação? Para tanto, foram realizados bioensaios (i) com os filtrados dos três fungos mutualistas nas concentrações 1:1 e 1:10, obtidos em diferentes dias de cultivo; (ii) com a fração orgânica e subfrações desses filtrados frente a *Escovopsis* sp., (iii) de volatilidade entre os fungos mutualistas e *Escovopsis* sp.; além (iv) do estudo químico das frações e subfrações orgânicas. Como resultado, demonstramos que a interação *Escovopsis*-fungo mutualista é mediada por compostos químicos solúveis e voláteis, pois observamos uma maximização do crescimento micelial do parasita na presença tanto dos filtrados de cultivo dos fungos mutualistas, suas frações e subfrações, quanto nos experimentos de volatilidade. Além disso, identificamos duas substâncias da classe das dicetopiperazinas (subfrações C3 e C5) e o 5-hidroximetilfurfural. A dicetopiperazina da subfração C5 e o 5-hidroximetilfurfural atuam como sinalizadores envolvidos na interação *Escovopsis*-fungo mutualista, pois o parasita maximiza o crescimento na presença dessas substâncias. Tais compostos foram obtidos dos filtrados do 12º dia de crescimento de *Leucoagaricus* sp. AR04; no entanto, a resposta de crescimento maximizado do parasita independe das fases de crescimento do fungo mutualista, sendo tal fenômeno observado para os filtrados obtidos em todos os dias de cultivo desse micro-organismo. A antiga história evolutiva compartilhada entre esses dois fungos, talvez seja a responsável pela complexa interação química entre esses micro-organismos, especialmente à habilidade de reconhecimento de *Escovopsis* sp. para os compostos produzidos pelos fungos cultivados pelas formigas.

Palavras chave: Reconhecimento químico. Biossinalização. Interação química. Crescimento.

ABSTRACT

The fungus garden of attine ants harbors a diverse microbiota, whose members interact by chemical compounds. Although studies unraveled the metabolites produced by fungi cultivated (*Leucoagaricus* spp.) by these insects, little is known regarding the chemical compounds involved in the interaction with *Escovopsis* sp., a fungus known as a parasite of the ant fungal cultivars. Here, we investigated the metabolites produced by three mutualistic fungi cultivated by different attine ants to answer the following questions: a) Do the metabolites produced by the mutualistic fungi mediate the interaction with *Escovopsis* sp.?; b) Do the day of growth and the concentration of the metabolites interfere in the *Escovopsis* sp. response?; c) Are soluble and volatile compounds involved in this interaction? We addressed these questions by carrying out bioassays: (i) with culture filtrates of the three mutualistic fungi at two concentrations (1:1 and 1:10), obtained on different days of incubation; (ii) with the organic fraction and subfractions of these filtrates towards *Escovopsis* sp.; (iii) to determine volatile compounds are involved in the interaction; in addition to (iv) the chemical study of the organic fractions and subfractions. We demonstrated that the interaction between *Escovopsis* sp. and the mutualistic fungi of attine ants is mediated by soluble and volatile compounds, since we observed a maximization of the parasite's growth in the presence of both the mutualistic fungal culture filtrates, their fractions and subfractions, as well as in the volatility experiments. Also, we identified two substances from the class of diketopiperazines and the 5-hydroxymethylfurfural (subfractions 63 e 65). The diketopiperazine 65 and the 5-hydroxymethylfurfural act as signaling agents involved in the interaction *Escovopsis* sp. and the mutualistic fungus, because the parasite maximizes its growth in the presence of these substances. Such compounds were obtained from culture filtrates of the 12th day of growth of *Leucoagaricus* sp. AR04. However, the maximized growth response of the parasite did not depend on the growth phases of mutualistic fungi, because this response was observed in culture filtrates obtained on all days of cultivation of the mutualistic fungi. The ancient evolutionary history shared between these two fungi is likely responsible for the complexity of this chemical interaction, especially the ability of *Escovopsis* sp. to recognize the compounds produced by the ant fungal cultivars.

Keywords: Chemical recognition. Biosignaling. Chemical interaction. Growth.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Fungos mutualistas e <i>Escovopsis</i> sp.	14
3.2 Bioensaios de incorporação dos filtrados no meio de cultivo	14
3.3 Validação dos bioensaios de incorporação dos filtrados no meio de cultivo.....	16
3.4 Bioensaios de tempo e concentração dos filtrados dos fungos mutualistas em relação a <i>Escovopsis</i> sp. LESF 315.....	16
3.5 Determinação da atividade da fração orgânica dos filtrados	17
3.6 Ensaios para determinação da influência dos <i>Volatile Organic Compounds</i> (VOCs).....	19
3.7 Perfil químico do extrato bruto dos filtrados	20
3.8 Cultivo em escala ampliada para obtenção do extrato bruto do filtrado de <i>Leucoagaricus</i> sp. AR04	21
3.9 Obtenção das subfrações dos filtrados de <i>Leucoagaricus</i> sp. AR04	22
3.10 Ensaios biológicos com as subfrações	22
3.11 Fracionamento das subfrações B e C	23
3.12 Ensaios biológicos com as subfrações $\delta 5$ e $\delta 7$	23
4 RESULTADOS	25
4.1 Bioensaios de incorporação dos filtrados no meio de cultivo.....	25
4.2 Validação dos bioensaios de incorporação dos filtrados no meio de cultivo.....	25
4.3 Efeito do tempo e concentração dos filtrados no crescimento de <i>Escovopsis</i> sp. LESF 315	27
4.4 Determinação da atividade biológica dos extratos brutos dos três fungos mutualistas	30
4.5 Ensaios de volatilidade	32
4.6 Análise do perfil químico dos extratos brutos dos filtrados	33
4.7 Cultivo em escala ampliada para obtenção dos extratos brutos do filtrado de <i>Leucoagaricus</i> sp. AR04	34
4.8 Obtenção das subfrações dos filtrados de <i>Leucoagaricus</i> sp. AR04	34
4.9 Ensaios biológicos das subfrações	35
4.10 Fracionamento da subfração B	37
4.11 Fracionamento da subfração C	39
4.12 Ensaios biológicos com as subfrações $\delta 5$ e $\delta 7$ (5-hidroximetilfurfural)	42
5 DISCUSSÃO	44
6 CONSIDERAÇÕES	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXO	52

1 INTRODUÇÃO

Interações entre micro-organismos envolvem compostos químicos. São com eles que micro-organismos de uma espécie podem afetar o crescimento, o vigor e as populações de outra espécie microbiana (WHITTAKER; FEENY, 1971). No caso dos fungos, as interações químicas são fundamentais para a ecologia desses micro-organismos. Há casos que fungos micoparasitas ramificam as hifas em uma reação quimiotrófica à presença do fungo hospedeiro (CHET; BAKER, 1981). É também sabido que micoparasitas podem selecionar seus hospedeiros a partir do reconhecimento de compostos químicos liberados pelos mesmos (CHET; BENHAMOU, 1998). O entendimento dessa linguagem química das interações entre fungos constitui um importante marco para pesquisa e desenvolvimento, especialmente, a procura de eventuais alvos para controle biológico.

Considerando ambientes complexos, o jardim de fungo das formigas da subtribo *Attina* (i.e. as atíneas) constitui um sistema bastante interessante para o estudo de interações químicas. O jardim de fungo é o local no qual as formigas atíneas cultivam fungos como alimento (SCHULTZ; BRADY, 2008; WEBER, 1972). Estima-se que o mutualismo formiga-fungo originou há 53,6–66,7 milhões de anos, quando as formigas atíneas desenvolveram sua própria versão de agricultura (no caso, fungicultura), sendo capazes de cultivar o próprio alimento (JEŠOVNIK; GONZÁLEZ; SCHULTZ, 2016; BRANSTETTER et al., 2017).

Os gêneros que compreendem a subtribo *Attina* são classicamente agrupados em “atíneas basais” e “atíneas derivadas”, sendo *Atta*, *Acromyrmex*, *Trachymyrmex* e *Sericomyrmex*, os gêneros pertencentes ao último grupo (MEHDIABADI; SCHULTZ, 2010; SCHULTZ; BRADY, 2008). Os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* são conhecidos popularmente como saúvas e quenquéns, respectivamente. Essas formigas incorporam ao jardim de fungo folhas e flores frescas, muitas vezes de espécies vegetais importantes economicamente. Por esse motivo, são também chamadas de formigas cortadeiras de folhas, sendo consideradas pragas e responsáveis por onerosas perdas agrícolas e florestais no Neotrópico (DELLA LUCIA; GANDRA, GUEDES, 2014).

Na subtribo *Attina*, é possível encontrar uma diversidade de fungiculturas, que variam desde a espécie de fungo que as formigas cultivam, o tipo de substrato que coletam para nutrição do fungo, até aspectos comportamentais das operárias (MEHDIABADI; SCHULTZ, 2010). A fungicultura praticada pelos gêneros *Trachymyrmex* e *Sericomyrmex* (não-cortadeiras de folhas) é considerada uma forma mais derivada da subtribo, pois o fungo cultivado provavelmente originou-se daqueles cultivados pelas atíneas basais (CHAPELA et al., 1994). Até o momento esse fungo é tratado como pertencente ao gênero *Leucoagaricus*

(Basidiomycota: Agaricales, MUELLER et al., 2017). As formigas cortadeiras de folhas cultivam majoritariamente a espécie, *Leucoagaricus gongylophorus*, a qual possivelmente derivou-se dos fungos cultivados por *Trachymyrmex* e *Sericomyrmex* (MUELLER et al., 2017).

Após adaptar-se ao sistema, o fungo mutualista das atíneas derivadas tornou-se incapaz de apresentar uma vida fora da simbiose com as formigas (SCHULTZ et al., 2005). Muller e colaboradores (2017) apontaram que esses fungos pertencem a dois clados filogenéticos (A e B). O clado A compreende um grupo geneticamente homogêneo de *L. gongylophorus*, cultivado pelas formigas *Atta sexdens*, *Atta laevigata* e algumas espécies do gênero *Trachymyrmex* (MUELLER et al., 2018). O clado B corresponde a um grupo mais diverso de fungos (*Leucoagaricus* spp.), subdividido em pelo menos seis subclados. São também cultivados por *A. laevigata*, mas predominantemente por *Trachymyrmex* sp. e *Sericomyrmex* sp. (MUELLER et al., 2018).

Além do fungo mutualista, o jardim de fungo das formigas atíneas também abriga uma rica microbiota, composta por fungos filamentosos, leveduras e bactérias (PAGNOCCA; MASIULIONIS; RODRIGUES, 2012). Dentre os fungos filamentosos aí presentes, destaca-se o gênero *Escovopsis* (Ascomycota: Hypocreales), considerado parasita do fungo cultivado pelas formigas (CURRIE et al., 1999a). Até o momento, esse fungo não foi encontrado fora do ambiente das atíneas, o que apoia a ideia que esse parasita seja específico da associação das formigas atíneas-fungo mutualista (CURRIE, 2001; CURRIE et al., 2003).

Diversas interações químicas entre micro-organismos ocorrem no jardim das atíneas. Um exemplo é a produção de antibióticos pelas bactérias do gênero *Pseudonocardia* (localizadas na cutícula das formigas e também no jardim), capaz de afetar negativamente o crescimento do parasita *Escovopsis* sp. (CURRIE et al., 1999b; SEN et al., 2009). Em contrapartida, quando confrontado com essas bactérias, o parasita produz compostos secundários de defesa denominados de shearinina (BOYA et al., 2017; HEINE et al., 2018). A shearinina D também é capaz de prejudicar as defesas comportamentais das operárias, sendo letal, se acumulada nos tecidos das formigas (HEINE et al., 2018). Além das shearininas, também foram identificados os compostos cicloartroposona e emodina, também produzidos pelo parasita frente a *L. gongylophorus* (DHODARY et al., 2018). Tais moléculas estão associadas às atividades inseticidas, tremorgênicas (STAUB et al., 1993) e são também antifúngicas frente ao fungo mutualista (DHODARY et al., 2018).

Embora medeiem as interações no jardim das atíneas, os compostos químicos também estão envolvidos no processo de degradação de substratos para a obtenção de nutrientes pelo

fungo mutualista. De Fine Licht e colaboradores (2010) identificaram nos fungos das atíneas basais um perfil enzimático semelhante ao de fungos sapróbios e que são capazes de degradarem celulose, hemicelulose, pectina e amido. O sequenciamento do genoma de *L. gongylophorus* revelou que esse fungo pode codificar cerca de 145 enzimas lignocelulolíticas, sendo muitas pectinases, xilanases e amilases (AYWARD et al., 2013).

Entre outros metabólitos produzidos pelos fungos mutualistas, estão também aqueles relacionados à própria defesa, como antimicrobianos (AYLWARD et al., 2012). Dois compostos, 7-cloro-4,6-dimetoxi-1(3H)-isobenzofuranona e basidalina, foram elucidados de *Leucoagaricus carneifolia* (um parente relacionado à *L. gongylophorus*). Ambos demonstraram bioatividade frente a várias espécies bacterianas e fúngicas *in vitro* (HUFF et al., 1994). Em épocas diferentes, Hervey e Nair (1979) e Angeli-Papa (1984) relataram ter descoberto moléculas com ação antibacteriana produzidas por fungos cultivados pelas atíneas basais e derivadas. Angeli-Papa (1984) não chegou à identificação das moléculas encontradas. Todavia, o antibiótico encontrado por Hervey e Nair (1979) foi denominado de Lepioclorina.

Apesar dos compostos citados, são poucos os estudos que avaliaram o potencial antifúngico dos fungos mutualistas (WANG; MUELLER; CLARDY, 1998) e o perfil metabólico. Em um estudo recente com a interação *Escovopsis*-fungo mutualista, Folgarait e colaboradores (2011) observaram uma maior esporulação e crescimento do parasita na presença do hospedeiro. Esse fenômeno foi observado em experimentos *in vitro*, ou seja, em placas de Petri contendo meio de cultivo. Segundo os autores, esses resultados indicam que *Escovopsis* sp. é capaz de detectar compostos solúveis produzidos pelo fungo mutualista, os quais modificam o crescimento do parasita. Todavia, não se sabe quais são os compostos envolvidos nessa interação. Nesse contexto, o presente trabalho realizou o estudo dos metabólitos produzidos pelos fungos mutualistas das atíneas derivadas. Buscamos responder as seguintes perguntas: a) os metabólitos produzidos pelos fungos mutualistas medeiam a interação com *Escovopsis* sp.?; b) o dia de crescimento e a concentração dos metabólitos dos mutualistas interferem na resposta de *Escovopsis* sp.?; c) compostos solúveis e voláteis estão envolvidos na interação?

Nossos resultados demonstraram que a interação parasita-fungo mutualista é complexa do ponto de vista químico, pois foi encontrada uma diversidade de metabólitos nos extratos brutos e subfrações dos filtrados. A obtenção de dois metabólitos das subfrações, os quais são bioativos frente ao parasita, confirmou o envolvimento dessas substâncias na resposta maximizada de crescimento de *Escovopsis* sp.

6 CONSIDERAÇÕES

Demonstramos que a interação *Escovopsis*-fungo mutualista é mediada por compostos químicos solúveis e voláteis. Além disso, identificamos uma substância da classe das dicetopiperazinas e 5-hidroximetilfurfural, obtidas de *Leucoagaricus* sp. AR04, envolvidas na promoção do crescimento de *Escovopsis* sp. LESF 315. Nossos resultados sugerem que outras substâncias presentes nos filtrados dos três fungos mutualistas avaliados também podem estar envolvidas no fenômeno de maximização do crescimento do parasita. Tal diversidade química com efeito em *Escovopsis* sp. pode ser resultante da antiga história evolutiva entre o fungo mutualista e o parasita. Nosso estudo descobriu apenas algumas, das várias substâncias envolvidas nessa complexa interação entre fungos. Os resultados aqui apresentados são inéditos quanto à biologia dos fungos mutualistas citados e a interação destes com o parasita *Escovopsis* sp.

REFERÊNCIAS

- ABRÀMOFF, M. D.; MAGALHÃES, P. J.; RAM, S. J. Image processing with ImageJ. **Biophotonics International**, v. 11, n. 7, p. 36-42, 2004.
- ANGELI-PAPA, J. La culture d'un champignon par les fourmis attinis: mise en évidence des phénomènes d'antibiose dans le nid. **Cryptogamie Mycologie**, v. 5, [s/n], p. 147-154, 1984.
- AYWARD, F. O.; BURNUM-JOHNSON, K. E.; TRINGE, S. G.; TEILING, C.; TREMMEL, D. M.; MOELLER, J. A.; SCOTT, J. J.; BARRY, K. W.; PIEHOWSKI, P. D.; NICORA, C. D.; MALFATTI, S. A.; MONROE, M. E.; PURVINE, S. O.; GOODWIN, L. A.; SMITH, R. D.; WEINSTOCK, G. M.; GERARDO, N. M.; SUEN, G.; LIPTON, M. S.; CURRIE, C. R. *Leucoagaricus gongylophorus* produces diverse enzymes for the degradation of recalcitrant plant polymers in leaf-cutter ant fungus gardens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 12, p. 3770-3778, 2013.
- BENNETT, J. W.; HUNG, R.; LEE, S.; PADHI, S. Fungal and bacterial volatile organic compounds: an overview and their role as ecological signaling agents, in: Hock, B. (Ed.), **The Mycota IX, Fungal Association**, 2 edn., p. 373-393, 2012.
- BOYA, P. C.; FERNANDEZ-MARIN, H.; MEJIA, L. C.; SPADAFORA, C.; DORRESTEIN, P. C.; GUTIERREZ, M. Imaging mass spectrometry and MS/MS molecular networking reveals chemical interactions among cuticular bacteria and pathogenic fungi associated with fungus-growing ants. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 5604, 2017.
- BRANSTETTER, M. G.; JEŠOVNIK, A.; SOSA-CALVO, J.; LLOYD, M. W.; FAIRCLOTH, B. C.; BRADY, S. G.; SCHULTZ, T. R. Dry habitats were crucibles of domestication in the evolution of agriculture in ants. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 284, n. 1852, 2017.
- BURGE, W. D. Anaerobic decomposition of DDT in soil. Acceleration by volatile components of Alfalfa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 19, n. 2, p. 375-378, 1971.
- CALABRESE, E. J.; BLAIN, R. The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the hormesis database: an overview. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 202, [s/n], p. 289-301, 2005.
- COLLADO, I. G.; GARCIA-PAJÓN, C. M. Secondary metabolites isolated from *Colletotrichum* species, **Natural Products Report**, v. 20, n. 4, p. 246, 2003.
- CHAPELA, I. H.; REHNER, S. A.; SCHULTZ, T. R.; MULLER, U. G. Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. **Science**, v. 266, n. 5191, p. 1691-1694, 1994.
- CHET, I.; BAKER, R. Isolation and biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* from soil naturally suppressive of *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, v. 71, [s/n], p. 286-290, 1981.
- CHET, I.; FOGEL, S.; MITCHELL, R. Chemical detection of microbial prey by bacterial. **Journal of Bacteriology**, v. 106, n. 3, p. 863-867, 1971.
- CHET, I.; BENHAMOU, S.H. Mycoparasitism and lectin enzymes. In: *Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial*, **Protección Vegetal**, v. 24, n. 1, 2009. 21 applications. HARMAN, G. E.; KUBICE, C. P. Ed. 2, v. 2, p.153-152. Taylor & Francis Ltd., 1998.
- CURRIE, C. R.; WONG, B.; STUART, A. E.; SCHULTZ, T. R.; REHNER, S. A.; MUELLER, U. G.; SUNG, GI-HO; SPADAFORA, W. J.; STRAUS, A. N. Ancient Tripartite Coevolution in the Attine Ant-Microbe Symbiosis. **Science**, v. 299, n. 5605, p. 386-388, 2003.
- CURRIE, C. R. Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. **Oecologia**, Berlin, v. 128, [s/n], p. 99-106, 2001.
- CURRIE, C. R., SCOTT, J. A., SUMMERBELL, R. C.; MALLOCH, D. Fungus-growing ants use antibiotic producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, v. 398, n. 6729, p. 701, 1999a.
- CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 96, n. 14, p. 7998-8002, 1999b.
- DAVIES, J. Are antibiotics naturally antibiotics? **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 7, p. 496-499, 2006.
- DE FINE LICHT, H. H.; BOOMSMA, J. J. Forage collection, substrate preparation, and diet composition in fungus-growing ants. **Ecological Entomology**, v. 35, n.3, p. 259-269, 2010.

- DELLA LUCIA, T. M. C.; GANDRA, L. C.; GUEDES, R., N. C. M. Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. **Pest Management Science**, v. 70, n. 1, p. 14-23, 2014.
- DHODARY, B.; SCHILG, M.; WIRTH, R.; SPITELLER, D. S. Secondary metabolites from *Escovopsis weberi* and their role in attacking the garden fungus of leaf cutting ants. **Chemistry - a European Journal**, v. 24, n. 17, p. 4445-4452, 2018.
- FOLGARAIT, P. J.; MARFETÁN, J. A.; CAFARO, M. J. Growth and conidiation response of *Escovopsis weberi* (Ascomycota: Hypocreales) against the fungal cultivar of *Acromyrmex lundii* (Hymenoptera: Formicidae). **Environmental Entomology**, v. 40, n. 2, p. 342-349, 2011.
- FREIRE, F. C. O. **Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007.
- FRIES, N. Effects of volatile organic compounds on the growth and development of fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 60, n. 1, p. 1-21, 1973.
- GERARDO, N. M.; JACOBS, S. R.; CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G. Ancient host-pathogen associations maintained by specificity of chemotaxis and antibiosis. **PLoS Biology**, v. 4, n. 8, p. 1358-1363, 2006.
- HEINE, D.; HOLMES, N. A.; WORSLEY, S. F.; SANTOS, A. C. A.; INONOCENT, T. M.; SCHERLACH, K.; PATRICK, E. H.; YU, D. W.; MURRELL, C.; VIEIRA, P. C.; BOOMSMA, J. J.; HERTWECK, C.; HUTCHINGS, M. I.; WILKINSON, B. Chemical warfare between leafcutter ant symbionts and a co-evolved pathogen, **Nature Communications**, v. 9, n. 2208, p. 1-11, 2018.
- HERVEY, A.; NAIR, R. S. M. Antibiotic metabolite of a fungus cultivated by gardening ants. **Mycologia**, v. 71, n. 5, p. 1064-1066, 1979.
- HUFF, T., KUBALL, H. G.; ANKE, T. 7-Chloro-4,6-dimethoxy-1(3H)-isobenzofuranone and basidalin: antibiotic secondary metabolites from *Leucoagaricus carneifolia* Gillet (basidiomycetes). **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 49, n.7-8, p. 407-410, 1994.
- JEŠOVNIK, A.; GONZÁLEZ, V. L.; SCHULTZ, T. R. Phylogenomics and divergence dating of fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae) of the genera *Sericomyrmex* and *Apterostigma*. **PloS One**, v. 11, n. 7, e 0151059, 2016.
- KARAMAN, I.; ŞAHİN, F.; GÜLLÜCE, M.; ÖĞÜTÇÜ, H.; ŞENGÜL, M.; ADIGÜZEL, A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus*, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, n. 2-3, p. 231-235, 2003.
- MEHDIABADI, N. J.; SHULTZ, T. R. Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants. **Myrmecological News**, v. 13, [s.n.], p. 37-55, 2010.
- MELO, F. C.; SOUZA, R. F.; COUTINHO, P. A. L.; SOUZA, M. O. Synthesis of 5-Hydroxymethylfurfural from dehydration of fructose and glucose using ionic liquids. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 12, p. 2378-2384, 2014.
- MODY, J. O.; ADEBIYI, O. A.; ADENIYI, B. A. Do *Aloe vera* and *Ageratum conyzoides* enhance the anti-microbial activity of traditional medicinal soft soaps (Osedudu)? **Journal Ethnopharmacology**, n. 92, [s/n], p. 57-60, 2004.
- MUELLER, U. G.; KARDISH, M. R.; ISHAK, H. D.; WRIGHT, A. M.; SOLOMON, S. E.; BRUSCHI, S. M.; CARLSON, A. L.; BACCI JR., M. Phylogenetic patterns of ant-fungus associations indicate that farming strategies, not only a superior fungal cultivar, explain the ecological success of leafcutter ants. **Molecular Ecology**, v. 2018, n. 27, p. 2414-2434, 2018.
- MULLER, U. G.; ISHAK, H. D.; BRUSCHI, S. M.; SMITH, C. C.; HERMAN, J. J.; SOLOMON, S. E.; MIKHEYEV, A. S.; RABELING, C.; SCOTT, J. J.; COOPER, M.; RODRIGUES, A.; ORTIZ, A.; BRANDÃO, C. R. F.; LATTKE, J. E.; PAGNOCCA, F. C.; REHNER, S. A.; SCHULTZ, T. R.; VASCONCELOS, H. L.; ADAMS, R. M. M.; BOLLAZZI, M. CLARK, R. M.; HIMLER, A. G.; LAPOLLA, J. J.; LEAL, I. R.; JOHNSON, R. A.; ROCES, F. SOSA-CALVO, J.; WIRTH, R.; BACCI, M. Jr. Biogeography of mutualistic fungi cultivated by leafcutter ants. **Molecular Ecology**, v. 26, n. 24, p. 6921-6937, 2017.
- NEWMEYER, D. Filtering small quantities of conidial suspensions to remove mycelial fragments. **Fungal Genetics Newsletter**, v.37, [s.n.], p. 1-27, 1990.
- OSTROSKY, A. E.; MIZUMOTO, K. M.; LIMA, L. E. M.; KANEKO, M. T.; SUZANA O. NISHIKAWA, O. S.; FREITAS, R. B. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

- PAGNOCCA, F. C.; MASIULIONIS, E. V.; RODRIGUES, A. Specilized fungal parasites and opportunistic fungi in gardens of attine ants. **Psyche**, v. 2012, [s/n], p. 1-9, 2012.
- PAGNOCCA, F. C.; SILVA, O. A.; HEBLING-BERALDO, M. J.; BUENO, O.C.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. Toxicity of sesame extracts to the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. **Bulletin of Entomological Research**, v. 80, [s/n], p. 349-352, 1990.
- SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G. Major evololutionary transitions in ant agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 105, n. 14, p. 5435-5440, 2008.
- SCHULTZ, T. R., MUELLER, U. G., CURRIE, C. R., REHNER, S. A. Reciprocal illumination: a comparison of agriculture in humans and ants. In: VEGA, F., BLACKWELL, M. (Eds.): Ecological and evolutionary advances in insect-fungal associations. **Oxford University Press**, p. 149-190, 2005.
- SEN, R.; ISHAK, H. D.; ESTRADA, D., DOWD, S. E.; HONG, E.; MUELLER, U. G. Generalized antifungal activity and 454-screening of *Pseudonocardia* and *Amycolatopsis* bacteria in nests of fungus-growing ants. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 106, n. 42, p. 17805-17810, 2009.
- SILVA-PINHATI, A. O. C.; BACCI JR., M.; SIQUEIRA, C. G.; SILVA, A.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. A. J. Isolation and maintenance of symbiotic fungi of ants in the tribe Attini (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical Entomology**, v.34, n. 1, p. 1-5, 2005.
- STAUB, G. M., GLOER, K. B., GLOER, J. B., WICKLOW, D. T.; DOWD, P. F. New paspalinine derivatives with antiinsect an activity from the sclerotia of *Aspergillus nomius*. **Tetrahedron Letters**, v. 34, n. 16, p. 2569-2572, 1993.
- STROBEL, G. A.; DIRKSE, E. SEARS, J.; MARKWORTH, C. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, v. 147, p. 2943-2950, 2001.
- WANG, Y.; MUELLER, U. G.; CLARDY, J. Antifungal diketopiperazines from symbiotic fungus of fungus-growing ant *Cyphomyrmex minutus*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, n. 4, p. 935-941, 1998.
- WEBER, N. A. The fungus-culturing behavior of ants. **American Zoologist**, v. 12, n. 3, p. 577-587, 1972.
- WEINHOLD, A. R.; GARRAWAY, M. O. Nitrogen and carbon nutrition of *Armillaria mellea* in relation to growth-promoting effects of ethanol. **Phytopathology**, v. 56, n. 1, p. 108-112, 1966.
- WHITTAKER, R. H.; FEENY, P. P. Allelochemicals: chemical interactions between species. chemical agents are of major significance in the adaptation of species and organization of communities. **Science, New Series**, v. 171, n. 3973, p. 757-770, 1971.
- ZHI-LIN, Y.; CHUAN-CHAO, D.; LIAN-QUING, C. Regulation and accumulation of secondary metabolites in plant-fungus symbiotic system. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 11, p. 1266-1271, 2007.
- ZUCKERMAN, B. M.; JANSSON, H. B. Nematode chemotaxis and possible mechanisms of host/prey recognition. **Annual Review of Phytopathology**, v. 22, [s/n], p. 95-113, 1984.