

---

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

---

**IRINA JIMÉNEZ GÓMEZ**

**INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO NA FUNGICULTURA DAS  
FORMIGAS ATÍNEAS DERIVADAS**

**Rio Claro, SP**

**Março – 2017**

**IRINA JIMÉNEZ GÓMEZ**

**INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO NA FUNGICULTURA DAS  
FORMIGAS ATÍNEAS DERIVADAS**

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

Orientador: Prof. Dr. André Rodrigues

**Rio Claro, SP**

Março – 2017

589.2 Jimémez Gómez, Irina  
J617i Interação patógeno-hospedeiro na fungicultura das  
formigas atíneas derivadas / Irina Jimémez Gómez. - Rio  
Claro, 2017  
65 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

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

1. Fungos. 2. Antagonismo. 3. Parasito. 4. Jardim de  
fungo. 5. Padrões de infectividade. 6. Virulência. I. Título.



**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: INTERAÇÃO PARASITA-HOSPEDEIRO NA FUNGICULTURA DAS FORMIGAS ATÍNEAS DERIVADAS**

**AUTORA: IRINA JIMÉNEZ GOMEZ**

**ORIENTADOR: ANDRE RODRIGUES**

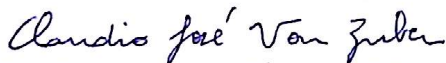
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. ANDRE RODRIGUES  
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB-Rio Claro



Pós-Doutoranda SILMA LEITE ROCHA  
Departamento de Entomologia / Universidade Federal de Viçosa



Prof. Dr. CLAUDIO JOSÉ VON ZUBEN  
Departamento de Zoologia / IB Rio Claro

Rio Claro, 31 de março de 2017

Título alterado para: Interação patógeno-hospedeiro na fungicultura das formigas atíneas derivadas

*Change is the end result of the all true learning*

*- Leo Buscaglia*

*Aos meus pais, por sempre terem enfatizado a importância da educação para a vida e ao meu marido, pelo amor incondicional e pela paciência para aguentar tudo o que aprontei nesses dez anos juntos.*

## AGRADECIMENTOS

Chegar até aqui foi difícil e arriscado. Foi árduo deixar para trás minha família, meus amigos, minha cultura, minha língua e meu país. Foi arriscado deixar tudo isso, sair da minha área de conforto e entrar em um mundo novo e desconhecido.

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que fizeram o caminho mais fácil, que ajudaram a derrubar obstáculos e a ganhar força para continuar. Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais pela formação para a vida, por ensinar sobre independência, esforço, humildade, maturidade para afrontar as dificuldades e, principalmente, pela importância que sempre deram para a formação acadêmica. Ao meu marido por todo, pelo amor e apoio incondicional, por deixar tudo em Cuba e vir detrás de mim, para ficar juntos, para acompanhar meus erros e acertos, para encher meus dias dele e fazer tudo mais fácil. Obrigada por todo amor. A minha tia, minha irmã e meus sogros, pelo apoio e pela força.

Ao programa de convênio Cuba-Brasil que fez possível minha vinda em 2015. Ao meu orientador em Cuba, Julio Mena, que abriu meus olhos para o incrível mundo dos fungos e incentivou meu mestrado no exterior. À todas as pessoas do Instituto de Ecologia e Sistemática (La Habana, Cuba) que ajudaram logisticamente para materializar esta ideia, especialmente Eduardo Furrzola (Furri) e Jorge Ortiz (Yoyi).

Ao CNPq, pelo auxílio concedido (processo 190502/2014-2 - Programa PEC-PG) para a realização da minha pesquisa e ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Área: Microbiologia Aplicada) da UNESP – Rio Claro, pela oportunidade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Rodrigues, por ter me aceitado como aluna sem nunca ter falado comigo (imagino que foi arriscado). Pelos milhares de documentos, cartas, carimbos e assinaturas que teve que fazer para me trazer de Cuba. Por ter aberto as portas do seu laboratório para mim como para qualquer Brasileiro, nunca senti diferenças, nem sofri preconceitos. Pelas horas dedicadas para melhorar meu trabalho e por ser um orientador muito presente e exigente (que pega no pé), isso me ajudou no crescimento pessoal e profissional.

Agradeço a todos os integrantes do LESF: Ana Maria, Camila, Luciana e Karina pela ajuda e por todo o aprendizado juntos. Ao Danilo, o primeiro brasileiro que conheci, pela ajuda para entender o funcionamento do laboratório e por ideias que mudaram minha vida enchendo tubos com meio de cultura. A Lorena por ter ficado comigo direto nos primeiros meses de aulas e de laboratório, por ensinar todas as coisas necessárias para me desenvolver sem problemas no laboratório, foi muito importante sua ajuda. Ao Júlio por ter passado parte dos métodos do experimento. Ao Quimi pelas conversas e a ajuda em momentos de

desespero. A Bruna pelo aprendizado juntas fazendo testes intermináveis com resultados legais. Ao Tássio pela grande ajuda com a estatística, pelas horas tentando entender a minha montanha de dados e pelas conversas que fizeram nascer ideias boas. A Mariana por tudo, sua ajuda foi essencial desde aquele primeiro meio (com a marca errada) e está sendo até hoje. Obrigada pelas conversas de trabalho e os artigos que passou, esses ajudaram semear um horto de ideias na minha cabeça (nem todas certas...), por passar todo o “tema formiga” para mim, desde onde comprar o pote certo até a estatística, por doar parte das suas formigas de estimação para meus experimentos e pelas horas de psicanálise no *whats*. Ao Aryel e a Lana que muito ajudaram no final, em parte “desflorestando” a UNESP para dar comida ao monte de formigas. À todos, obrigada pelo companheirismo e parceria.

Ao Prof. Dr. Odair C. Bueno, do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS/UNESP) por disponibilizar as colônias e a suas alunas, Thaís e Natália, pela ajuda e dicas para mexer com as formigas.

Ao pessoal do Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial (LAMAI): Gabi, Juliana e Lia pela ajuda para manter as formigas presas e pelas alertas de “formigas fugindo!!!”. Agradeço, especialmente, ao Pedro pelas incontáveis viagens ao centro (de motinha, com risco de vida), para fazer todas as compras do material necessário para o experimento das formigas.

Ao pessoal do Laboratório de Genética de Bactérias (LGB), Prof. Dr. Henrique Ferreira e as suas alunas, Lúcia e Luana, pelo tempo e as tentativas de experimento.

À todas as pessoas que ajudaram para melhorar meu português com músicas, sites para treinar e corrigindo meus textos para passar as provas de idiomas Celpe-Bras (português) e a prova de português-inglês, ambas exigências do programa.

Agradeço a todos os integrantes da República Nemelés, por todo o aprendizado acerca do funcionamento do mundo fora do laboratório. Especialmente, gostaria de agradecer ao Igor “camaroncito duro”, quem me recebeu na Rep. e ajudou sempre com tudo o que não sabia e deu errado no começo (que foi tudo mesmo), obrigada pela amizade. A Cláudia, ao Chavez, ao Evaldo, a Laura, ao Thales, ao Gandhi, ao Pássaro, a Paula e ao Vinicius. Aos antigos moradores Rebeca, Paulo e Jesus. Obrigada a todos pela amizade, pelas dicas, jantas e cervejas.

Agradeço a comunidade latina de Rio Claro, que me recebeu e ofereceu sua ajuda desde o começo, especialmente a Yadira, a Paola, a Ana Maria Salazar e o Amilcar. Todos vocês contribuíram com seus ensinamentos e diferentes pontos de vista para fazer de mim uma outra pessoa, que mudou, aprendeu e cresceu, muito além da microbiologia. Obrigada!!!

## RESUMO

A fungicultura das formigas atíneas é um modelo atrativo para estudar associações parasita-hospedeiro, pois abriga um amplo número de parasitas e hospedeiros filogeneticamente diversos. As formigas atíneas dependem do cultivo obrigatório de fungos para alimentar suas crias. Nesse mutualismo, fungos do gênero *Escovopsis* atuam como parasitos especializados do fungo cultivado pelas formigas. Neste trabalho determinamos que a virulência da interação *Escovopsis*-fungo mutualista é o resultado final da susceptibilidade do hospedeiro e a infectividade do patógeno. Para tanto, foram realizados ensaios de co-cultivo *in vitro* utilizando fungos mutualistas e isolados de *Escovopsis* provenientes de colônias de formigas atíneas derivadas. Adicionalmente, foram realizados bioensaios utilizando subcolônias inoculadas com esporos de *Escovopsis*, para avaliar como a complexidade do jardim de fungo, em conjunto com as formigas, interfere na virulência da interação patógeno-hospedeiro. Os resultados indicaram que o fungo mutualista de *Trachymyrmex* sp. é mais susceptível a infecção por *Escovopsis*, quando comparado com *Leucoagaricus gongylophorus*, o fungo mutualista cultivado por *Atta sexdens rubropilosa*. Além disso, foi observado que a susceptibilidade do hospedeiro tem uma maior influência do que infectividade do patógeno, no resultado final da interação *Escovopsis*-fungo mutualista. O fator que determinou a infectividade de *Escovopsis* foi o padrão de reconhecimento frente ao hospedeiro e não a taxa de crescimento do patógeno. Embora *Escovopsis* ocasionou a morte do hospedeiro na maioria dos confrontos *in vitro*, nos experimentos realizados com subcolônias houve a morte de apenas quatro dentre as 90 réplicas tratadas com *Escovopsis*. Tendo em vista que *Escovopsis* ocasiona a morte do fungo mutualista apenas *in vitro*, ou seja, sem a proteção das interações presentes no jardim de fungo, nossos resultados sugerem que *Escovopsis* é um patógeno oportunista.

Palavras-chave: Antagonismo. Parasito. Jardim de fungo. Padrões de infectividade. Virulência.

## ABSTRACT

Fungus-growing by attine ants is an attractive model system for studying host-parasite associations, because it harbors phylogenetically diverse parasites and hosts. These ants rely on fungal cultivation to feed their brood. In this mutualism, fungi in the genus *Escovopsis* act as specialized parasites of the ant fungal cultivar. Here, we determined that virulence of the interaction between *Escovopsis* and the mutualistic fungus is a result of the host susceptibility and the pathogen infectivity. We carried out *in vitro* dual-culture assays using mutualistic fungi and *Escovopsis* isolates from different higher-attine ant species. In addition, we performed bioassays using subcolonies inoculated with *Escovopsis* spores to evaluate how the complexity of the fungus gardens, along with the ants, interfere in the virulence of the host-pathogen interaction. Our results showed that the fungal cultivar of *Trachymyrmex* sp. is more susceptible to infection by *Escovopsis* when compared to *Leucoagaricus gongylophorus*, the mutualistic fungus cultivated by *Atta sexdens rubropilosa*. In addition, we observed that host susceptibility had a larger impact than the pathogen infectivity in the outcome of the *Escovopsis*- fungal cultivar interaction. The factor that determined the infectivity of *Escovopsis* was the patterns of host recognition but not the pathogen's growth rate. *Escovopsis* caused host death in most *in vitro* assays. On the other hand, only four out of 90 subcolonies treated with *Escovopsis* died during the experiments. Considering that *Escovopsis* caused the death of the mutualistic fungus only *in vitro* (without the protection of the interactions present in fungus garden), our results suggest that this fungus is an opportunistic pathogen.

Keywords: Antagonism. Parasite. Fungus garden. Infectivity patterns. Virulence.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. FUNDAMENTAÇÃO.....	12
2.1. <i>Formigas cultivadoras de fungos da tribo Attini</i> .....	12
2.2. <i>Comunidade microbiana do jardim de fungo e estratégias de defesa da colônia</i> .....	14
2.3. <i>Ecologia e evolução do parasito Escovopsis</i> .....	15
2.4. <i>Interação parasito-hospedeiro: definição de conceitos</i> .....	18
3. OBJETIVOS.....	20
3.1. <i>Geral</i> .....	20
3.2. <i>Específicos</i> .....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1. <i>Origem e manutenção dos fungos</i> .....	21
4.2. <i>Ensaio de co-cultivo</i> .....	22
4.2.1. <i>Preparação dos ensaios</i> .....	22
4.2.2. <i>Avaliação da susceptibilidade dos fungos mutualistas e infectividade de Escovopsis</i> .....	24
4.2.3. <i>Avaliação da virulência da interação</i> .....	24
4.3. <i>Ensaio em subcolônias</i> .....	25
5. RESULTADOS .....	27
5.1. <i>Ensaio de co-cultivo</i> .....	27
5.1.1. <i>Susceptibilidade dos fungos mutualistas</i> .....	27
5.1.2. <i>Infectividade de Escovopsis</i> .....	28
5.1.3. <i>Virulência da interação entre o fungo mutualista e Escovopsis</i> .....	30
5.2. <i>Ensaio em subcolônias</i> .....	33
6. DISCUSSÃO .....	37
7. CONCLUSÕES .....	42
REFERÊNCIAS .....	43
ANEXOS.....	52

## 1. INTRODUÇÃO

Interações parasito-hospedeiro podem ser compreendidas pela dinâmica coevolutiva entre os parceiros envolvidos e pelos processos ecológicos que afetam a especificidade dessas associações. No geral, essas relações são governadas por uma corrida armamentista, na qual o hospedeiro desenvolve defesas para impedir a ação do parasito, enquanto este desenvolve adaptações para superar as defesas do hospedeiro. Para entender os fatores que moldam as interações parasito-hospedeiro, o cenário ideal é estudar exemplos de interações que incluam uma ampla gama de parasitos e de hospedeiros filogeneticamente diversos. Nesse contexto as simbioses que ocorrem nas colônias de formigas atíneas fornecem o cenário ideal para o estudo dessas interações.

As formigas cultivadoras de fungo (Hymenoptera: Formicidae: “atíneas”) mantêm uma associação obrigatória com fungos pertencentes às famílias Agaricaceae e Pterulaceae. Nessa interação as formigas fornecem proteção e substrato vegetal para o desenvolvimento do fungo mutualista. Tal substrato pode variar desde folhas frescas até fezes e carcaças de insetos. Em contrapartida, o fungo é utilizado como única fonte de alimento para as larvas e a rainha. O substrato coletado pelas operárias é acumulado no interior da colônia em uma estrutura com aspecto esponjoso conhecida como “jardim de fungo”, na qual é encontrado o micélio do fungo mutualista.

Embora o jardim de fungo abrigue um único clone do fungo mutualista, é sabido que existe uma ampla diversidade de micro-organismos, como leveduras, fungos filamentosos e bactérias, a maioria, com funções ainda pouco conhecidas. Dentre esses micro-organismos, fungos do gênero *Escovopsis* são amplamente estudados por serem parasitos (patógenos) especializados<sup>1</sup> do fungo cultivado pelas formigas. Esse patógeno ocasiona impactos negativos severos, visto que colônias infectadas sofrem redução na taxa de crescimento do jardim de fungo, com conseqüente diminuição da produção de novas operárias. Foi sugerido que *Escovopsis* coevoluiu com o fungo mutualista e com as formigas em uma interação tripartida, entretanto, aspectos da biologia do patógeno ainda permanecem obscuros, por exemplo, o modo de transmissão desse entre colônias e os possíveis mecanismos de parasitismo. Estudos sugerem que metabólitos ativos e estruturas especializadas produzidas por *Escovopsis* promovem o parasitismo.

---

<sup>1</sup> No presente trabalho serão utilizados tanto patógeno, quanto parasita para referir a *Escovopsis*. Este fungo foi classificado como um parasito especializado e patógeno do jardim de fungo por Currie et al. (1999a).

Como resultado da coevolução da interação patógeno-hospedeiro é esperado uma especialização do parasito em determinados hospedeiros. Em relação à especificidade *Escovopsis*-fungo mutualista, foi observado uma divisão de *Escovopsis* em quatro grandes clados que estão exclusivamente associados aos seus hospedeiros (i.e. fungos mutualistas). Estes clados também estão correlacionados à grupos de formigas específicos, o que reforça a coevolução tripartida entre esses organismos. Estudos recentes suportam essa hipótese enfatizando a ocorrência de transferências horizontais ocasionais de *Escovopsis*. Entretanto, nosso grupo de pesquisa detectou transferências horizontais frequentes desse patógeno, sugerindo uma baixa especificidade entre *Escovopsis* e o hospedeiro.

A maioria dos estudos procurou entender a relação *Escovopsis*-fungo mutualista quanto a mecanismos do parasitismo, níveis de virulência e padrões de especificidade. Esses trabalhos apresentam em comum uma abordagem da interação parasita-hospedeiro centrada na ação do parasita. Contudo, poucos estudos levaram em consideração a susceptibilidade do fungo mutualista como um fator preponderante na interação com o parasita.

A relação entre o patógeno e o hospedeiro depende tanto da infectividade do patógeno, quanto da susceptibilidade do hospedeiro. O resultado da junção desses aspectos caracteriza a virulência da interação patógeno-hospedeiro. No presente trabalho procuramos responder às seguintes perguntas: (i) Como a susceptibilidade do hospedeiro e a infectividade do patógeno determinam a virulência da interação no sistema das formigas atíneas? (ii) Existem diferenças na susceptibilidade dos fungos mutualistas cultivados por formigas cortadeiras e não-cortadeiras de folhas? (iii) A velocidade de crescimento de *Escovopsis* aumenta a sua infectividade? (iv) Como a complexidade do jardim de fungo interfere na virulência da interação *Escovopsis*-fungo mutualista?

## 2. FUNDAMENTAÇÃO

### 2.1. *Formigas cultivadoras de fungos da tribo Attini*

As formigas cultivadoras de fungos (Hymenoptera, Formicidae, Myrmicinae) e a complexidade das interações que ocorrem nas colônias desses insetos são estudadas há mais de um século. Pertencentes à tribo Attini, as formigas cultivadoras de fungos compreendem 15 gêneros e 300 espécies (SOSA-CALVO et al., 2013; WARD et al., 2015; JEŠOVNIK; GONZÁLEZ; SCHULTZ, 2016). Esses insetos ocorrem estritamente na região neotropical, desde o norte da Argentina até o sul dos Estados Unidos, e apresentam como característica distintiva o cultivo obrigatório de fungos (WEBER, 1972). Nesse mutualismo, as operárias fornecem diversos substratos (folhas, sementes e carcaças de insetos) para o cultivo do fungo, além de estimular o crescimento do seu parceiro, remover micro-organismos indesejáveis às suas colônias (CURRIE; STUART, 2001) e auxiliar na sua dispersão (WEBER, 1972). Em contrapartida, o fungo é o único alimento das larvas e da rainha (WEBER, 1972). Os nutrientes resultantes da degradação do substrato pelo fungo, também podem ser utilizados como parte da alimentação pelas operárias (SILVA et al., 2003).

Baseado em marcadores moleculares, Schultz e Brady (2008) classificaram as formigas cultivadoras de fungos em dois grandes grupos filogenéticos, as Paleoattini que compreendem as atíneas basais, e as Neoattini que congrega espécies basais e derivadas. As atíneas basais usualmente utilizam restos de material vegetal morto, bem como excremento e cadáveres de insetos como substrato para cultivar seus fungos. Em contrapartida, as atíneas derivadas dos gêneros *Trachymyrmex* e *Sericomyrmex* empregam material vegetal seco e as dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta* utilizam folhas e flores frescas, característica que as tornam pragas nas lavouras em diversos países do continente americano (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

Estudos sugerem que a fungicultura praticada pelas formigas atíneas originou-se há 50 milhões de anos (SCHULTZ; BRADY, 2008). Segundo os tipos de fungos que cultivam e aspectos da biologia das formigas, a fungicultura das atíneas foi agrupada em cinco sistemas (SCHULTZ; BRADY, 2008), a saber: (i) fungicultura basal desempenhada por gêneros de atíneas basais. Esse tipo de fungicultura, comparada com as outras, é praticada pela maioria dos gêneros de atíneas. Os fungos mutualistas dessas formigas pertencem à família Agaricaceae, tribo Leucocoprinae e também podem ser encontrados vivendo fora da associação com as formigas (i.e. no ambiente); (ii) fungicultura de algumas espécies do

gênero *Apterostigma*, que cultivam fungos filogeneticamente diferentes das demais formigas (os chamados *coral fungi*, família Pterulaceae); (iii) fungicultura das formigas do grupo *Cyphomyrmex rimosus*, as quais também cultivam fungos da família Agaricaceae, porém na forma de levedura. Esses fungos também podem ser encontrados em vida livre, no ambiente; (iv) fungicultura das formigas atíneas derivadas dos gêneros *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex*. Os fungos dessas formigas aparentam ser “domesticados”, pois não foram encontrados representantes de vida livre até o momento; e (v) a fungicultura das formigas cortadeiras (gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, saúvas e quenquéns, respectivamente), as quais mantêm um mutualismo com o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* (Basidiomycota: Agaricales, Agaricaceae), o qual também não foi encontrado em vida livre (MUELLER et al., 1998; SCHULTZ; BRADY, 2008; MIKHEYEV et al., 2010).

O fungo cultivado pelas formigas derivadas é considerado “domesticado”, pois é transferido de colônias parentais para colônias filhas. Essa transferência (transmissão vertical) ocorre quando fêmeas aladas carregam um *pellet* contendo o jardim de fungo da colônia parental para fundar uma nova colônia (WEBER, 1972). Entretanto, a principal diferença desse fungo para com os fungos das atíneas basais é a formação de uma vesícula especializada localizada na extremidade da hifa, denominada gongilídio (WEBER, 1972). Os nutrientes resultantes da degradação do substrato vegetal pelo fungo mutualista são absorvidos e acumulados nos gongilídios que constituem o único alimento das larvas e da rainha (DE FINE LICHT; BOOMSMA; TUNLID, 2014). Quinlan e Cherrett (1979) citam que, ao menos nos fungos cultivados pelas formigas cortadeiras, os gongilídeos são ricos em lipídios e carboidratos.

Estudos demonstraram que as formigas cortadeiras cultivam uma única espécie de fungo (*L. gongylophorus*), com ampla distribuição no continente americano (SILVA-PINHATI et al., 2004; MIKHEYEV et al., 2006). Resultados de análises filogenéticas sugerem que as atíneas derivadas provavelmente propagaram a mesma linhagem do fungo durante 23 milhões de anos (CHAPELA et al., 1994; SCHULTZ; BRADY, 2008), devido à transferência vertical do fungo. Coerente com esses estudos, foi demonstrado que em uma mesma colônia de formiga cortadeira, existe somente um único clone do fungo mutualista (MUELLER et al., 2010).

## 2.2. Comunidade microbiana do jardim de fungo e estratégias de defesa da colônia

Além do fungo mutualista, o jardim de fungo abriga uma comunidade complexa, compreendendo leveduras, bactérias e fungos filamentosos (RODRIGUES et al., 2008). As funções atribuídas para as leveduras no jardim de fungo são diversas. Leveduras do gênero *Phialophora* foram propostas como antagonistas das bactérias do gênero *Pseudonocardia*, as quais apresentam funções protetoras para colônia (LITTLE; CURRIE, 2007). Já Rodrigues et al. (2009) encontraram leveduras com função antimicrobiana que possivelmente protegem os jardins de fungo de micro-organismos indesejáveis. Outras leveduras participam na produção de toxinas que poderiam ser responsáveis pela regulação da população das próprias leveduras (CARREIRO et al., 2002). Supõe-se que a ação das enzimas hidrolíticas de algumas leveduras incrementa a quantidade de nutrientes disponíveis para o crescimento do fungo mutualista (MENDES et al., 2012).

Quanto as bactérias presentes no jardim, foi demonstrada a participação do gênero *Klebsiella* na fixação de nitrogênio atmosférico (PINTO-TOMÁS et al., 2009). O nitrogênio fixado seria disponibilizado ao fungo e, eventualmente, para as operárias como nutriente. Bactérias do gênero *Burkholderia* participam na proteção do jardim com a produção de antifúngicos que inibem a germinação de fungos filamentosos indesejáveis à colônia (SANTOS et al., 2004). Adicionalmente, a capacidade de *Klebsiella* e *Pantoea* para degradar celulose sugere um modelo de degradação de material vegetal que inclui as bactérias, além do fungo mutualista e as leveduras (SUEN et al., 2010). Finalmente, análises metagenômicas e metaproteômicas realizadas por Aylward e colaboradores (2012) revelaram a presença de genes e peptídeos de origem bacteriana no jardim de fungo, muitos deles relacionados com a degradação de biomassa vegetal e biossínteses de nutrientes.

Muitos dos fungos filamentosos encontrados no jardim são comumente reportados no material vegetal e no solo, o que sugere que são introduzidos na colônia pelas próprias formigas (PAGNOCCA; MASIULIONIS; RODRIGUES, 2012). Esses fungos são considerados transientes e, aparentemente, com pouca função na simbiose formiga-fungo (POULSEN; CURRIE, 2006; RODRIGUES et al., 2008; MONTROYA et al., 2016). Fungos como *Trichoderma harzianum*, *Fusarium solani* e *Cunninghamella* sp. foram reportados como antagonistas do fungo cultivado pelas formigas, porém essa ação foi atribuída por competição por nutrientes entre os fungos (SILVA et al., 2006; RODRIGUES et al., 2008). Recentemente Barcoto et al. (2017) registraram a natureza patogênica de *Syncephalastrum* sp.

para o jardim de fungo. Embora comumente encontrado no solo, esse fungo ocasionou danos significativos em subcolônias de saúvas, levando-as à morte.

Dentre os fungos filamentosos encontrados no jardim de fungo, o gênero *Escovopsis* é sem dúvida o mais estudado, por ser considerado parasito especializado do fungo mutualista. Para suprimir a ação desse parasito e de outros possíveis contaminantes do jardim, as formigas desenvolveram vários mecanismos que funcionam como barreiras de contenção frente a infecções. Esses mecanismos constituem adaptações comportamentais, fisiológicas, bem como associação com simbiontes microbianos.

Estudos determinaram que actinobactérias do gênero *Pseudonocardia* presentes na propleura ou na superfície do mesossoma das operárias secretam compostos antimicrobianos capazes de inibir *Escovopsis* (CURRIE et al., 1999b, CURRIE et al., 2006). Outros métodos que as formigas utilizam para a proteção de seus jardins são os comportamentos denominados como “grooming” e “weeding”. Durante o “grooming” as formigas procuram com as antenas esporos de fungos alheios ao jardim; uma vez encontrados, lambem a área infectada coletando os esporos na cavidade infrabucal para o posterior descarte. Já o “weeding” consiste na remoção mecânica das partes infectadas, nas quais o fungo indesejado se estabeleceu (CURRIE; STUART, 2001). Além disso, as glândulas exócrinas das operárias, especialmente a glândula metapleural, produzem compostos antimicrobianos, que em formigas do gênero *Atta* são estimuladas com maior frequência na presença de fungos parasitos (FERNANDÉZ-MARÍN et al., 2009).

### 2.3. Ecologia e evolução do parasito *Escovopsis*

Fungos do gênero *Escovopsis* (Ascomycota: Hypocreales) foram reportados somente associados às colônias das formigas cultivadoras de fungos. *Escovopsis* ocorre nos jardins de fungo e também no material de refugo da colônia (lixo), sendo que o modo de transmissão ainda é desconhecido. Evidências sugerem que o parasito seja transmitido horizontalmente entre colônias, provavelmente, por inquilinos que visitam as mesmas (MOREIRA et al., 2015). A proximidade física das colônias no campo também pode ser um fator que explique a transmissão horizontal do parasito (GERARDO et al., 2006a).

Até o momento foram descritas sete espécies de *Escovopsis*. As primeiras, *Escovopsis weberi* e *E. aspergilloides*, foram formalmente descritas por Muchovej e Della Lucia (1990) e Seifert et al. (1995), respectivamente. As demais espécies foram descritas nos últimos quatro anos, a saber: *E. microspora*, *E. moelleri*, *E. lentecrescens*, *E. kreiselii* e *E. trichodermoides*,

além de um gênero novo *Escovopsioides* (AUGUSTIN et al., 2013; MEIRELLES et al., 2015a; MASIULIONIS et al., 2015). Com relação ao último, esse fungo é provavelmente um patógeno do fungo cultivado pelas formigas, entretanto mais estudos são necessários para determinar essa ação (OSTI, 2016; VARANDA-HAIFIG et al., 2017).

O impacto negativo de *Escovopsis* foi notado, principalmente, em colônias de laboratório. Esse fungo provoca o retardo no crescimento da colônia, já que ocasiona decréscimo no acúmulo de biomassa do jardim de fungo, com conseqüente diminuição na produção de larvas, pupas e operárias (CURRIE, 2001a). Ainda, *Escovopsis* pode devastar rapidamente o jardim de fungo, ocasionando a morte da colônia, o que faz dele um parasito destrutivo e virulento (CURRIE, 2001a,b). Currie et al. (1999a) registraram que o patógeno pode causar esses danos mesmo na presença das operárias.

O mecanismo pelo qual *Escovopsis* parasita o hospedeiro ainda não está esclarecido. Evidências sugerem que esse é um fungo micoparasito, o qual obtém nutrientes exclusivamente do micélio do fungo mutualista (CURRIE et al., 1999a). Reynolds e Currie (2004) sugerem que *Escovopsis* atua como um parasito necrotrófico, ou seja, libera metabólitos ativos que destroem o fungo mutualista antes de ocorrer o contato entre as hifas, nutrindo-se dos produtos resultantes desse processo. Porém, Marfetán et al. (2015) observaram que alguns isolados de *E. weberi* apresentam estruturas específicas (como ganchos) que facilitam o parasitismo das hifas do fungo mutualista. Esses autores observaram, portanto, que o parasitismo ocorre somente após o contato, pelo qual reclassificaram *Escovopsis* como um fungo destrutivo biotrófico. Até o momento é sabido que *Escovopsis* necessita do contato com as hifas do fungo mutualista e produz substâncias bioativas que destroem as hifas do hospedeiro (VARANDA-HAIFIG et al., 2017).

Encontrado nos jardins de quase todas as formigas atíneas, o parasito apresenta frequência de ocorrência variável (de 27 a 75 % das colônias). É sabido que o parasito apresenta maior frequência em jardins de formigas derivadas, quando comparado com jardins das formigas basais. A frequência de infecção também é maior em partes velhas do jardim, quando comparadas com as partes mais novas deste (CURRIE, 2001b). A frequência de infecção é maior em colônias novas (1 a 2 anos de idade), quando comparada com colônias mais velhas (maiores que 5 anos; CURRIE et al., 1999a; CURRIE, 2001b). Embora essas observações revelaram variações na ocorrência de *Escovopsis*, é sabido que essas variações também estão relacionadas com as diferenças de região geográfica e de métodos de detecção empregados pelos diferentes autores (CURRIE, 2001b; RODRIGUES et al., 2011).

Devido à ocorrência em quase todos os gêneros de formigas cultivadoras de fungos, foi sugerido uma coevolução tripartida entre as formigas, o fungo mutualista e o parasito *Escovopsis* (CURRIE et al., 2003). Tal proposta de coevolução sugere que linhagens do parasito estão exclusivamente associadas com diferentes grupos de formigas e com seu respectivo fungo mutualista (CURRIE et al., 2003). Entretanto, tal coevolução foi pontuada por vários eventos de trocas (*host-switching*) entre o parasito e o hospedeiro.

Gerardo et al. (2004) avaliaram a especificidade parasito–hospedeiro com análises filogenéticas e experimentos com jardins de fungo. Os autores concluíram que (i) no gênero *Cyphomyrmex* (atínea basal) existe uma correspondência filogenética entre parasitos e hospedeiros (fungo mutualista), mas não com a formiga; (ii) a infecção do jardim é mais provável por parasitos nativos, entretanto jardins podem ser infectados por *Escovopsis* não-nativos às colônias; e (iii) a especialização de *Escovopsis* depende da própria capacidade de superar as defesas do jardim. Por exemplo, os comportamentos de *weeding* e *grooming*, bem como a produção de antibióticos por actinobactérias, pode apresentar especificidade frente a diferentes linhagens de *Escovopsis*. Isto explica porque algumas linhagens do patógeno estão restritas a um número limitado de hospedeiros.

Taerum et al. (2007) reconstruíram a filogenia de *Escovopsis* provenientes de colônias de formigas cortadeiras de folhas. Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram que jardins de fungo de *Atta* e *Acromyrmex* compartilham linhagens de *Escovopsis*. Ainda, esse estudo reforçou o esquema de especificidade proposto por Currie et al. (2003), pois *Escovopsis* que infectam jardins de formigas cortadeiras não são compartilhados com jardins de outras formigas derivadas (*Trachymyrmex* e *Sericomyrmex*). Entretanto, Meirelles e colaboradores (2015b) demonstraram o contrário do observado por Taerum et al. (2007), pois formigas derivadas cortadeiras e não-cortadeiras de folhas também compartilham infecções por linhagens semelhantes de *Escovopsis*.

Diferente dos trabalhos que exploraram padrões de especificidade parasito-hospedeiro, Elizondo-Wallace et al. (2014) encontraram padrões de virulência associados com a filogenia do parasito. Análises filogenéticas de 30 isolados de *Escovopsis* provenientes de jardins de *A. cephalotes* revelaram a formação de dois clados, um compreendendo *Escovopsis* mais virulentos e outro com isolados menos virulentos. Os autores demonstraram que a maior virulência observada em alguns isolados em ensaios *in vitro* (em placa de Petri), quando comparado com experimento realizado diretamente no jardim de fungo, poderia ser atribuída à ausência de defesas do hospedeiro, ou seja, as formigas e as bactérias produtoras de antibiótico que auxiliam o hospedeiro a se proteger de *Escovopsis*.

Alguns estudos abordam defesas ou susceptibilidade do hospedeiro com diferentes pontos de vista. Currie et al. (1999a) atribuem a elevada prevalência de *Escovopsis* em colônias de formigas atíneas derivadas à baixa variabilidade genética do fungo mutualista, o que o faz mais susceptível, possibilitando a especialização do parasito. Por outro lado, Gerardo et al. (2004) atribuíram exceções no padrão de infecção a um aumento na susceptibilidade do hospedeiro, devido à multinfecção por mais de um parasito. Além disso, sugerem que a menor susceptibilidade em alguns jardins está relacionada com algum componente da matriz do mesmo (provavelmente o microbioma associado), o qual está melhor adaptado para inibir *Escovopsis*. Gerardo et al. (2006a) afirmam que isolados de *Escovopsis* infectam com maior rapidez hospedeiros mais susceptíveis. Além disso variações tanto na infectividade do *Escovopsis*, quanto na susceptibilidade do cultivar foram observadas em interações do parasito com o fungo mutualista de *Cyphomyrmex* (BIRNBAUM; GERARDO, 2016). Nesse contexto, a intenção do presente trabalho foi tentar compreender a virulência da interação parasito-hospedeiro como uma combinação da susceptibilidade do hospedeiro e a infectividade do parasito. Para tanto, é importante definir os conceitos de susceptibilidade, infectividade e virulência.

#### 2.4. Interação parasito-hospedeiro: definição de conceitos

Com a intenção de avaliar e comparar vários fatores que afetam a interações parasito (fungo) - hospedeiro (fungo), Butler (1957) elaborou um índice de susceptibilidade do hospedeiro. O autor classificou os hospedeiros em Tipo 0 (imune), Tipo 1 (resistente), Tipo 2 (ligeiramente susceptível), Tipo 3 (susceptível) e Tipo 4 (muito susceptível). O tipo 0 é a classificação para a não ocorrência de interação. Já os tipos 1 a 4 descrevem os níveis crescentes de atividade do parasito, referente ao tamanho e ramificações das hifas, formação de estruturas de enrolamento características do parasito, e em qual proporção estas hifas e estruturas atingem o hospedeiro.

Taylor e Sasser (1978), no estudo da interação parasito (nematódeo) – hospedeiro (planta) classificaram os hospedeiros com base na reprodução em: “altamente resistente”, quando o parasito consegue se reproduzir menos que 2%, quando comparado com um hospedeiro susceptível; “moderadamente resistente” entre 10 e 20% e “ligeiramente resistente” acima de um 50%. Já, Khanna e Yadav (2004) também estudando a interação parasito (nematódeo) – hospedeiro (planta), definiu que o hospedeiro é susceptível quando este não oferece nenhuma resistência, permite o parasito penetrar, se alimentar, metabolizar,

crescer e se reproduzir, sempre causando a doença. Quando o hospedeiro impede qualquer uma dessas ações do patógeno, sinaliza que a resistência por parte do hospedeiro. Os autores referem a existência de vários níveis de resistência entre um hospedeiro susceptível e um imune, em alguns desses níveis a doença pode não ser manifestada. Segundo Antonovics et al. (2013), susceptibilidade é o inverso de resistência; e resistência é a habilidade do hospedeiro de prevenir ou reduzir a probabilidade de uma infecção.

Levando em consideração esses estudos podemos dizer que um hospedeiro é resistente quando este consegue restringir, em algum grau, a atividade do parasito. Isto resulta em ausência ou inibição do efeito deletério causada pelo parasito. Ainda, quando o hospedeiro é resistente o parasito consegue interagir com o hospedeiro, mas não consegue se reproduzir e nem sustentar o crescimento. Entretanto, um hospedeiro é considerado susceptível, quando este permite o desenvolvimento parcial ou total de algumas ou todas as atividades do ciclo de vida do parasito. Isto resulta em mudanças morfológicas e fisiológicas do hospedeiro que se manifestam como sintomas resultantes da doença.

Conhecendo que na literatura tanto o termo resistência, quanto o termo susceptibilidade são aceitos para se referir ao hospedeiro, no presente trabalho adotamos o termo “susceptibilidade”, para permitir a comparação com os estudos de Currie et al. (1999a), Gerardo et al. (2004, 2006a) e Birnbaum e Gerardo (2016).

Infectividade, segundo Antonovics et al. (2013), é a habilidade do parasito em infectar, crescer e se multiplicar no hospedeiro, independente da severidade da doença resultante. Já o termo virulência é amplamente empregado como uma propriedade do parasito para se referir a severidade com que este causa a doença (CASADEVALL; PIROFSKI, 1999). Porém, o parasito depende de um hospedeiro susceptível para expressar sua virulência. Contraditoriamente, a virulência sempre foi tratada como uma característica do parasito e avaliada, em muitos casos, pelos danos causados no hospedeiro. Jaenike (1996) observou que como resultado da interação de um parasito com três hospedeiros diferentes, foram observados diferentes níveis de virulências. Isto demonstra que, embora a expressão gênica do parasito seja a mesma, as condições ambientais e as do hospedeiro modulam a virulência (POULIN; COMBES, 1999). Portanto, virulência não é uma qualidade dependente somente do parasito, mas sim o resultado final da complexa e dinâmica interação parasito-hospedeiro (POULIN; COMBES, 1999; CASADEVALL; PIROFSKI, 2001). No nosso trabalho o termo virulência é somente utilizado em relação ao resultado final da interação parasito-hospedeiro. Na discussão do presente estudo, identificamos o termo virulência entre aspas para identificar que o termo foi utilizado por outros autores referindo-se somente a ação do parasito.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Geral

Avaliar como a susceptibilidade do fungo mutualista e a infectividade de *Escovopsis* determinam a virulência dessa interação.

#### 3.2. Específicos

- Avaliar a susceptibilidade dos fungos mutualistas de formigas cortadeiras e não-cortadeiras de folhas, frente a *Escovopsis* provenientes dessas mesmas formigas.
- Averiguar se a infectividade de *Escovopsis* está relacionada com a taxa de crescimento deste.
- Avaliar como a complexidade das associações que ocorrem no jardim de fungo interfere na virulência da interação patógeno-hospedeiro.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Origem e manutenção dos fungos

Os isolados de *Escovopsis* foram obtidos de diferentes espécies de atíneas derivadas em estudos prévios (RODRIGUES et al., 2005; 2008; MEIRELLES et al., 2015a,b). A coleção de *Escovopsis* compreende 153 linhagens, preservadas em suspensão de esporos em glicerol 10% a – 80 °C, no Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF), Rio Claro, SP. No presente estudo foram utilizados 21 isolados (Tabela 1) todos provenientes de diferentes colônias de formigas cortadeiras (*Atta* e *Acromyrmex*) e não-cortadeiras (*Trachymyrmex*).

Os isolados foram selecionados baseando-se nos resultados obtidos por Meirelles et al. (2015b), escolhendo aqueles fungos distribuídos nos nove clados filogenéticos encontrados por esses autores. Tal escolha priorizou: isolados de *Escovopsis* nativos de um gênero de formiga (p. ex.: isolados de ninhos de *Atta*) que se agruparam em um clado no qual a maior parte dos representantes são *Escovopsis* isolados de outro gênero de formiga (p. ex.: *Trachymyrmex*). Isso que significa que um isolado de *Escovopsis* proveniente de colônia de *Trachymyrmex* sp. se agrupa filogeneticamente com vários isolados de *Escovopsis* provenientes de colônias de *Atta*. Adicionalmente, selecionamos isolados encontrados em clados nos quais se agruparam isolados exclusivos de uma única localidade geográfica.

Para a reativação, os esporos foram transferidos dos tubos mantidos a - 80 °C para o meio batata-dextrose ágar (BDA). As placas foram incubadas a 25 °C, durante sete dias, no escuro. Após reativação, todas as culturas foram avaliadas quanto à pureza. Uma coleção de trabalho foi mantida em tubos com meio BDA inclinado a 10 °C, com transferências a cada quatro meses para novos tubos. Neste estudo foram utilizados dois isolados de fungos mutualistas: (i) *L. gongylophorus* FF2006, obtido de uma colônia de laboratório de *Atta sexdens rubropilosa* (formiga cortadeira), mantida no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS, UNESP, Rio Claro, SP) e (ii) um isolado de fungo de uma colônia de *Trachymyrmex* sp. (formiga não-cortadeira), coletado no Câmpus da UNESP, Rio Claro, SP. No caso deste isolado, fragmentos do jardim de fungo de *Trachymyrmex* sp. sem operárias ou larvas foram semeados em meio BDA suplementado com cloranfenicol e incubados a 25 °C, durante 20 dias (no escuro). Os fragmentos foram monitorados diariamente e aqueles que não apresentaram contaminação foram considerados como cultura pura.

Tabela 1. Isolados de *Escovopsis* (n= 21) provenientes de jardim de fungo de colônias de formigas cortadeiras (gêneros *Atta* e *Acromyrmex*) e não-cortadeira (gênero *Trachymyrmex*) de folhas.

Código <sup>1</sup>	Código <sup>2</sup>	Formiga	Colônia	Local de coleta (cidade-estado)
018	NL002	<i>Atta capiguara</i>	N66	Botucatu - SP
858	BA001	<i>Atta cephalotes</i>	BMSR120702-01(FL1)	Camacan - BA
022	ES003	<i>Atta cephalotes</i>	SES040121-01	Frei Caneca - PE
037	ES033	<i>Atta cephalotes</i>	CTL110912-05	Parauapebas - PA
325	BA004	<i>Atta cephalotes</i>	BMSR120703-01(FL5)	Camacan - BA
326	BA006	<i>Atta cephalotes</i>	BMSR120803-01(CA10)	Camacan - BA
315	NL007	<i>Atta sexdens</i>	N68	Botucatu - SP
021	ES002	<i>Atta sexdens</i>	N-Ale	Rio Claro - SP
045	RS076	<i>Acromyrmex coronatus</i>	AOMB130904-04	Vacaria - RS
044	RS061	<i>Acromyrmex heyeri</i>	AOMB110904-15	Pelotas - RS
050	SES008	<i>Acromyrmex</i> sp.	SES081007-01	Faz. São Sebastião - RO
106	SES006	<i>Trachymyrmex dichrous</i>	SES080922-02	E.E.Panga, Uberlândia - MG
052	SES010	<i>Trachymyrmex diversus</i>	SES090109-04	Camp 41, Manaus - AM
318	ES029	<i>Trachymyrmex</i> sp.	WGPM091021-01	Palmas - TO
051	SES009	<i>Trachymyrmex</i> sp.	SES081108-04	Palmeiras - BA
135	SES003	<i>Trachymyrmex</i> sp.	CTL080820-02	E.E.Panga, Uberlândia - MG
049	SES007	<i>Trachymyrmex</i> sp.	SES080921-03	E.E.Panga, Uberlândia - MG
316	ES001	<i>Trachymyrmex</i> sp.	TR-117	Rio Claro - SP
317	ES026	<i>Trachymyrmex</i> sp.	ARTD030908-02	Rio Claro - SP
319	ES030	<i>Trachymyrmex</i> sp.	AR091020-01	Palmas - TO
046	SES001	<i>Trachymyrmex</i> sp.	SES080402-03	Rio Claro - SP

<sup>1</sup> Códigos LESF: Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (UNESP, Rio Claro, SP).

<sup>2</sup> Códigos utilizados no trabalho de Meirelles et al. (2015b).

A coleção de trabalho do fungo mutualista *L. gongylophorus* foi mantida em meio suplementado com aveia (em g L<sup>-1</sup>: 10 glicose [SYNTH], 5 NaCl [SYNTH], 5 peptona [ACUMEDIA], 10 extrato de malte [MERCK], 15 Bacto ágar granulado [DIFCO], 50 aveia; (PAGNOCCA et al., 1990) a 25 °C, no escuro, com transferências a cada 21 dias. O fungo mutualista de *Trachymyrmex* foi mantido em meio BDA nas mesmas condições. Como critério de manutenção de culturas vigorosas, somente aquelas com a presença de estáfilas (conjuntos de gongilídios observados na superfície da colônia) e sem pigmentos escuros no reverso da colônia foram mantidas na coleção.

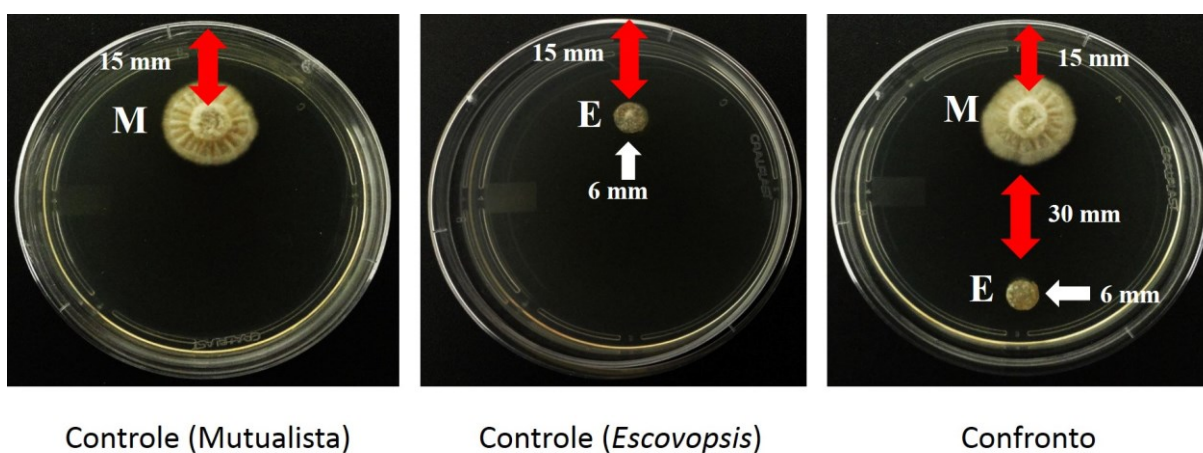
## 4.2. Ensaios de co-cultivo

### 4.2.1. Preparação dos ensaios

Para avaliar a ação de *Escovopsis* frente aos fungos mutualistas foram realizados ensaios de culturas pareadas (co-cultivo) *in vitro*, seguindo o método proposto por Silva et al. (2006). Fragmentos de micélio (6 mm de diâmetro) do fungo mutualista, previamente crescido em meio BDA a 25 °C, durante 18 dias (no escuro), foram removidos e semeados a

1,5 cm de distância da borda de placas de Petri (90 x 15 mm) contendo meio BDA. As placas foram incubadas a 25 °C durante 15 dias, no escuro, período este necessário para permitir o crescimento do fungo mutualista nas placas experimentais. Todas as linhagens de *Escovopsis* foram cultivadas previamente em meio BDA e incubadas a 25 °C, durante sete a dez dias, no escuro. Após incubação, fragmentos de micélio (6 mm de diâmetro) foram removidos dessas placas e semeados a 3,0 cm de distância da borda da colônia do fungo mutualista. Para os experimentos controle, somente fragmentos de micélio do fungo mutualista (controle do mutualista) e de *Escovopsis* (controle do patógeno) foram semeados em placas independentes (Figura 1). Todas as placas experimentais foram incubadas a 25 °C, durante 14 dias, no escuro. Todos os confrontos entre os dois isolados de fungos mutualistas e os 21 isolados de *Escovopsis* foram realizados com oito réplicas biológicas.

Figura 1. Método utilizado para avaliar as interações *Escovopsis*-fungo mutualista. Controle (mutualista): após 14 dias de crescimento na placa. Controle (*Escovopsis*): patógeno (com sete dias de crescimento) inoculado no dia 0 do confronto. Confronto: interação patógeno-fungo mutualista, fungo mutualista (M) com 14 dias de crescimento na placa e o fungo patógeno (E) inoculado no dia 0.



O efeito de cada isolado de *Escovopsis* no crescimento do fungo mutualista e as diferenças no crescimento do patógeno entre o controle e o co-cultivo foram monitoradas e registradas nos intervalos de tempo: 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10 e 14 dias de incubação. Para tanto, o verso das placas foi disposto diretamente no *scanner* (HP Deskjet F2050, impressora multifuncional) e digitalizado. Após a digitalização, a área das colônias do fungo mutualista e do patógeno (em mm<sup>2</sup>) foram determinadas no *software* ImageJ v. 1.38 (RASBAND, 2014) para realizar a medição. Posteriormente, as medidas de área foram organizadas em planilhas para realizar as análises estatísticas.

#### 4.2.2. Avaliação da susceptibilidade dos fungos mutualistas e infectividade de *Escovopsis*

Para avaliar a susceptibilidade dos fungos mutualistas e a infectividade de *Escovopsis*, as áreas de crescimento micelial de ambos os fungos foram medidas no confronto e no controle. Os dados das áreas de crescimento dos fungos mutualistas na presença dos diferentes isolados de *Escovopsis* foram normalizados pelo controle, permitindo assim a comparação entre os isolados. Para verificar a normalidade e homogeneidade de variância desses dados, foram utilizados os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Os dados não seguiram uma distribuição normal e não apresentaram homocedasticidade, portanto, utilizamos o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Essas análises foram realizadas no programa R (versão 3.2.2, The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2011).

Para avaliar a existência de associação entre a susceptibilidade do fungo mutualista e a origem dos isolados de *Escovopsis* foram analisados os valores *slope* (inclinação da reta) obtidos na regressão linear entre o tempo (dias) e os valores de crescimento ( $\text{mm}^2$ ) do fungo mutualista frente a cada um dos isolados. Diferenças significativas entre os valores de *slope* foram avaliadas com significância de 5% (que indica a probabilidade da inclinação da reta ser igual a um). As análises foram realizadas no *software* PAST 2.14 (HAMMER et al., 2001). Os valores de *slope* representam uma estimativa de quanto o fungo mutualista seria inibido se estivesse exposto a ação do parasito por mais um dia. Nesse mesmo *software* foram calculados os valores de *r* (coeficiente de correlação linear de Pearson). Esse coeficiente varia entre -1 e 1, sendo que para valores mais próximos de -1, maior é a correlação negativa. Por outro lado, para valores mais próximos de 1, maior é a correlação positiva.

#### 4.2.3. Avaliação da virulência da interação

A virulência das interações *Escovopsis*-fungo mutualista foi determinada levando em consideração aquelas que causaram a maior inibição na taxa de crescimento micelial do fungo mutualista, após 14 dias de experimento. A taxa de crescimento do fungo mutualista é uma medida que representa o resultado final da interação, ou seja, o quanto cada isolado do patógeno afetou o crescimento do fungo mutualista levando em consideração a susceptibilidade deste. A taxa de crescimento foi calculada utilizando a fórmula: crescimento final – crescimento inicial/número de dias de interação. Utilizando a mesma fórmula, também calculamos a taxa de crescimento de *Escovopsis* para avaliar a relação com a virulência das

interações. Foi tomado como valor do crescimento final para *Escovopsis* a área do fungo no dia que este preencheu a placa com micélio.

#### 4.3. Ensaio em subcolônias

Uma vez caracterizada a virulência da interação patógeno-hospedeiro *in vitro*, nossa intenção foi avaliar se essa era mantida em escala de subcolônias, as quais apresentam a complexidade do jardim de fungo (i.e. contendo as formigas, o fungo mutualista e a rede de interações microbianas). Para auxiliar nessa avaliação foram utilizadas quatro concentrações de esporos na tentativa de identificar a concentração mínima que ocasiona dano à subcolônia.

Para os experimentos foram utilizadas aproximadamente 30 colônias (de um a dois anos de idade) de *Atta sexdens rubropilosa* mantidas no CEIS/UNESP. A partir de cada colônia, foi possível montar três subcolônias sem rainha, totalizando 90 subcolônias. As subcolônias consistiram em três recipientes plásticos de 500 mL, interligados por tubos de paredes grossas para evitar o corte pelas formigas. O recipiente central foi destinado ao jardim de fungo, um recipiente lateral foi destinado para a câmara de forrageamento e outro recipiente para câmara de lixo. A umidade do jardim de fungo foi mantida com uma camada de aproximadamente 1 cm de espessura de gesso no recipiente central. Além disso, foi aplicada uma fina camada de Teflon® (Politetrafluoretileno) nas bordas de todos os recipientes, para evitar que as operárias deixassem as subcolônias. Para manter as subcolônias o mais próximo possível das condições da colônia original, foram adicionadas operárias de todas as castas, bem como ovos e pupas em diversos estágios de diferenciação (segundo BARCOTO et al., 2017). A quantidade de jardim de fungo adicionada foi padronizada colocando entre 19 a 22 g (equivalente a 400 mL) de jardim por subcolônia. Antes de iniciar o experimento, as subcolônias passaram por um período de aclimatação de 14 dias para permitir que as formigas voltassem as atividades normais, após a separação da colônia mãe. Neste período e durante os 14 dias de experimento as temperaturas da sala foram mantidas entre 23 e 25 °C. A cada dois dias foram oferecidas duas folhas de hibisco no recipiente de forrageio.

Para os experimentos, foram selecionados quatro dentre os 21 isolados de *Escovopsis* (Tabela 2), baseado nos resultados das interações obtidos no item 4.2.3. As diferentes suspensões (Tabela 3) foram preparadas a partir de culturas de *Escovopsis* com sete dias de crescimento em meio BDA. A superfície da colônia foi raspada com uma agulha de inoculação e o material obtido (micélio e esporos) foi suspenso em 10 mL de Tween 80 a 0,05%. A suspensão foi agitada durante 2 minutos e, em seguida, filtrada de acordo com o

método de Newmeyer (1990) para separar os esporos dos fragmentos de hifas presentes na suspensão. Após a filtração, a suspensão foi diluída até as quatro concentrações para cada isolado (Tabela 3), determinadas em câmara de Neubauer.

Nos ensaios foram utilizados 16 grupos de tratamento e um grupo controle, cada um contendo cinco subcolônias selecionadas aleatoriamente. Um volume de 1 mL de suspensão de esporos foi inoculado na superfície do jardim de fungo com auxílio de um borrifador. O grupo controle recebeu 1 mL de solução de Tween 80 a 0,05%.

Tabela 2. Dados dos isolados de *Escovopsis* utilizados nos ensaios com subcolônias.

Código <sup>1</sup>	Formiga	Clado <sup>2</sup>
021	<i>Atta sexdens</i>	V
315	<i>Atta sexdens</i>	I
046	<i>Trachymyrmex</i> sp.	I
318	<i>Trachymyrmex</i> sp.	II

<sup>1</sup> Códigos LESF: Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (UNESP, Rio Claro, SP).

<sup>2</sup> Segundo filogenia publicada por Meirelles et al. (2015b).

Tabela 3. Concentração de esporos (por mL) de *Escovopsis* utilizadas nos ensaios com as subcolônias de *Atta sexdens rubropilosa*.

Isolado <sup>1</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>
021	2	4,5	3,0	2,1
315	2	4,3	3,2	2,2
046	3	4,3	3,0	2,2
318	2	4,6	3,1	2,1

<sup>1</sup> Códigos LESF: Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (UNESP, Rio Claro, SP).

Os efeitos dos tratamentos nas subcolônias foram avaliados mediante a observação (i) das condições gerais do jardim, (ii) quantidade de lixo acumulado, (iii) forrageamento e (iv) cultivo de um novo jardim de fungo (Tabela A1)<sup>2</sup>. Tal avaliação seguiu o sistema de escores proposto por Barcoto et al. (2017). Para avaliar diferenças significativas entre estes parâmetros por dia de avaliação considerando os grupos tratamento e controle, foi utilizado o teste estatístico de *Friedman's two-way ANOVA* no R.

<sup>2</sup> Todas as Tabelas e/ou Figuras referidas com "A" na frente do número correspondem a anexos que fazem parte do presente trabalho.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Ensaio de co-cultivo

#### 5.1.1. Susceptibilidade dos fungos mutualistas

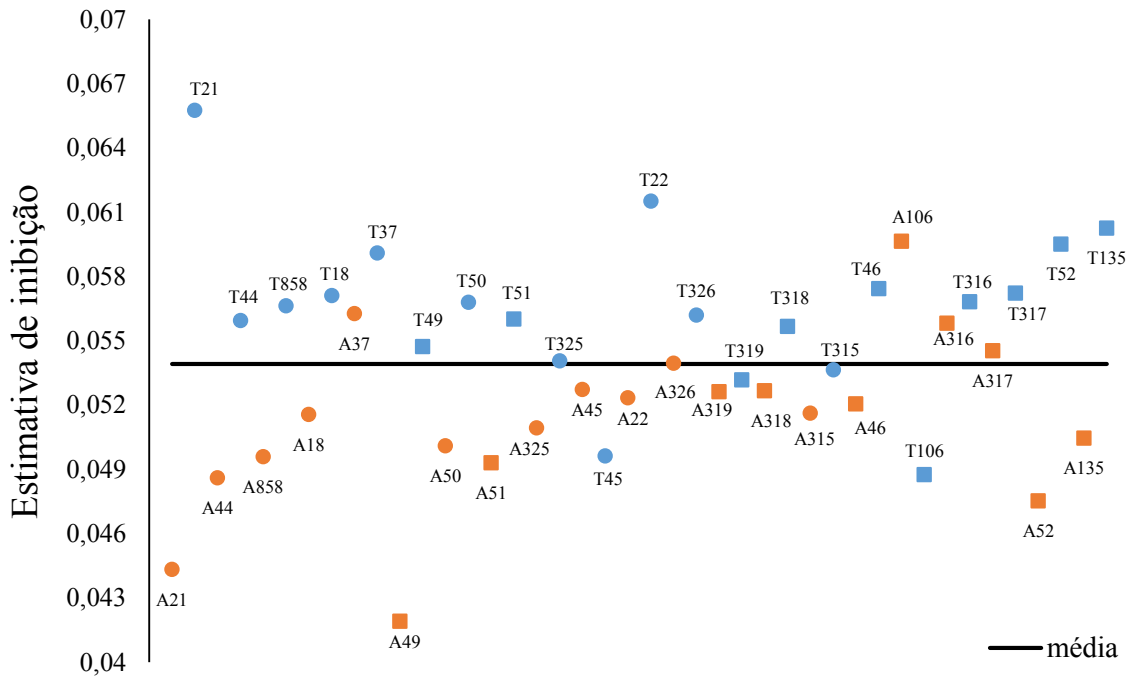
Todos os 21 isolados de *Escovopsis* inibiram significativamente o crescimento micelial de *L. gongylophorus* e do fungo mutualista de *Trachymyrmex* sp. até o quinto dia de experimento, quando comparados com o controle (Mann–Whitney,  $P < 0,05$ , Tabelas A2 e A3). A diminuição no crescimento dos fungos mutualistas continuou até 14 dias de interação com o patógeno (Figuras A1 e A2).

Do total de isolados, 15 (oito de formigas cortadeiras e sete de formiga não-cortadeira) inibiram o crescimento micelial de *L. gongylophorus* a partir do segundo dia de experimento (Tabela A2). Por outro lado, o fungo mutualista de *Trachymyrmex* sp. foi inibido significativamente já no primeiro dia de interação frente a cinco isolados de *Escovopsis* (dois de formigas cortadeiras e três de formiga não-cortadeira, Mann–Whitney,  $P < 0,05$ , Tabela A3). Até o segundo dia de experimento, um total de 17 isolados de *Escovopsis* inibiram significativamente o fungo cultivado por *Trachymyrmex* sp. (Tabela A3).

Os valores de *slope* da regressão linear indicam que o fungo mutualista de *Trachymyrmex* sp. é mais suscetível que *L. gongylophorus* (Figura 2). Esses valores representam o resultado final (após 14 dias de experimento) de cada interação entre *Escovopsis* e os fungos mutualistas. Acima da média estão os isolados de *Escovopsis* que provocaram maior inibição no crescimento dos fungos mutualistas e abaixo estão representados os isolados que pouco afetaram o crescimento dos fungos mutualistas (Figura 2). É possível observar que as interações entre os 21 isolados de *Escovopsis* e o fungo mutualista de *Trachymyrmex* foram as mais virulentas, na maioria dos confrontos (17 de 21 isolados localizados acima da média).

Ainda, é possível observar que a inibição de *L. gongylophorus* e o fungo mutualista de *Trachymyrmex* sp. não está relacionada a origem do patógeno (i.e. formiga cortadeira ou formiga não-cortadeira de folhas, Figura 2).

Figura 2. Valores de *slope* obtidos da regressão linear entre o tempo (em dias) e o crescimento (em mm<sup>2</sup>) de *Leucoagaricus gongylophorus* e o fungo mutualista de *Trachymyrmex* sp. frente a 21 isolados de *Escovopsis*. No eixo Y aparecem os valores de *slope*. A linha preta representa a média dos valores de *slope*. Encontram-se representados em laranja as interações entre *L. gongylophorus*-*Escovopsis* e em azul as interações entre o fungo de *Trachymyrmex*-*Escovopsis*. Os círculos e quadrados representam *Escovopsis* provenientes de colônias de formigas cortadeiras e não-cortadeiras de folhas, respectivamente.



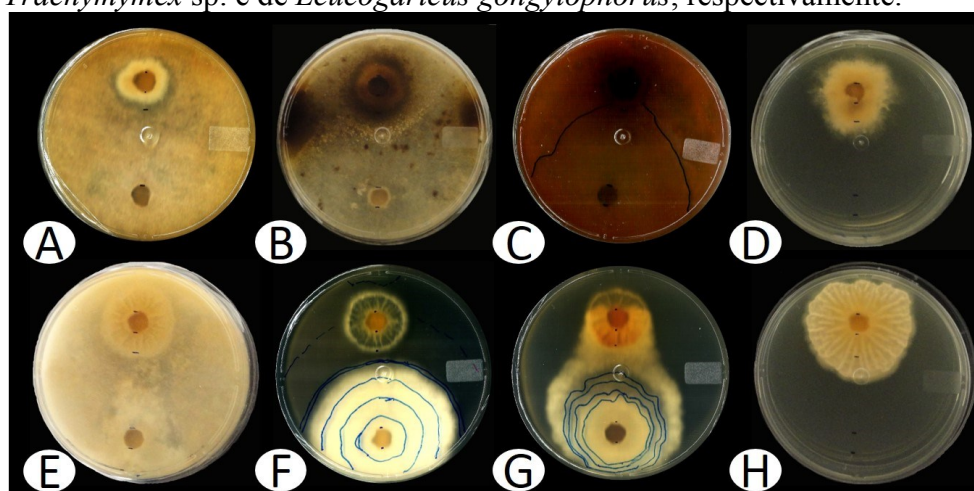
Também foram observadas mudanças na coloração do meio de cultivo e dos fungos mutualistas (Figura 3). Em algumas das interações com *L. gongylophorus* foi observada a perda da opacidade ou da cor do fungo mutualista, este tornando-se quase transparente (Figura 3). Observa-se que o fungo mutualista começa a perder a coloração mesmo sem o contato com o patógeno (Figuras 3F-G). A perda de opacidade foi exclusivamente observada em confrontos com *L. gongylophorus*.

### 5.1.2. Infectividade de *Escovopsis*

Todos os isolados de *Escovopsis* cresceram significativamente mais rápido na presença de ambos os fungos mutualistas, do que na ausência destes ( $P < 0,05$ , Tabelas A4 e A5). Nos confrontos *Escovopsis*-*L. gongylophorus*, 19 isolados cresceram significativamente mais rápido na presença do fungo mutualista no primeiro dia de experimento, quando comparado com o controle ( $P < 0,05$ , Tabela A4). Os dois isolados restantes apresentaram

diferenças significativas no crescimento a partir do segundo dia de incubação (Tabela A4). Já nos confrontos *Escovopsis*-fungo mutualista de *Trachymyrmex* sp., todos os isolados de *Escovopsis* cresceram significativamente mais rápido na presença do fungo mutualista já no primeiro dia de experimento, quando comparado com o controle ( $P < 0,05$ , Tabela A5). Esses resultados indicam que *Escovopsis* obtidos de colônias de formigas cortadeiras e não-cortadeiras de folhas não apresentam diferenças na especificidade.

Figura 3. Variações na coloração do meio de cultivo e dos fungos mutualistas resultantes da interação com diferentes isolados de *Escovopsis*. A e E: *Escovopsis* sp. LESF 045 e *Escovopsis* sp. LESF 021 provocaram pouca alteração; B: *Escovopsis* sp. LESF 318 provocou alterações medianas; C: *Escovopsis* sp. LESF 046 provocou bastante alteração. F e G: perda de coloração nas interações com os isolados *Escovopsis* sp. LESF 315 e LESF 049, respectivamente. D e H: Controle do fungo mutualista de *Trachymyrmex* sp. e de *Leucogaricus gongylophorus*, respectivamente.



Nos confrontos foram observados três padrões de infectividade: dois deles, “atração sem inibição” e “atração com inibição” foram observados para ambos os fungos mutualistas. Já o terceiro padrão “sem atração e sem inibição” somente foi observado nos confrontos com o fungo mutualista de *Trachymyrmex* sp. (Figura 4). Entretanto, ressalta-se que o grau de atração ou inibição pode variar dependendo da rapidez de crescimento de um isolado de *Escovopsis* em particular; isso foi evidente comparando com o grupo controle (Figura 4). Por exemplo, o isolado LESF 021 é atraído, porém mais vagarosamente em relação aos outros isolados que apresentaram o mesmo padrão de infectividade (Figura 4). As interações de LESF 051 e LESF 052 mostraram padrões de infectividade de “atração com inibição”, porém o fungo mutualista inibiu o isolado LESF 052 antes do contado micelial e, no dia 14, o patógeno não cobriu a colônia do hospedeiro. Já frente ao isolado LESF 051, o fungo

mutualista formou um halo de inibição ao redor da colônia, o qual impediu o crescimento do patógeno durante 10 dias, porém até o décimo quarto dia, o patógeno cresceu em toda a placa e sobre a colônia do fungo mutualista. Embora essas diferenças mostrem que os fungos mutualistas inibem com diferentes intensidades os diferentes isolados de *Escovopsis*, neste trabalho isso foi considerado como uma variação dentro do mesmo padrão de infectividade. O isolado LESF 018 não mostrou nenhuma reação frente ao fungo mutualista, pois cresceu do mesmo modo no controle e nos confrontos.

### 5.1.3. Virulência da interação entre o fungo mutualista e *Escovopsis*

Para avaliar a virulência, aqui entendida como o resultado das interações patógeno-hospedeiro, foram utilizadas as taxas de crescimento dos fungos mutualistas frente a cada um dos 21 isolados de *Escovopsis*, após 14 dias de experimento. As interações mais virulentas ocorreram sempre com o fungo mutualista de *Trachymyrmex* sp., pois as taxas de crescimento apresentaram valores negativos (Figura 5A). Isso significa que o fungo diminuiu de tamanho no decorrer do experimento em consequência da interação com *Escovopsis*. Em contrapartida, as taxas de crescimento de *L. gongylophorus* foram positivas, exceto nas interações com os isolados LESF 106 e LESF 315 (Figura 5A).

Não observamos um padrão que permitiu relacionar a taxa de crescimento de *Escovopsis* com a virulência das interações. Enquanto alguns isolados do patógeno apresentaram taxas de crescimento semelhantes, a inibição dos fungos mutualistas por esses isolados foram opostas (Figura 5B). Por exemplo, as taxas de crescimento de *L. gongylophorus* e do fungo mutualista de *Trachymyrmex* sp. frente ao isolado LESF 049 foram positivas e negativas, respectivamente (Figura 5A). Por outro lado, o isolado LESF 135 apresentou taxa de crescimento elevada e que proporcionou uma maior inibição dos fungos mutualistas (Figura 5B).

Figura 4. Padrões de infectividade de *Escovopsis* frente ao fungo mutualista *Leucoagaricus gongylophorus*. Interações entre *L. gongylophorus* e *Escovopsis* sp. (LESF 021 e LESF 051) e o fungo mutualista de *Trachymyrmex* sp. e *Escovopsis* sp. (LESF 018 e LESF 052).

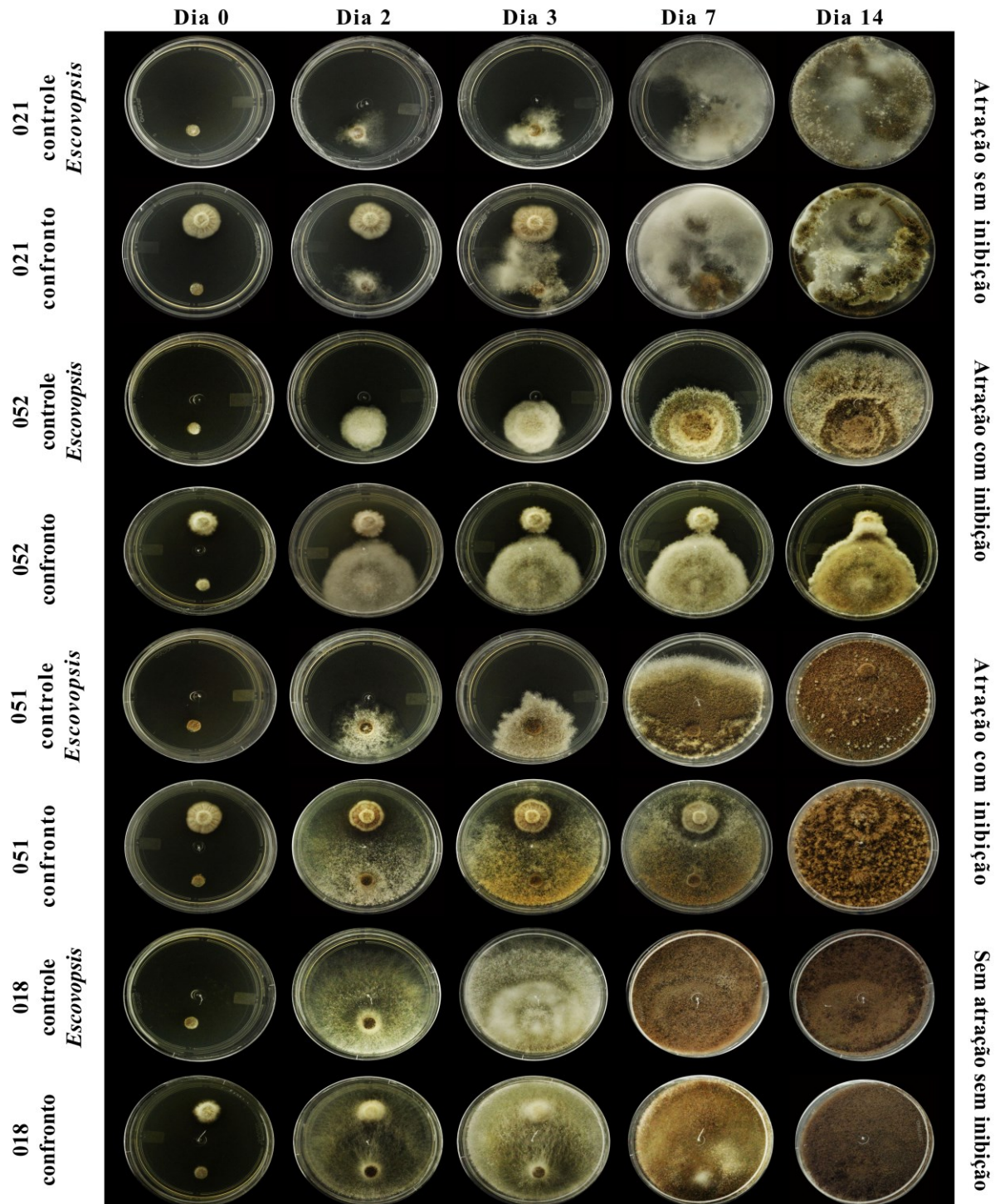
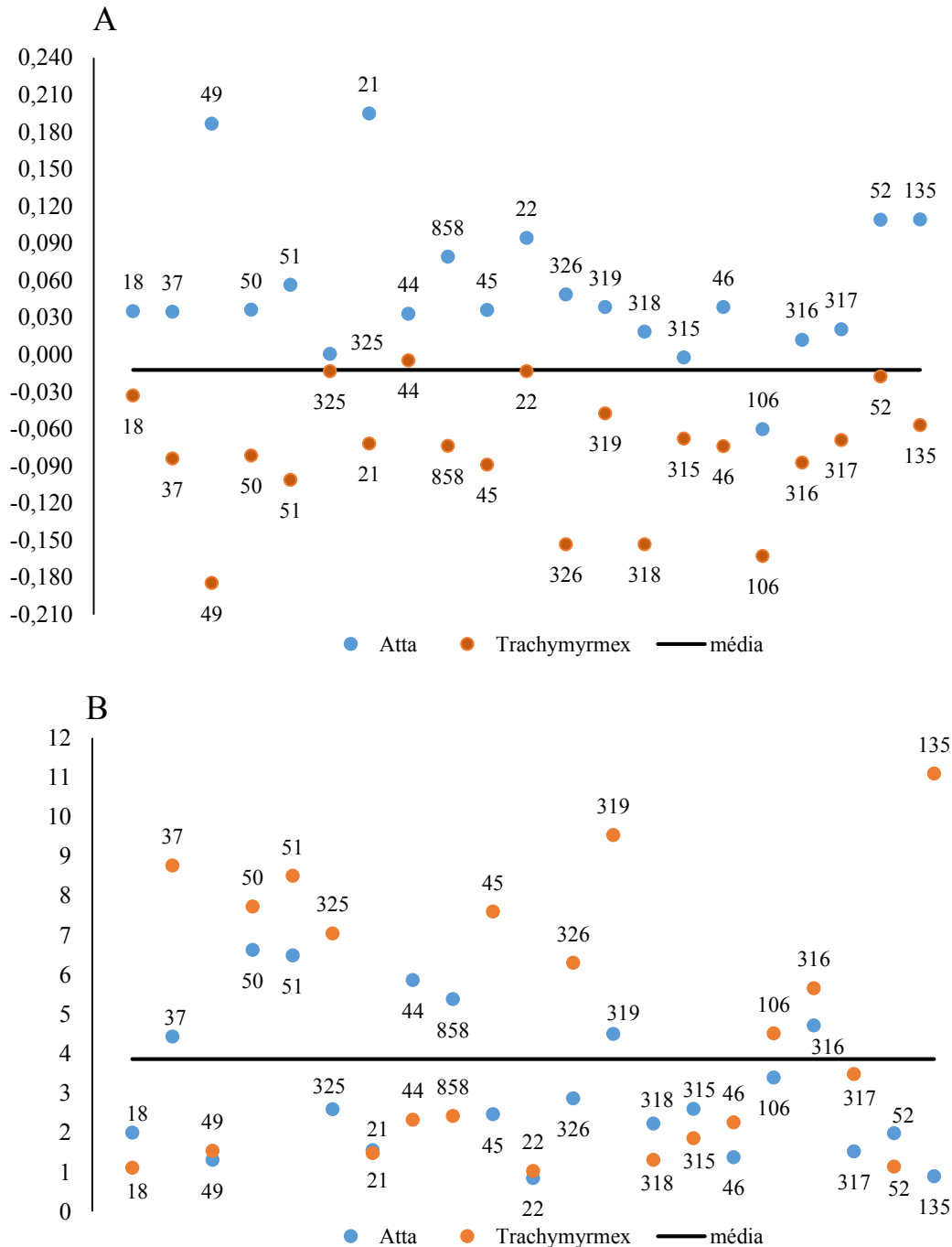


Figura 5. A: Taxas de crescimento de *Leucoagaricus gongylophorus* e do fungo mutualista de *Trachymyrmex* sp. frente a 21 isolados de *Escovopsis*, após 14 dias de experimento. B: Taxa de crescimento dos 21 isolados de *Escovopsis* frente a ambos os fungos mutualistas. Em azul estão representadas as taxas de crescimento do patógeno na interação com *L. gongylophorus* e em laranja, as taxa de crescimento na interação com o fungo mutualista de *Trachymyrmex* sp. O eixo “y” representada as taxas de crescimento (em mm<sup>2</sup>) e os números nos marcadores representam os códigos de cada isolado de *Escovopsis*.



## 5.2. Ensaios em subcolônias

Apenas quatro dentre as 90 subcolônias morreram quando tratadas com diferentes concentrações de esporos de *Escovopsis*. Dessas quatro subcolônias, duas foram tratadas com esporos do isolado LESF 046 e duas com esporos do isolado LESF 318. Em ambos os casos, as subcolônias morreram com os extremos de concentrações de esporos utilizadas. Nenhuma subcolônia tratada com esporos dos isolados LESF 021 e LESF 315 morreu. A seleção desses quatro isolados foi realizada com base nos dados da tabela 2, nos padrões de reconhecimento do hospedeiro e nas diferenças da coloração proporcionadas nos experimentos *in vitro*.

Conforme o esperado, observamos diferenças significativas nas condições gerais das subcolônias, quando tratadas com diferentes concentrações de esporos. Para todos os isolados, a concentração de  $10^6$  esporos  $\text{mL}^{-1}$  foi a única que provocou alterações significativas prolongadas nas condições gerais das subcolônias (Figura 6). Por outro lado, a concentração de  $10^3$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ , independente do isolado, não provocou alterações significativas nas condições gerais das subcolônias (Figura 6). A única exceção foi o isolado LESF 318 que provocou alterações significativas no sexto dia, quando comparado com o controle, nessa concentração (Figura 6B).

As interações menos virulentas foram observadas com o isolado LESF 021, o qual somente ocasionou alterações nas condições das subcolônias na concentração  $10^6$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ . Entretanto, mesmo nessa concentração as subcolônias conseguiram se recuperar após 10 dias de tratamento (Figura 6C). Já a interação mais virulenta foi observada com o isolado LESF 046, o qual provocou alterações prolongadas nas condições das subcolônias nas concentrações  $10^5$  e  $10^6$  esporos  $\text{mL}^{-1}$  (Figura 6A). Os demais isolados somente provocaram alterações prolongadas nas subcolônias na concentração de  $10^6$  esporos  $\text{mL}^{-1}$  (Figura 6).

Diferenças significativas no forrageamento das subcolônias foram observadas em apenas dois tratamentos com esporos de *Escovopsis*. A concentração de  $10^6$  esporos  $\text{mL}^{-1}$  foi a única que provocou alterações no forrageamento, em pelo menos um dia de experimento, para todos os isolados do patógeno (Figura 7). Na concentração  $10^5$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ , o forrageio só foi afetado quando tratado com esporos do isolado LESF 046 (Figura 7A).

Embora foram observadas alterações nas condições das subcolônias tratadas com esporos dos isolados LESF 046 e LESF 318, as formigas mantiveram níveis de corte de folhas semelhantes ao controle. Nessas subcolônias, as formigas construíram novos jardins de fungo nas câmaras destinadas ao forrageio. Geralmente esses novos jardins foram construídos em

decorrência do abandono do jardim inicial. Também não observamos diferenças na quantidade de lixo produzido nas subcolônias tratadas com esporos dos quatro isolados de *Escovopsis*.

Figura 6. Alterações nas condições das subcolônias de *Atta sexdens rubropilosa* tratadas com diferentes concentrações de esporos de *Escovopsis* A: isolado LESF 046, B: LESF 318, C: LESF 021 e D: LESF 315. Considerando cada dia, os marcadores em vermelho indicam diferenças significativas entre os tratamentos e o controle.

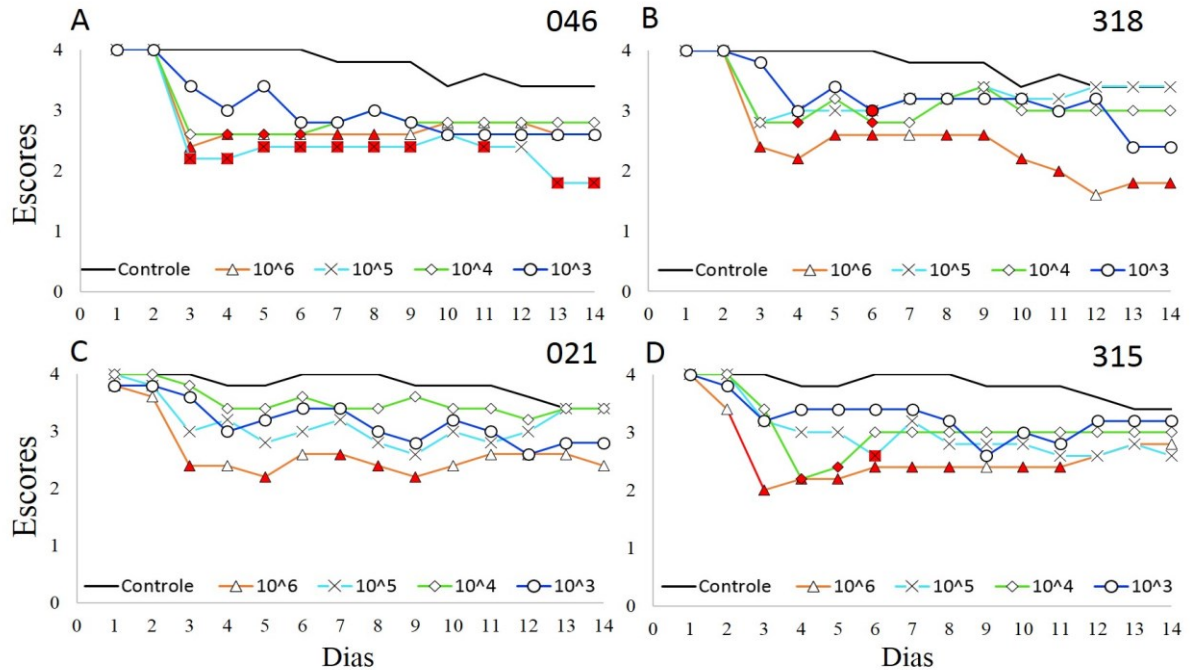
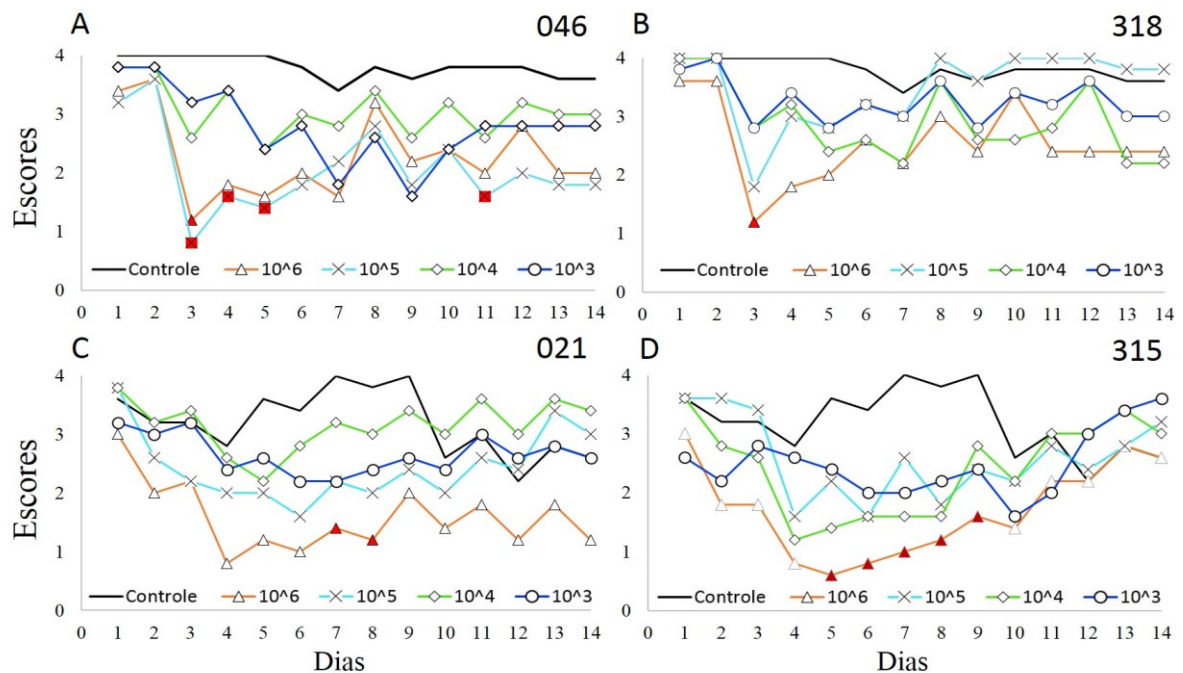


Figura 7. Alterações nos níveis de forrageio de *Atta sexdens rubropilosa* após inoculação de esporos de *Escovopsis*. A: isolado LESF 046, B: LESF 318, C: LESF 021 e D: LESF 315. Considerando cada dia, os marcadores em vermelho indicam diferenças significativas entre os tratamentos e o controle.

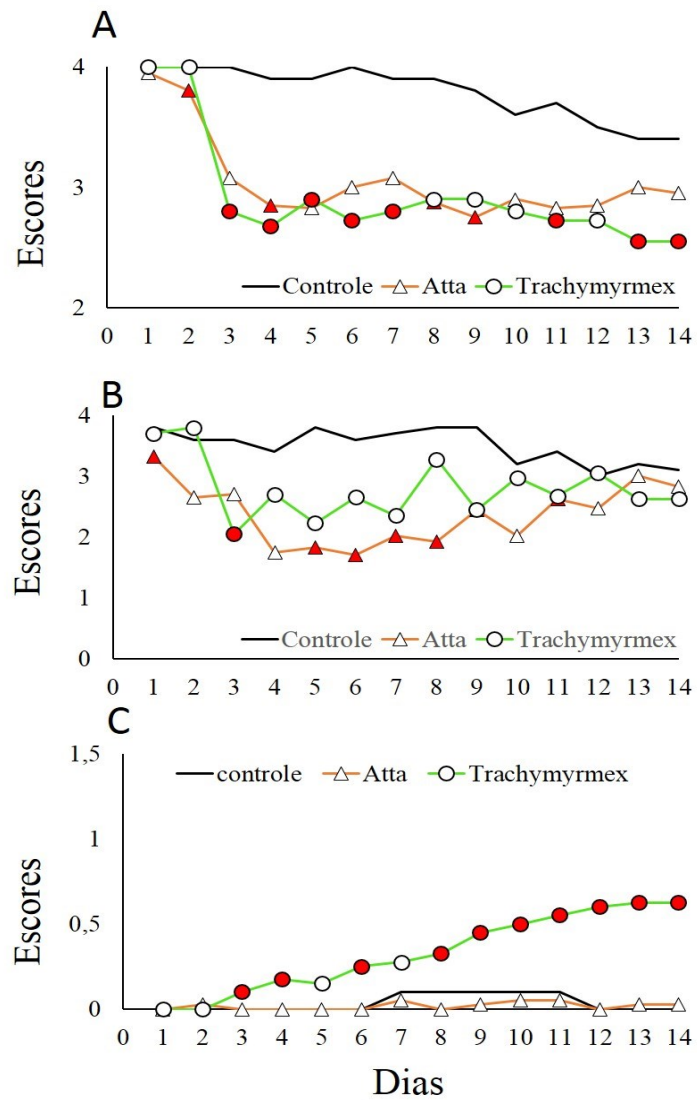


Diferenças significativas nas condições das subcolônias foram pronunciadas quando tratadas com esporos de *Escovopsis* provenientes de colônias de *Trachymyrmex* sp. em comparação com os isolados provenientes de colônias de *Atta*. Os últimos provocaram declínio das condições das subcolônias, porém essas se recuperaram até o fim do experimento. Por outro lado, danos significativos nas subcolônias perduram até o fim do experimento nos tratamentos com esporos de *Escovopsis* provenientes de *Trachymyrmex* sp. (Figura 8A).

A diminuição nos níveis de forrageio causada pelos isolados de *Escovopsis* provenientes de colônias de *Trachymyrmex* sp. e *A. sexdens* foram discrepantes. Frente aos isolados de *Escovopsis* provenientes de *A. sexdens* o forrageio foi afetado significativamente, quando comparado com o controle desde o primeiro dia até o oitavo dia. Por outro lado, a diminuição nos níveis de forrageio provocada pelos isolados provenientes de colônias de *Trachymyrmex* sp. foi quase nula, sendo que diferenças foram observadas somente no terceiro dia (Figura 8B).

Interessante foi observar diferenças na construção de jardins novos quando comparamos subcolônias tratadas com esporos de *Escovopsis* de ambos os gêneros de formigas. Um maior número de jardins novos foram observados desde o terceiro dia até o fim do experimento nas subcolônias tratadas com esporos de *Escovopsis* sp. LESF 046 e LESF 318 (*Trachymyrmex* sp.). Por outro lado, não houve diferenças significativas no número de novos jardins construídos nas subcolônias tratadas com esporos de *Escovopsis* sp. LESF 021 e LESF 315 (*A. sexdens*, Figura 8C).

Figura 8. Alterações nas condições do jardim (A), níveis de forrageio (B) e construção de jardins novos (C) após tratamento com esporos de *Escovopsis* em subcolônias de *Atta sexdens rubropilosa*. Os isolados de *Escovopsis* foram agrupados segundo sua origem: LESF 046 e LESF 318 (*Trachymyrmex* sp.) e LESF 021 e LESF 315 (*Atta sexdens*). Os marcadores em vermelho indicam diferenças significativas entre o tratamento e o controle



## 6. DISCUSSÃO

A virulência das interações patógeno-hospedeiro pode ser avaliada como o resultado da susceptibilidade do hospedeiro e da infectividade do patógeno. Esses dois fatores permitem caracterizar quais interações são mais ou menos virulentas. Nesse trabalho demonstramos, pela primeira vez, que a susceptibilidade do fungo mutualista determina a virulência da interação com *Escovopsis*, diferente do que se pensava anteriormente. Além disso, observamos que a complexidade dos jardins de fungo (i.e. fungo mutualista, microbioma associado e as operárias) impede que ação do patógeno leve as subcolônias à morte, ao contrário do observado nos experimentos *in vitro*. Baseado nesses resultados concluímos que *Escovopsis* pode ser considerado um patógeno oportunista dos jardins das formigas cultivadoras de fungos.

Segundo Casadevall e Pirofski (1999) os patógenos podem ser classificados em seis classes. Segundo nossos resultados, *Escovopsis* corresponde aos patógenos da classe 1. Esses são também conhecidos como patógenos oportunistas, pois causam a doença somente em organismos com sistema imunológico debilitado (no nosso caso, a saúde da colônia comprometida). Esses organismos raramente ocasionam infecções com sintomas visíveis em indivíduos saudáveis, pois apresentam uma baixa infectividade intrínseca.

*L. gongylophorus* e o fungo mutualista de *Trachymyrmex* sp. são susceptíveis a infecção por *Escovopsis*. A inibição do crescimento micelial de *L. gongylophorus* também foi relatada em outros estudos frente a isolados de *Escovopsis*, *Escovopsioides*, *Acremonium kiliense* e *Trichoderma harzianum* (SILVA et al., 2006; FOLGARAIT et al., 2011a; OSTI, 2016; VARANDA-HAIFIG et al., 2017). Entretanto, nesses estudos os autores interpretaram tal inibição como resultado da “virulência” do parasito. Diferente disso, no presente trabalho consideramos os níveis de inibição do crescimento micelial do fungo mutualista como indicativo da susceptibilidade do hospedeiro. Portanto, demonstramos que o fungo mutualista de *Trachymyrmex* sp. é mais susceptível a infecção por *Escovopsis*, quando comparado com *L. gongylophorus*.

As diferenças observadas na susceptibilidade dos dois fungos mutualistas podem ser atribuídas aos mecanismos de defesa do hospedeiro. Gerardo et al. (2006 a,b) encontraram que fungos mutualistas cultivados por *Apterostigma* produzem compostos químicos que inibiram vários isolados de *Escovopsis* nativos (provenientes de colônias de *Apterostigma*) e não-nativos (provenientes de colônias de outros gêneros de atíneas). Neste trabalho, não foi avaliada a produção de compostos químicos, contudo as mudanças observadas na coloração

do meio de cultivo e do fungo mutualista sugerem a liberação de metabólitos por parte do hospedeiro e do patógeno. Este mecanismo poderia ser uma possível explicação para as diferenças na susceptibilidade observadas. Adicionalmente, corroborando os resultados da regressão linear, as taxas de crescimento mostraram que, independente do isolado de *Escovopsis*, o fungo mutualista de *Trachymyrmex* sp. sempre foi o mais susceptível. As taxas de crescimento do cultivar de *Trachymyrmex* sp. nos confrontos foram sempre negativas, enquanto que de *L. gongylophorus* foram positivas em 19 dentre os 21 confrontos. Esses resultados sugerem que as defesas do fungo mutualista são as maiores responsáveis pelo resultado final da interação com *Escovopsis*.

Curiosamente, os resultados obtidos referentes à susceptibilidade do hospedeiro não eram esperados. *L. gongylophorus* é mantido pelas formigas cortadeiras como um clone assexuado e domesticado há, aproximadamente, 8 a 12 milhões de anos (SCHULTZ; BRADY, 2008). Portanto, esse fungo apresenta uma variabilidade genética restrita (CHAPELA et al., 1994; ELIZONDO-WALLACE et al., 2014). Embora os cultivares de *Trachymyrmex* sp. apresentem uma variabilidade genética menor que os cultivares de formigas atíneas basais, esses apresentam uma variabilidade genética maior que *L. gongylophorus* (DE FINE LICHT; BOOMSMA, 2014). Então, seria esperado que os cultivares de *Trachymyrmex* sp. fossem menos susceptíveis à infecção por parasitos, entretanto, nós registramos o contrário. Currie et al. (1999a) demonstraram que a infecção por *Escovopsis* é mais frequente em colônias de formigas derivadas, do que em colônias de formigas basais. Os mesmos autores explicam que a maior susceptibilidade dos cultivares de formigas derivadas frente a parasitos especializados é uma consequência da propagação clonal do fungo durante a evolução. Entretanto, na corrida armamentista entre *L. gongylophorus* e *Escovopsis*, o hospedeiro pode ter desenvolvido defesas de rápido reconhecimento do parasito, o que pode não ter ocorrido com os cultivares de *Trachymyrmex* sp.; isso explicaria as diferenças na susceptibilidade observadas neste estudo.

A liberação de compostos solúveis pelo fungo mutualista pode explicar as mudanças na coloração do meio de cultivo e do próprio fungo na maioria das interações *Escovopsis*-fungo mutualista avaliadas. Um tipo de mudança de coloração foi a perda da opacidade do fungo mutualista. Essa foi observada somente nas interações do parasito com *L. gongylophorus*, também relatada por Folgarait et al. (2011b) e Reynolds e Currie (2004). Aparentemente, a perda da opacidade é uma resposta mais forte do hospedeiro à infecção. O fato de um hospedeiro provocar danos a si mesmo como resposta a uma infecção não é estranho. Na área médica, hospedeiros que apresentam elevada resposta imune a parasitos

podem infligir danos a si mesmos devido a tal resposta, enquanto os danos causados em hospedeiros com resposta imune fraca ou moderada são mediados pelo parasito (CASADEVALL; PIROFSKI, 1999). Embora não investigado em detalhes em nosso estudo, esta é uma possível explicação da perda da opacidade observada em *L. gongylophorus*, o qual apresentou defesas mais efetivas, quando comparado com o fungo mutualista de *Trachymymex* sp.

Com relação à infectividade de *Escovopsis*, nossos resultados mostraram que todos os isolados do parasito inibiram o crescimento micelial de ambos os fungos mutualistas. Os dados suportam a hipótese proposta por Meirelles et al. (2015b) sobre o compartilhamento de parasitos entre formigas cortadeiras e não-cortadeiras de folhas. Portanto, a infectividade dos isolados avaliados não está associada à origem do parasito (i.e formiga cortadeira ou não-cortadeira de folhas).

Adicionalmente, todos os isolados de *Escovopsis* cresceram mais rápido na presença de ambos os fungos mutualistas, do que na ausência desses. Esses resultados também são coerentes com o encontrado por Reynolds e Currie (2004) e Folgarait et al. (2011a,b), os quais registraram um maior crescimento micelial de *Escovopsis* na presença de fungos mutualistas. Gerardo et al. (2004) demonstraram que *Escovopsis* pode responder a sinais químicos do hospedeiro, pois quando um parasito encontra um hospedeiro mais susceptível, cresce mais rapidamente na direção desse. Observamos também que não há relação direta entre a velocidade de crescimento do patógeno e maior inibição no hospedeiro. Esse resultado reforça que a virulência da interação patógeno-hospedeiro é modulada pelas capacidades de defesas do hospedeiro e não somente pela ação do patógeno.

No entanto, a infectividade pode ser compreendida levando em consideração os padrões de reconhecimento do hospedeiro (aqui chamado de “padrões de infectividade”). Os padrões observados coincidem com aqueles descritos por Birnbaum e Gerardo (2016), a saber: “atração-inibição”, “atração sem inibição” e “sem atração e sem inibição”. Gerardo et al. (2006a) comentaram que padrões de inibição e atração poderiam ser explicados pelos dois grandes modelos de interação genética entre parasito e hospedeiro. No primeiro modelo, *matching-alleles*, todos os parasitos teriam o mesmo sucesso na infectividade frente aos seus hospedeiros apropriados. Neste modelo, para a infecção ocorrer, o genótipo de infectividade do parasito tem que coincidir exatamente com o genótipo de susceptibilidade do hospedeiro. No segundo modelo, *gene-for-gene*, alguns parasitos são mais efetivos que outros e alguns hospedeiros são mais resistentes que outros na população (AGRAWAL; LIVELY, 2002). No nosso estudo, o modelo *gene-for-gene* explica os resultados. Foi observado que ambos os

fungos mutualistas mostraram diferenças na susceptibilidade frente aos mesmos isolados de *Escovopsis*, assim como os isolados de *Escovopsis* apresentaram diferenças na infectividade frente ao mesmo fungo mutualista.

A complexidade das interações existentes nos jardins de fungo interfere na virulência da interação parasito-hospedeiro. Nos ensaios *in vitro* com *L. gongylophorus*, *Escovopsis* provocou a morte do hospedeiro na maioria das interações (92,8%). Já nos ensaios com subcolônias, *Escovopsis* provocou a morte de somente 4% das réplicas do experimento. Essas mortes podem não ter ocorrido em decorrência somente da ação do patógeno, mas por qualquer outro fator relacionado à saúde das subcolônias. Elizondo-Wallace et al. (2014) também observaram diminuição (em 50%) na infectividade de *Escovopsis*, comparando resultados de experimentos *in vitro* com bioensaios em subcolônias. As diferenças na infectividade entre bioensaios *in vitro* e *in vivo* eram esperadas, pois nos experimentos *in vitro* a única defesa do fungo mutualista são os compostos liberados no meio de cultivo frente ao reconhecimento do parasito (GERARDO et al., 2006a). Por outro lado, o experimento *in vivo* demonstrou a eficácia dos mecanismos de defesa do jardim, incluindo as defesas do fungo mutualista contra o parasito, bem como os comportamentos de cuidado e limpeza (*grooming* e *weeding*) do jardim pelas formigas (CURRIE; STUART, 2001). Isso significa que a complexidade das interações existentes nos jardins de fungo diminuiu a infectividade do patógeno.

Embora existam diferenças marcantes quanto à virulência da interação entre os experimentos *in vitro* e *in vivo*, no geral os resultados dos testes em subcolônias foram coerentes com aqueles obtidos em placa de Petri. Dos quatro isolados avaliados, *Escovopsis* sp. LESF 021 foi o que provocou interações menos virulentas *in vitro* e em subcolônias. Este isolado apresenta padrão de infectividade “atração sem inibição”. Baseado nesse padrão, seria esperado que o fungo parasita apresentasse uma maior eficiência na sua infectividade, porém outros fatores da biologia desse isolado podem ter influenciado no sucesso da infecção. Os demais isolados apresentaram infectividades semelhantes *in vitro*, porém proporcionaram resultados diferentes nos ensaios com subcolônias. Tal disparidade pode ser explicada pelos diferentes padrões de infectividade dos isolados (LESF 046: “atração sem inibição”, LESF 318: “sem atração e sem inibição” e LESF 315” “atração e inibição”). *Escovopsis* sp. LESF 046, que provocou interações mais virulentas e o isolado (LESF 318), que ocasionou danos até o final do experimento, não foram inibidos pelo fungo mutualista. Já o isolado LESF 315, o qual foi inibido, provocou menos danos nas subcolônias, permitindo a recuperação dessas antes do fim do experimento. Portanto, a infectividade do patógeno parece estar associada aos

padrões de reconhecimento do fungo mutualista e não à origem do isolado (i.e. de formigas cortadeiras ou não-cortadeiras de folhas).

Foi observado que as subcolônias na presença dos isolados de *Escovopsis* mais infectivos construíram um maior número de jardins novos, quando comparado com as subcolônias tratadas com *Escovopsis* menos infectivos. Provavelmente as formigas detectam o fungo patogênico, porém não conseguiram eliminá-lo por completo do jardim. Nesses casos as operárias iniciaram o cultivo de um novo jardim em outra câmara, às vezes em detrimento dos cuidados do jardim principal. Possivelmente, esse comportamento é um indicativo da presença de um patógeno mais infectivo, frente ao qual as formigas não conseguem controlar a infecção.

Os nossos resultados pontuam três aspectos importantes para o entendimento da interação patógeno-hospedeiro no jardim de fungo. As diferenças observadas na virulência das interações podem ser atribuídas principalmente à ação do fungo mutualista. Além disso, a infectividade do *Escovopsis* depende fundamentalmente de padrões de reconhecimento do fungo mutualista e não somente de características do próprio patógeno (ex.: taxa de crescimento). Esses aspectos somados ao fato de que *Escovopsis* ocasionou a morte do fungo mutualista apenas em interações *in vitro* (i.e. hospedeiros com defesas comprometidas), sugerem que *Escovopsis* é um patógeno oportunista do jardim de fungo.

## 7. CONCLUSÕES

- Na fungicultura das formigas atíneas derivadas (cortadeiras e não-cortadeiras de folhas), a virulência da interação *Escovopsis*-fungo mutualista não é determinada pela infectividade do patógeno, mas sim pela susceptibilidade do hospedeiro.
- As diferenças na infectividade de *Escovopsis* são melhor explicadas pelos padrões de reconhecimento patógeno-hospedeiro, do que pelas taxas de crescimento do patógeno.
- A pronunciada diminuição da infectividade do patógeno nos experimentos com subcolônias (i.e. jardim com todas as defesas), quando comparado com os experimentos *in vitro*, sugere que *Escovopsis* é um patógeno oportunista.

## REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, A.; LIVELY, C. M. Infection genetics: gene-for-gene versus matching-alleles models and all points in between. **Evolutionary Ecology Research**, Tucson, v. 4, n. 1, p. 91-107, 2002.
- ANTONOVICS, J.; BOOTS, M.; EBERT, D.; KOSKELLA, B.; POSS, M.; SADD, B. M. The origin of specificity by means of natural selection: evolved and nonhost resistance in host–pathogen interactions. **Evolution**, Lancaster, v. 67, n. 1, p. 1-9, 2013.
- AUGUSTIN, J. O.; GROENEWALD, J. Z.; NASCIMENTO, R. J.; MIZUBUTI, E. S. G.; BARRETO, R. W.; ELLIOT, S. L.; EVANS, H. C. Yet more “weeds” in the garden: fungal novelties from nests of leaf-cutting ants. **PLoS One**, São Francisco, v. 8, n. 12, p. 1-17, 2013.
- AYLWARD, F. O.; BURNUM, K. E.; SCOTT, J. J.; SUEN, G.; TRINGE, S. G.; ADAMS, S. M.; BARRY, K. W.; NICORA, C. D.; PIEHOWSKI, P.; PURVINE, S. O.; STARRETT, G. J.; GOODWIN, L. A.; SMITH, R. D.; LIPTON, M. S.; CURRIE, C. R. Metagenomic and metaproteomic insights into bacterial communities in leaf-cutter ant fungus gardens. **ISME Journal**, New York, v. 6, p. 1688-1701, 2012.
- BARCOTO, M. O.; PEDROSA, F.; BUENO, O. C.; RODRIGUES, A. Pathogenic nature of *Syncephalastrum* in *Atta sexdens rubropilosa* fungus gardens. **Pest Management Science**, Sussex, v. 73, n. 5, p. 999-1009, 2017.
- BIRNBAUM, S. S. L.; GERARDO, N. M. Patterns of specificity of the pathogen *Escovopsis* across the fungus-growing Ant Symbiosis. **The American Naturalist**, Chicago, v. 188, n. 1, p. 52-65, 2016.
- BUTLER, E. E. *Rhizoctonia solani* as a parasite of fungi. **Mycologia**, New York, v. 49, n. 3, p. 354-373, 1957.
- CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA F. C.; BACCI, M. Jr.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; MIDDELHOVEN, W. J. Occurrence of killer yeasts in leaf-cutting ant nests. **Folia Microbiologica**, Praga, v. 47, n. 3, p. 259–262, 2002.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. **Infection and immunity**, Washington, v. 67, n 8, p. 3703-3713, 1999.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. **Journal of infectious Diseases**, Chicago, v. 184, n 3, p. 337-344, 2001.

CHAPELA, I.; REHNER, S. A.; SCHULTZ, T. R., MUELLER, U. G. Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. **Science**, Washington, v. 266, n. 5191, p. 1691-1694, 1994.

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

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

CURRIE, C. R. A community of ants, fungi and bacteria: A multilateral approach to studying symbiosis. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 55, p. 357-380, 2001a.

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

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

CURRIE, C. R.; POULSEN, M.; MENDENHALL, J. J.; BOOMSMA, J. J.; BILLEN, J. Coevolved crypts and exocrine glands support mutualistic bacteria in fungus-growing ants. **Science**, Washington, v. 311, n. 81, p. 81-83, 2006.

DE FINE LICHT, H. H.; BOOMSMA, J. J. Variable interaction specificity and symbiont performance in Panamanian *Trachymyrmex* and *Sericomyrmex* fungus-growing ants. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 14, n. 1, p. 244, 2014.

DE FINE LICHT, H.; BOOMSMA, J. J.; TUNLID, A. Symbiotic adaptations in the fungal cultivar of leaf-cutting ants. **Nature Communications**, New York, v. 5, n. 5675, 2014. doi: 10.1038/ncomms6675

ELIZONDO-WALLACE, D. E. E.; ASENSIO, J. G. V.; TOMÁS, A. A. P. Correlation between virulence and genetic structure of *Escovopsis* strains from leaf-cutting ant colonies in Costa Rica. **Microbiology**, Reading, v. 160, n. 8, p. 1727-1736, 2014.

FERNÁNDEZ-MARÍN, H.; ZIMMERMAN, J. K.; NASH, D. R.; BOOMSMA, J. J.; WCISLO, W. T. Reduced biological control and enhanced chemical pest management in the evolution of fungus farming in ants. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, London, v. 276, n. 1665, p. 2263-2269, 2009.

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

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**, College Park, v. 40, n. 2, p. 342-349, 2011b.

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

GERARDO, N. M.; JACOBS, S. R.; CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G. Ancient host-pathogen associations maintained by specificity of chemotaxis and antibiosis. **PLoS Biology**, California, v. 4, n. 8, p. e235, 2006a.

GERARDO, N. M.; MUELLER, U. G.; CURRIE, C. R. Complex host-pathogen coevolution in the *Apterostigma* fungus-growing ant-microbe symbiosis. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 6, n. 1, p. 88, 2006b.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RIAN, P. D. Past: Palaeontological statistics software package for education and data analysis. Versão. 2.14. **Paleontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 9, 2001. Disponível em [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/past.pdf](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf), acessado em 20/05/2012.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The Ants**. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press, 1990. 732 p.

JAENIKE, J. Suboptimal virulence of an insect-parasitic nematode. **Evolution**, Lancaster, v. 50, n. 6, p. 2241–2247, 1996.

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**, São Francisco, v. 11, n 7, p. e0151059, 2016.

KHANNA, D. R.; YADAV, P. R. **Biology of helminthes**. India: Discovery Publishing House, 2004. 456 p.

LITTLE, A. E. F.; CURRIE, C. R. Symbiotic complexity: discovery of a fifth symbiont in the attine ant-microbe symbiosis. **Biology Letters**, London, v. 15, n. 3, p. 501–504, 2007.

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

MASIULIONIS, V. E.; CABELLO, M. N.; SEIFERT, K. A.; RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F. C. *Escovopsis trichodermoides* sp. nov., isolated from a nest of the lower attine ant *Mycocepurus goeldii*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 107, n. 3, p. 731-740, 2015.

MEIRELLES, L. A.; MONTOYA, Q. V.; SOLOMON, S. E.; RODRIGUES, A. New light on the systematics of fungi associated with attine ant gardens and the description of *Escovopsis kreiselii* sp. nov. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 1, p. e0112067, 2015a.

MEIRELLES, L. A.; SOLOMON, S.; BACCI JR.; M.; WRIGHT, A.; MUELLER, U.G.; RODRIGUES, A. Shared *Escovopsis* infections destabilize the tripartite coevolution hypothesis in the higher-attine fungus-growing ant symbiosis. **Royal Society Open Science**, London, v. 2, n. 9, p. 150257, 2015b.

MENDES, T. D.; RODRIGUES, A.; DAYO-OWOYEMI, I.; MARSON, F. A. L.; PAGNOCCA, F. C. Generation of nutrients and detoxification: possible roles of yeasts in leaf-cutting ant nests. **Insects**, [s.i.], v. 3, n. 1, p. 228-245, 2012.

MIKHEYEV, A. S.; MUELLER, U. G.; ABBOT, P. Cryptic sex and many-to-one coevolution in the fungus-growing ant symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America**, Washington, v. 103, n. 28, p. 10702-10706, 2006.

MIKHEYEV, A. S.; MUELLER, U. G.; ABBOT, P. Comparative dating of attine ant and lepiotaceous cultivar phylogenies reveals coevolutionary synchrony and discord. **American Naturalist**, Chicago, v. 175, n. 6, p. e126–133, 2010.

MONTOYA, Q. V.; MEIRELLES, L. A. CHAVERRI, P., RODRIGUES, A. Unraveling *Trichoderma* species in the attine ant environment: description of three new taxa. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 109, n. 5, p. 633-651, 2016.

MOREIRA, S. M.; RODRIGUES, A.; FORTI, L. C.; NAGAMOTO, N. S. Absence of the parasite *Escovopsis* in fungus garden pellets carried by gynes of *Atta sexdens*. **Sociobiology**, Chico, v. 62, n. 1, p. 34-38, 2015.

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

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

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

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

OSTI, J. F. **Evidências experimentais sugerem o gênero *Escovopsioides* como parasito do fungo cultivado pelas formigas atíneas**. 2016. 38f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2016.

PAGNOCCA, F. C.; SILVA, O. A.; BERALDO, M. J. A. H.; BUENO, O. C. Toxicity of sesame extracts to the leaf-cutting ants symbiotic fungus. **Bulletin of Entomological Research**, Cambridge, v. 80, n. 3, p. 349-352, 1990.

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

PINTO-TOMÁS, A. A.; ANDERSON, M. A.; SUEN, G.; STEVENSON, D. M.; CHU, F. S. T.; CLELAND, W.; WEIMER, P.J.; CURRIE, C. R. Symbiotic nitrogen fixation in the fungus gardens of leaf-cutter ants. **Science**, Washington, v. 326, n. 5956, p. 1120-1123, 2009.

POULIN, R.; COMBES, C. The concept of virulence: interpretations and implications. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 15, n. 12, p. 474-475, 1999.

POULSEN, M.; CURRIE, C. R. Complexity of insect-fungal associations: exploring the influence of microorganisms on attine ant-fungus symbiosis. In: BOURTZIS, K.; MILLER, T. A. (Eds.) **Insect Symbiosis**, Newbury: CRC Press, v. 2, [s.n.], p. 57-77, 2006.

QUINLAN, R. J.; CHERRETT, J. M. The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.). **Ecological Entomology**, London, v. 4, n. 2, p. 151-160, 1979.

RASBAND, W. S. **ImageJ**, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014.

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

RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI, M. Jr.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PENNING, L. H. Variability of non-mutualistic fungi associated with *Atta sexdens rubropilosa* nests. **Folia Microbiologica**, Prague, v. 50, n. 5, p. 421-425, 2005.

RODRIGUES, A.; BACCI, M. Jr.; MUELLER, U. G.; ORTIZ, A.; PAGNOCCA, F. C. Microfungal “weeds” in the leafcutter ant symbiosis. **Microbial Ecology**, Washington, v. 56, n. 4, p. 604-614, 2008.

RODRIGUES, A.; CABLE, R. N.; MUELLER, U. G.; BACCI, M.; PAGNOCCA, F. C. Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungi garden pathogens of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 96, n. 3, p. 331-342, 2009.

RODRIGUES, A.; MUELLER, U. G.; ISHAK, H. D.; BACCI, M. Jr; PAGNOCCA, F. C. Ecology of microfungi communities in gardens of fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae): a year-long survey of three species of attine ants in Central Texas. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 78, n. 2, p. 244–255, 2011.

SANTOS, A. V.; DILLON, V. M.; REYNOLDS, S. E.; SAMUELS, R. I. Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.239, n.2, p.319-323, 2004.

SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, n. 14, p. 5435-5440, 2008.

SEIFERT, K. A.; SAMSON, R. A.; CHAPELA, I. H. *Escovopsis aspergilloides*, a rediscovered hyphomycete from leaf-cutting ant nests. **Mycologia**, Bronx, v. 87, n. 3, p. 407-413, 1995.

SILVA, A.; BACCI, M. Jr.; SIQUEIRA, C. G.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 49, n. 4, p. 307-313, 2003.

SILVA, A.; RODRIGUES, A.; BACCI Jr, M.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C. Susceptibility of the ant-cultivated fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales: Basidiomycota) towards microfungi. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 162, n. 2, p. 115-119, 2006.

SILVA-PINHATI, A. C. O.; BACCI JÚNIOR, M.; HINKLE, G.; SOGIN, M. L.; PAGNOCCA, F. C.; MARTINS, V.G.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. Low variation in ribosomal DNA and internal transcribed spacers of the symbiotic fungi of leaf-cutting ants (Attini: Formicidae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 10, p. 1463-1472, 2004.

SOSA-CALVO, J.; SCHULTZ, T. R.; BRANDÃO, C. R. F.; KLINGENBERG, C.; FEITOSA, R. M.; RABELING, C.; BACCI Jr, M.; LOPES, C. T.; VASCONCELOS, H. L. *Cyatta abscondita*: taxonomy, evolution, and natural history of a new fungus-farming ant genus from Brazil. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 11, p. e80498, 2013.

SUEN, G.; SCOTT, J. J.; AYLWARD, F. O.; ADAMS, S. M.; TRINGE, S. G.; PINTOTOMÁS, A. A.; FOSTER, C. E.; PAULY, M.; WEIMER, P.J.; BARRY, K. W.; GOODWIN, L. A.; BOUFFARD, P.; LI, L.; OSTERBERGER, J.; HARKINS, T. T.; SLATER, S. C.; DONOHUE, T. J.; CURRIE, C. C. An insect herbivore microbiome with high plant biomass-degrading capacity. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 6, n. 9, e1001129, 2010.

TAERUM, S. J.; CAFARO, M. J.; LITTLE, A. E. F.; SCHULTZ, T. R.; CURRIE, C. R. Low host-pathogen specificity in the leaf-cutting ant-microbe symbiosis. **Proceedings of The Royal Society B-Biological Sciences**, London, v. 274, n. 1621, p. 1971-1978, 2007.

TAYLOR, A. L.; SASSER, J. N. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). **Raleigh: International *Meloidogyne* Project**, NCSU & USAID Coop. Publ., 1978. 111p.

VARANDA-HAIFIG, S. S.; ALBARICI, T. R.; NUNES, P. H.; HAIFIG, I.; VIEIRA, P. C.; RODRIGUES, A. Nature of the interactions between hypocrealean fungi and the mutualistic fungus of leaf-cutter ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 110, n. 4, p. 593-605, 2017.

WARD, P. S.; BRADY, S. G.; FISHER, B. L.; SCHULTZ, T. R. The evolution of myrmicine ants: phylogeny and biogeography of a hyperdiverse ant clade (Hymenoptera: Formicidae). **Systematic Entomology**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 61-81, 2015.

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

## ANEXOS

Tabela A1. Escala de escores utilizada na caracterização do estado das subcolônias usadas nos ensaios (adaptada de BARCOTO et al., 2017).

Aspecto	Escore	Descrição	
Condições gerais			
	4	A colônia apresenta níveis normais de incorporação de folhas. Pode ser observado crescimento do jardim de fungo.	
	3	Diminuição dos níveis de incorporação de folhas no jardim. Não há crescimento do mesmo.	
	2	Não há incorporação do material vegetal no jardim de fungo principal. Em alguns pontos, o jardim pode apresentar um aspecto envelhecido (mais escuro).	
	1	Não há incorporação nem manutenção do jardim de fungo. O lixo compreende até 75% do volume inicial do jardim. O jardim apresenta aspecto seco e envelhecido.	
	0	Jardim de fungo morto	

---

**FORAGEIO**

4 Há corte em quantidades normais e incorporação da maioria dos fragmentos de folhas no jardim de fungo.



3 Há corte em quantidade normal, mas a incorporação de fragmentos de folhas no jardim de fungo é reduzida. Até 25% de redução no forrageio.



2 O corte é reduzido e não há incorporação do material vegetal no jardim de fungo principal. Pode haver incorporação no jardim novo. Até 50% de redução no forrageio.



1 O corte é significativamente reduzido, sendo que somente fragmentos pequenos são visíveis, não havendo incorporação. Até 75% de redução no forrageio.



0 Corte completamente alterado ou morte da colônia. Não há corte ou incorporação

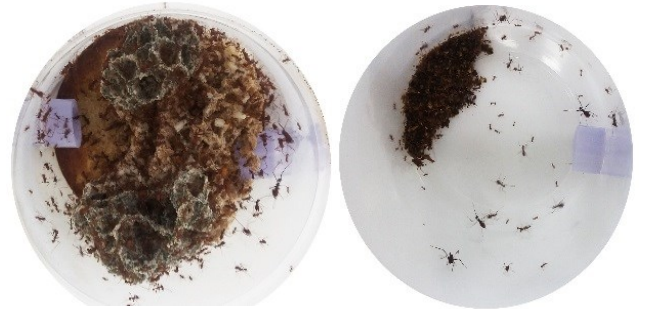


## Lixo

- 0 Sem alterações em relação à colônias sem tratamento.



- 1 Quantidade de lixo compreende até 25% do volume inicial do jardim de fungo.



- 2 Quantidade de lixo compreende até 50% do volume inicial do jardim de fungo.



- 3 Quantidade de lixo compreende até 75% do volume inicial do jardim de fungo.



- 4 O lixo compreende todo o jardim. Podem ser observadas formigas mortas.

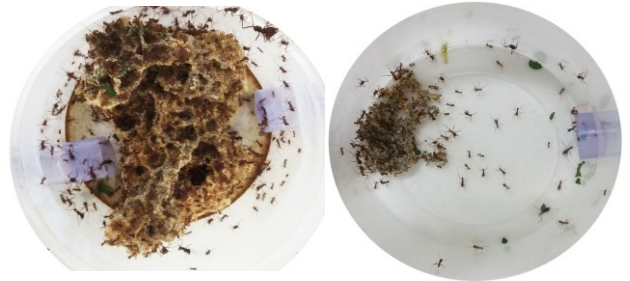


---

Novo jardim      0      Não se observa construção de jardim novo.

---

1      Começa o cultivo de um jardim novo fora do container principal. Este jardim é pequeno e pode ser abandonado ou desconstruído pelas formigas. Representa menos do 25% do jardim principal.



---

2      Jardim novo robusto, que perdura no tempo sem ser destruído pelas formigas. Representa mais do 25 % do jardim principal.

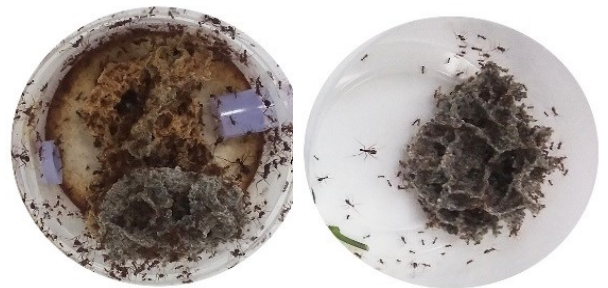


Tabela A2. Área de crescimento micelial (média  $\pm$  erro padrão, em cm<sup>2</sup>) do fungo mutualista *Leucoagaricus gongylophorus*, na ausência (tratamento C) e na presença (tratamento E) de diferentes isolados de *Escovopsis*. Os valores destacados em negrito apresentaram diferenças significativa ( $P < 0,05$ ) segundo o teste Mann–Whitney.

<i>Escovopsis</i>	Tratamento	Dias							
		0	1	2	3	5	7	10	14
LESF 021	C	4,77 $\pm$ 0,05	5,23 $\pm$ 0,06	5,95 $\pm$ 0,09	6,53 $\pm$ 0,14	<b>7,80<math>\pm</math>0,16</b>	8,83 $\pm$ 0,12	10,94 $\pm$ 0,27	13,43 $\pm$ 0,33
	E	4,78 $\pm$ 0,07	5,37 $\pm$ 0,08	6,12 $\pm$ 0,09	6,56 $\pm$ 0,15	<b>6,62<math>\pm</math>0,24</b>	6,45 $\pm$ 0,24	6,60 $\pm$ 0,24	6,47 $\pm$ 0,29
LESF 022	C	5,05 $\pm$ 0,07	5,51 $\pm$ 0,08	6,10 $\pm$ 0,14	<b>6,88<math>\pm</math>0,15</b>	8,53 $\pm$ 0,18	10,17 $\pm$ 0,21	13,43 $\pm$ 0,22	16,17 $\pm$ 0,26
	E	5,16 $\pm$ 0,05	5,59 $\pm$ 0,05	6,04 $\pm$ 0,05	<b>6,36<math>\pm</math>0,09</b>	6,55 $\pm$ 0,12	6,20 $\pm$ 0,12	6,18 $\pm$ 0,13	6,21 $\pm$ 0,14
LESF 044	C	4,77 $\pm$ 0,05	5,23 $\pm$ 0,06	<b>5,95<math>\pm</math>0,09</b>	6,53 $\pm$ 0,14	7,80 $\pm$ 0,16	8,83 $\pm$ 0,12	10,94 $\pm$ 0,27	13,43 $\pm$ 0,33
	E	4,78 $\pm$ 0,05	5,23 $\pm$ 0,04	<b>5,16<math>\pm</math>0,06</b>	5,23 $\pm$ 0,11	5,21 $\pm$ 0,09	5,23 $\pm$ 0,12	5,11 $\pm$ 0,10	5,06 $\pm$ 0,12
LESF 045	C	5,05 $\pm$ 0,07	5,51 $\pm$ 0,08	<b>6,10<math>\pm</math>0,14</b>	6,88 $\pm$ 0,15	8,53 $\pm$ 0,18	10,17 $\pm$ 0,21	13,43 $\pm$ 0,22	16,17 $\pm$ 0,26
	E	4,98 $\pm$ 0,04	5,47 $\pm$ 0,04	<b>5,46<math>\pm</math>0,05</b>	5,48 $\pm$ 0,13	5,36 $\pm$ 0,08	5,35 $\pm$ 0,08	5,41 $\pm$ 0,05	5,38 $\pm$ 0,07
LESF 052	C	4,26 $\pm$ 0,12	4,68 $\pm$ 0,13	5,08 $\pm$ 0,17	6,22 $\pm$ 0,21	<b>7,14<math>\pm</math>0,21</b>	8,49 $\pm$ 0,24	10,82 $\pm$ 0,27	14,02 $\pm$ 0,33
	E	4,29 $\pm$ 0,06	4,60 $\pm$ 0,08	5,06 $\pm$ 0,10	5,60 $\pm$ 0,13	<b>5,89<math>\pm</math>0,23</b>	6,31 $\pm$ 0,19	5,90 $\pm$ 0,30	5,35 $\pm$ 0,16
LESF 106	C	4,60 $\pm$ 0,05	4,95 $\pm$ 0,05	<b>5,63<math>\pm</math>0,06</b>	6,27 $\pm$ 0,07	7,59 $\pm$ 0,12	9,18 $\pm$ 0,11	12,07 $\pm$ 0,20	14,73 $\pm$ 0,24
	E	4,62 $\pm$ 0,08	4,97 $\pm$ 0,07	<b>5,00<math>\pm</math>0,09</b>	4,69 $\pm$ 0,17	4,62 $\pm$ 0,20	4,42 $\pm$ 0,18	4,13 $\pm$ 0,22	4,01 $\pm$ 0,28
LESF 135	C	4,26 $\pm$ 0,12	4,68 $\pm$ 0,13	5,08 $\pm$ 0,17	<b>6,22<math>\pm</math>0,21</b>	7,14 $\pm$ 0,21	8,49 $\pm$ 0,24	10,82 $\pm$ 0,27	14,02 $\pm$ 0,33
	E	4,33 $\pm$ 0,08	4,62 $\pm$ 0,06	5,26 $\pm$ 0,07	<b>5,04<math>\pm</math>0,06</b>	5,18 $\pm$ 0,09	5,37 $\pm$ 0,15	5,53 $\pm$ 0,31	5,39 $\pm$ 0,28
LESF 316	C	4,60 $\pm$ 0,05	4,95 $\pm$ 0,05	<b>5,63<math>\pm</math>0,06</b>	6,27 $\pm$ 0,07	7,59 $\pm$ 0,12	9,18 $\pm$ 0,11	12,07 $\pm$ 0,20	14,73 $\pm$ 0,24
	E	4,66 $\pm$ 0,12	5,07 $\pm$ 0,15	<b>5,02<math>\pm</math>0,16</b>	4,96 $\pm$ 0,16	4,95 $\pm$ 0,16	4,90 $\pm$ 0,15	4,81 $\pm$ 0,20	4,78 $\pm$ 0,22
LESF 317	C	4,60 $\pm$ 0,05	4,95 $\pm$ 0,05	<b>5,63<math>\pm</math>0,06</b>	6,27 $\pm$ 0,07	7,59 $\pm$ 0,12	9,18 $\pm$ 0,11	12,07 $\pm$ 0,20	14,73 $\pm$ 0,24
	E	4,65 $\pm$ 0,10	4,92 $\pm$ 0,11	<b>5,09<math>\pm</math>0,10</b>	4,89 $\pm$ 0,09	4,86 $\pm$ 0,11	4,85 $\pm$ 0,10	4,88 $\pm$ 0,12	4,86 $\pm$ 0,11
LESF 315	C	4,26 $\pm$ 0,06	4,71 $\pm$ 0,08	<b>5,14<math>\pm</math>0,08</b>	5,55 $\pm$ 0,08	6,75 $\pm$ 0,10	8,13 $\pm$ 0,13	10,60 $\pm$ 0,19	12,94 $\pm$ 0,24
	E	4,13 $\pm$ 0,04	4,40 $\pm$ 0,04	<b>4,26<math>\pm</math>0,05</b>	4,29 $\pm$ 0,05	4,16 $\pm$ 0,06	4,12 $\pm$ 0,04	4,01 $\pm$ 0,05	4,09 $\pm$ 0,05

Continuação

<i>Escovopsis</i>	Tratamento	Dias							
		0	1	2	3	5	7	10	14
LESF 037	C	4,05±0,07	4,56±0,10	<b>4,89±0,11</b>	5,54±0,14	6,54±0,15	7,94±0,16	9,57±0,27	11,37±0,50
	E	4,06±0,04	4,51±0,06	<b>4,51±0,07</b>	4,27±0,06	4,21±0,07	4,12±0,08	4,29±0,07	4,31±0,06
LESF 050	C	4,06±0,07	4,56±0,10	<b>4,89±0,11</b>	5,54±0,14	6,54±0,15	7,94±0,16	9,57±0,27	11,37±0,50
	E	4,06±0,07	4,49±0,06	<b>4,43±0,05</b>	4,35±0,06	4,35±0,06	4,31±0,05	4,31±0,08	4,32±0,07
LESF 325	C	4,05±0,07	4,56±0,10	<b>4,89±0,11</b>	5,54±0,14	6,54±0,15	7,94±0,16	9,57±0,27	11,37±0,50
	E	4,15±0,05	4,45±0,05	<b>4,39±0,04</b>	4,34±0,06	4,35±0,07	4,31±0,08	4,34±0,07	4,16±0,08
LESF 018	C	4,05±0,07	4,56±0,10	4,89±0,11	<b>5,54±0,14</b>	6,54±0,15	7,94±0,16	9,57±0,27	11,37±0,50
	E	4,16±0,08	4,58±0,09	4,55±0,10	<b>4,47±0,09</b>	4,47±0,10	4,41±0,09	4,34±0,06	4,42±0,08
LESF 319	C	4,26±0,06	4,71±0,08	<b>5,14±0,08</b>	5,55±0,08	6,75±0,10	8,13±0,13	10,60±0,19	12,94±0,24
	E	4,27±0,08	4,67±0,10	<b>4,64±0,08</b>	4,64±0,08	4,57±0,07	4,56±0,08	4,54±0,08	4,56±0,10
LESF 049	C	4,05±0,07	4,56±0,10	4,89±0,11	<b>5,54±0,14</b>	6,54±0,15	7,94±0,16	9,57±0,27	11,37±0,50
	E	4,08±0,03	4,48±0,04	4,74±0,05	<b>5,19±0,07</b>	5,51±0,14	5,66±0,09	5,46±0,12	5,44±0,15
LESF 046	C	4,26±0,06	4,71±0,08	<b>5,14±0,08</b>	5,55±0,08	6,75±0,10	8,13±0,13	10,60±0,19	12,94±0,24
	E	4,36±0,08	4,64±0,08	<b>4,57±0,08</b>	4,48±0,08	4,46±0,10	4,57±0,09	4,50±0,11	4,68±0,18
LESF 051	C	4,05±0,07	4,56±0,10	<b>4,89±0,11</b>	5,54±0,14	6,54±0,15	7,94±0,16	9,57±0,27	11,37±0,50
	E	4,03±0,07	4,40±0,11	<b>4,41±0,08</b>	4,40±0,07	4,29±0,09	4,13±0,16	4,32±0,10	4,45±0,13
LESF 318	C	4,26±0,06	4,71±0,08	<b>5,14±0,08</b>	5,55±0,08	6,75±0,10	8,13±0,13	10,60±0,19	12,94±0,24
	E	4,34±0,08	4,64±0,10	<b>4,48±0,10</b>	4,47±0,08	4,42±0,10	4,39±0,10	4,50±0,10	4,45±0,08
LESF858	C	4,77±0,05	5,23±0,06	<b>5,95±0,09</b>	6,53±0,14	7,80±0,16	8,83±0,12	10,94±0,27	13,43±0,33
	E	4,87±0,10	5,43±0,12	<b>5,25±0,15</b>	5,22±0,14	5,14±0,15	5,22±0,13	5,30±0,13	5,34±0,18
LESF 326	C	5,05±0,07	5,51±0,08	<b>6,10±0,14</b>	6,88±0,15	8,53±0,18	10,17±0,21	13,43±0,22	16,17±0,26
	E	5,05±0,07	5,60±0,08	<b>5,66±0,09</b>	5,72±0,09	5,56±0,08	5,53±0,09	5,50±0,09	5,59±0,09

Tabela A3. Área de crescimento micelial (média  $\pm$  erro padrão, em  $\text{cm}^2$ ) do fungo mutualista de *Trachymyrmex*, na ausência (tratamento C) e presença (tratamento E) de diferentes isolados de *Escovopsis*. Os valores destacados em negrito apresentaram diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) segundo o teste Mann–Whitney.

<i>Escovopsis</i>	Tratamento	Dias							
		0	1	2	3	5	7	10	14
LESF 021	C	3,32 $\pm$ 0,09	3,59 $\pm$ 0,12	3,92 $\pm$ 0,13	4,32 $\pm$ 0,18	<b>5,37<math>\pm</math>0,20</b>	6,26 $\pm$ 0,34	8,54 $\pm$ 0,47	11,19 $\pm$ 0,71
	E	3,38 $\pm$ 0,08	3,62 $\pm$ 0,11	3,97 $\pm$ 0,13	3,83 $\pm$ 0,22	<b>3,30<math>\pm</math>0,18</b>	3,02 $\pm$ 0,25	2,98 $\pm$ 0,22	2,81 $\pm$ 0,15
LESF 022	C	3,32 $\pm$ 0,09	3,59 $\pm$ 0,12	3,92 $\pm$ 0,13	4,32 $\pm$ 0,18	<b>5,37<math>\pm</math>0,20</b>	6,26 $\pm$ 0,34	8,54 $\pm$ 0,47	11,19 $\pm$ 0,71
	E	3,47 $\pm$ 0,13	3,73 $\pm$ 0,14	3,80 $\pm$ 0,15	3,89 $\pm$ 0,23	<b>3,51<math>\pm</math>0,24</b>	3,54 $\pm$ 0,24	3,29 $\pm$ 0,18	3,36 $\pm$ 0,12
LESF 044	C	2,70 $\pm$ 0,06	2,90 $\pm$ 0,07	<b>3,09<math>\pm</math>0,06</b>	3,41 $\pm$ 0,07	4,07 $\pm$ 0,08	4,98 $\pm$ 0,15	6,57 $\pm$ 0,20	9,28 $\pm$ 0,41
	E	2,70 $\pm$ 0,10	2,92 $\pm$ 0,11	<b>2,66<math>\pm</math>0,10</b>	2,63 $\pm$ 0,12	2,66 $\pm$ 0,11	2,65 $\pm$ 0,08	2,60 $\pm$ 0,10	2,64 $\pm$ 0,07
LESF 045	C	3,68 $\pm$ 0,10	<b>4,19<math>\pm</math>0,16</b>	4,43 $\pm$ 0,12	5,10 $\pm$ 0,14	5,58 $\pm$ 0,14	6,25 $\pm$ 0,12	9,08 $\pm$ 0,18	12,26 $\pm$ 0,26
	E	3,63 $\pm$ 0,13	<b>3,09<math>\pm</math>0,14</b>	3,04 $\pm$ 0,10	3,15 $\pm$ 0,15	3,21 $\pm$ 0,23	2,93 $\pm$ 0,16	2,88 $\pm$ 0,13	2,86 $\pm$ 0,13
LESF 052	C	3,32 $\pm$ 0,09	3,59 $\pm$ 0,12	3,92 $\pm$ 0,13	<b>4,32<math>\pm</math>0,18</b>	5,37 $\pm$ 0,20	6,26 $\pm$ 0,34	8,54 $\pm$ 0,47	11,19 $\pm$ 0,71
	E	3,51 $\pm$ 0,11	3,67 $\pm$ 0,11	3,85 $\pm$ 0,20	<b>3,59<math>\pm</math>0,18</b>	3,50 $\pm$ 0,22	3,53 $\pm$ 0,21	3,62 $\pm$ 0,27	3,37 $\pm$ 0,12
LESF 106	C	4,22 $\pm$ 0,19	<b>4,50<math>\pm</math>0,24</b>	4,92 $\pm$ 0,30	5,31 $\pm$ 0,32	6,34 $\pm$ 0,39	7,27 $\pm$ 0,51	8,65 $\pm$ 0,71	10,89 $\pm$ 0,88
	E	4,11 $\pm$ 0,07	<b>3,60<math>\pm</math>0,16</b>	3,23 $\pm$ 0,09	3,28 $\pm$ 0,10	3,17 $\pm$ 0,12	3,15 $\pm$ 0,12	2,90 $\pm$ 0,30	3,02 $\pm$ 0,19
LESF 135	C	3,37 $\pm$ 0,05	3,65 $\pm$ 0,07	<b>4,23<math>\pm</math>0,09</b>	4,60 $\pm$ 0,25	5,39 $\pm$ 0,15	6,43 $\pm$ 0,15	9,67 $\pm$ 0,19	10,98 $\pm$ 0,22
	E	3,38 $\pm$ 0,19	3,78 $\pm$ 0,22	<b>3,18<math>\pm</math>0,24</b>	2,86 $\pm$ 0,16	2,93 $\pm$ 0,17	2,84 $\pm$ 0,16	2,97 $\pm$ 0,19	2,94 $\pm$ 0,18
LESF 316	C	3,32 $\pm$ 0,09	3,59 $\pm$ 0,12	<b>3,92<math>\pm</math>0,13</b>	4,32 $\pm$ 0,18	5,37 $\pm$ 0,20	6,26 $\pm$ 0,34	8,54 $\pm$ 0,47	11,19 $\pm$ 0,71
	E	3,36 $\pm$ 0,10	3,24 $\pm$ 0,10	<b>3,09<math>\pm</math>0,12</b>	3,04 $\pm$ 0,13	2,98 $\pm$ 0,16	2,78 $\pm$ 0,16	2,77 $\pm$ 0,14	2,82 $\pm$ 0,14
LESF 317	C	3,37 $\pm$ 0,05	3,65 $\pm$ 0,07	<b>4,23<math>\pm</math>0,09</b>	4,60 $\pm$ 0,25	5,39 $\pm$ 0,15	6,43 $\pm$ 0,15	9,67 $\pm$ 0,19	10,98 $\pm$ 0,22
	E	3,26 $\pm$ 0,08	3,57 $\pm$ 0,10	<b>2,80<math>\pm</math>0,11</b>	2,79 $\pm$ 0,11	2,73 $\pm$ 0,11	2,71 $\pm$ 0,09	2,84 $\pm$ 0,10	2,76 $\pm$ 0,09
LESF858	C	2,70 $\pm$ 0,06	2,90 $\pm$ 0,07	<b>3,09<math>\pm</math>0,06</b>	3,41 $\pm$ 0,07	4,07 $\pm$ 0,08	4,98 $\pm$ 0,15	6,57 $\pm$ 0,20	9,28 $\pm$ 0,41
	E	2,60 $\pm$ 0,09	2,69 $\pm$ 0,07	<b>2,38<math>\pm</math>0,09</b>	2,26 $\pm$ 0,07	2,12 $\pm$ 0,07	2,14 $\pm$ 0,09	2,16 $\pm$ 0,06	2,07 $\pm$ 0,07
LESF 326	C	4,22 $\pm$ 0,19	4,50 $\pm$ 0,24	<b>4,92<math>\pm</math>0,30</b>	5,31 $\pm$ 0,32	6,34 $\pm$ 0,39	7,27 $\pm$ 0,51	8,65 $\pm$ 0,71	10,89 $\pm$ 0,88
	E	4,39 $\pm$ 0,13	4,68 $\pm$ 0,18	<b>3,36<math>\pm</math>0,11</b>	3,38 $\pm$ 0,10	3,45 $\pm$ 0,09	3,56 $\pm$ 0,16	3,63 $\pm$ 0,13	3,29 $\pm$ 0,07

Continuação

<i>Escovopsis</i>	Tratamento	Dias							
		0	1	2	3	5	7	10	14
LESF 037	C	3,68±0,10	4,19±0,16	<b>4,43±0,12</b>	5,10±0,14	5,58±0,14	6,25±0,12	9,08±0,18	12,26±0,26
	E	3,77±0,13	4,15±0,16	<b>3,47±0,10</b>	3,04±0,15	3,09±0,19	3,02±0,14	3,02±0,10	3,05±0,06
LESF 050	C	3,68±0,10	4,19±0,16	<b>4,43±0,12</b>	5,10±0,14	5,58±0,14	6,25±0,12	9,08±0,18	12,26±0,26
	E	3,73±0,05	4,00±0,10	<b>3,05±0,13</b>	2,94±0,12	2,92±0,11	2,84±0,13	3,03±0,16	3,03±0,13
LESF 325	C	2,70±0,06	2,90±0,07	<b>3,09±0,06</b>	3,41±0,07	4,07±0,08	4,98±0,15	6,57±0,20	9,28±0,41
	E	2,72±0,04	2,76±0,05	<b>2,65±0,06</b>	2,48±0,10	2,83±0,12	2,58±0,15	2,61±0,19	2,63±0,20
LESF 018	C	2,70±0,06	2,90±0,07	<b>3,09±0,06</b>	3,41±0,07	4,07±0,08	4,98±0,15	6,57±0,20	9,28±0,41
	E	2,68±0,05	2,92±0,04	<b>2,58±0,02</b>	2,46±0,04	2,55±0,06	2,48±0,05	2,43±0,03	2,46±0,06
LESF 319	C	2,70±0,06	<b>2,90±0,07</b>	3,09±0,06	3,41±0,07	4,07±0,08	4,98±0,15	6,57±0,20	9,28±0,41
	E	2,57±0,06	<b>2,59±0,06</b>	2,39±0,06	2,24±0,05	2,20±0,06	2,20±0,06	2,29±0,04	2,26±0,05
LESF 049	C	4,22±0,19	4,50±0,24	4,92±0,30	<b>5,31±0,32</b>	6,34±0,39	7,27±0,51	8,65±0,71	10,89±0,88
	E	4,14±0,12	4,32±0,15	4,36±0,26	<b>4,19±0,26</b>	4,08±0,34	3,51±0,31	3,80±0,26	2,92±0,27
LESF 046	C	2,70±0,06	2,90±0,07	<b>3,09±0,06</b>	3,41±0,07	4,07±0,08	4,98±0,15	6,57±0,20	9,28±0,41
	E	2,62±0,07	2,84±0,08	<b>2,37±0,08</b>	2,33±0,08	2,24±0,08	2,21±0,06	2,34±0,08	2,09±0,17
LESF 051	C	3,68±0,10	<b>4,19±0,16</b>	4,43±0,12	5,10±0,14	5,58±0,14	6,25±0,12	9,08±0,18	12,26±0,26
	E	3,68±0,14	<b>3,41±0,17</b>	3,66±0,18	3,03±0,09	2,92±0,11	2,73±0,11	2,77±0,12	2,81±0,11
LESF 318	C	4,22±0,19	4,50±0,24	<b>4,92±0,30</b>	5,31±0,32	6,34±0,39	7,27±0,51	8,65±0,71	10,89±0,88
	E	4,27±0,13	4,65±0,14	<b>3,58±0,16</b>	3,54±0,11	3,50±0,16	3,44±0,12	3,52±0,10	3,26±0,16
LESF 315	C	3,32±0,09	<b>3,59±0,12</b>	3,92±0,13	4,32±0,18	5,37±0,20	6,26±0,34	8,54±0,47	11,19±0,71
	E	3,22±0,07	<b>2,97±0,06</b>	2,57±0,03	2,55±0,04	2,45±0,07	2,46±0,07	2,50±0,07	2,53±0,08

Tabela A4. Área de crescimento micelial (média  $\pm$  erro padrão, em  $\text{cm}^2$ ) dos 21 isolados de *Escovopsis* na ausência (tratamento C) e na presença (tratamento E) do fungo mutualista (*Leucoagaricus gongylophorus*). Os valores destacados em negrito apresentaram diferenças significativa ( $P < 0,05$ ) segundo o teste Mann–Whitney.

<i>Escovopsis</i>	Tratamento	Dias							
		0	1	2	3	5	7	10	14
LESF 021	C	0,78 $\pm$ 0,01	<b>1,14 <math>\pm</math> 0,10</b>	5,28 $\pm$ 0,72	9,91 $\pm$ 1,33	22,94 $\pm$ 2,86	36,72 $\pm$ 2,49	45,06 $\pm$ 1,55	51,18 $\pm$ 0,0
	E	0,75 $\pm$ 0,01	<b>4,01 <math>\pm</math> 0,61</b>	11,51 $\pm$ 2,27	21,35 $\pm$ 4,46	49,15 $\pm$ 1,90	51,18 $\pm$ 0,0	51,18 $\pm$ 0,0	51,18 $\pm$ 0,0
LESF 022	C	0,74 $\pm$ 0,01	<b>5,71 <math>\pm</math> 0,54</b>	15,06 $\pm$ 0,76	18,25 $\pm$ 1,12	26,85 $\pm$ 2,62	34,58 $\pm$ 3,64	42,33 $\pm$ 3,93	43,59 $\pm$ 3,60
	E	0,73 $\pm$ 0,02	<b>9,48 <math>\pm</math> 0,83</b>	18,64 $\pm$ 0,73	22,14 $\pm$ 1,20	30,70 $\pm$ 4,03	33,95 $\pm$ 4,20	38,75 $\pm$ 4,11	40,84 $\pm$ 3,66
LESF 044	C	0,77 $\pm$ 0,01	<b>3,14 <math>\pm</math> 0,19</b>	7,32 $\pm$ 0,27	11,05 $\pm$ 0,64	21,96 $\pm$ 0,42	31,25 $\pm$ 0,83	44,22 $\pm$ 1,03	51,18 $\pm$ 0,0
	E	0,77 $\pm$ 0,01	<b>26,25 <math>\pm</math> 1,08</b>	51,18 $\pm$ 0,0	51,18 $\pm$ 0,0	51,18 $\pm$ 0,0	51,18 $\pm$ 0,0	51,18 $\pm$ 0,0	51,18 $\pm$ 0,0
LESF 045	C	0,76 $\pm$ 0,01	<b>11,76 <math>\pm</math> 1,29</b>	30,91 $\pm$ 1,22	41,01 $\pm$ 2,46	46,41 $\pm$ 2,97	46,46 $\pm$ 2,93	46,68 $\pm$ 2,79	46,87 $\pm$ 2,67
	E	0,75 $\pm$ 0,01	<b>33,03 <math>\pm</math> 1,57</b>	51,18 $\pm$ 0,0	51,18 $\pm$ 0,0	51,18 $\pm$ 0,0	51,18 $\pm$ 0,0	51,18 $\pm$ 0,0	51,18 $\pm$ 0,0
LESF 052	C	0,75 $\pm$ 0,01	<b>4,44 <math>\pm</math> 0,32</b>	8,58 $\pm$ 0,37	13,91 $\pm$ 0,77	17,95 $\pm$ 0,91	25,49 $\pm$ 1,77	35,23 $\pm$ 3,02	44,59 $\pm$ 3,98
	E	0,75 $\pm$ 0,01	<b>7,25 <math>\pm</math> 0,66</b>	18,50 $\pm$ 1,70	26,92 $\pm$ 2,51	33,36 $\pm$ 2,55	44,11 $\pm$ 2,08	51,18 $\pm$ 0,0	51,18 $\pm$ 0,0
LESF 106	C	0,75 $\pm$ 0,01	<b>11,14 <math>\pm</math> 0,86</b>	29,33 $\pm$ 1,96	43,31 $\pm$ 2,02	47,84 $\pm$ 1,22	48,92 $\pm$ 0,93	51,01 $\pm$ 0,16	51,18 $\pm$ 0,0
	E	0,74 $\pm$ 0,01	<b>24,11 <math>\pm</math> 1,20</b>	51,18 $\pm$ 0,0	51,18 $\pm$ 0,0	51,18 $\pm$ 0,0	51,18 $\pm$ 0,0	51,18 $\pm$ 0,0	51,18 $\pm$ 0,0
LESF 135	C	0,74 $\pm$ 0,01	1,54 $\pm$ 0,24	<b>8,37 <math>\pm</math> 0,47</b>	20,26 $\pm$ 2,14	23,18 $\pm$ 2,28	29,61 $\pm$ 3,57	40,64 $\pm$ 3,39	40,24 $\pm$ 1,42
	E	0,73 $\pm$ 0,01	2,29 $\pm$ 0,71	<b>31,45 <math>\pm</math> 1,44</b>	44,86 $\pm$ 2,64	45,70 $\pm$ 2,39	46,97 $\pm$ 1,77	49,64 $\pm$ 0,56	50,68 $\pm$ 0,22
LESF 316	C	0,77 $\pm$ 0,00	<b>11,35 <math>\pm</math> 1,34</b>	32,84 $\pm$ 3,44	36,34 $\pm$ 3,99	43,89 $\pm$ 1,60	48,09 $\pm$ 1,50	51,18 $\pm$ 0,0	51,18 $\pm$ 0,0
	E	0,77 $\pm$ 0,01	<b>32,63 <math>\pm</math> 1,64</b>	51,18 $\pm$ 0,0	51,18 $\pm$ 0,0	51,18 $\pm$ 0,0	51,18 $\pm$ 0,0	51,18 $\pm$ 0,0	51,18 $\pm$ 0,0
LESF 317	C	0,73 $\pm$ 0,00	<b>14,21 <math>\pm</math> 0,83</b>	23,51 $\pm$ 1,26	49,00 $\pm$ 0,56	51,18 $\pm$ 0,0	51,18 $\pm$ 0,0	51,18 $\pm$ 0,0	51,18 $\pm$ 0,0
	E	0,76 $\pm$ 0,01	<b>23,20 <math>\pm</math> 0,46</b>	49,77 $\pm$ 0,67	51,00 $\pm$ 0,17	51,18 $\pm$ 0,0	51,18 $\pm$ 0,0	51,18 $\pm$ 0,0	51,18 $\pm$ 0,0
LESF 858	C	0,77 $\pm$ 0,00	<b>5,91 <math>\pm</math> 0,40</b>	26,63 $\pm$ 1,44	41,16 $\pm$ 5,95	44,18 $\pm$ 2,33	45,16 $\pm$ 2,40	46,18 $\pm$ 2,12	49,38 $\pm$ 0,88
	E	0,77 $\pm$ 0,01	<b>9,18 <math>\pm</math> 1,09</b>	49,61 $\pm$ 0,60	50,98 $\pm$ 0,19	50,98 $\pm$ 0,18	51,18 $\pm$ 0,0	51,18 $\pm$ 0,0	51,18 $\pm$ 0,0
LESF 326	C	0,79 $\pm$ 0,01	16,00 $\pm$ 0,95	<b>27,08 <math>\pm</math> 2,20</b>	34,98 $\pm$ 2,22	39,82 $\pm$ 1,39	45,33 $\pm$ 1,35	49,90 $\pm$ 0,89	51,18 $\pm$ 0,0
	E	0,77 $\pm$ 0,01	19,02 $\pm$ 1,38	<b>48,72 <math>\pm</math> 1,72</b>	49,31 $\pm$ 1,47	49,34 $\pm$ 1,45	49,39 $\pm$ 1,43	49,79 $\pm$ 1,29	51,18 $\pm$ 0,0

## Continuação

<i>Escovopsis</i>	Tratamento	Dias							
		0	1	2	3	5	7	10	14
LESF 018	C	0,76 ± 0,01	<b>20,58 ± 0,66</b>	38,58 ± 0,62	48,10 ± 0,88	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00
	E	0,74 ± 0,01	<b>32,25 ± 0,85</b>	50,93 ± 0,23	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00
LESF 037	C	0,77 ± 0,01	<b>11,18 ± 0,29</b>	18,92 ± 0,71	21,61 ± 0,52	41,29 ± 1,83	47,24 ± 1,81	50,28 ± 0,67	50,77 ± 0,38
	E	0,75 ± 0,01	<b>30,15 ± 1,96</b>	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00
LESF 049	C	0,72 ± 0,00	<b>1,91 ± 0,07</b>	5,10 ± 0,87	6,07 ± 0,16	15,45 ± 0,35	21,29 ± 1,54	35,77 ± 1,37	48,49 ± 1,29
	E	0,72 ± 0,01	<b>5,36 ± 0,23</b>	7,49 ± 0,30	11,79 ± 0,76	22,49 ± 3,56	32,73 ± 5,89	40,00 ± 5,24	48,49 ± 1,29
LESF 050	C	0,76 ± 0,01	<b>16,43 ± 0,92</b>	21,61 ± 0,89	37,56 ± 2,68	43,44 ± 3,22	43,70 ± 3,13	46,57 ± 2,27	45,37 ± 3,62
	E	0,76 ± 0,01	<b>31,10 ± 0,99</b>	49,87 ± 0,81	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00
LESF 051	C	0,76 ± 0,01	<b>17,02 ± 1,51</b>	18,83 ± 1,49	24,35 ± 1,65	36,94 ± 1,50	47,19 ± 0,80	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00
	E	0,77 ± 0,01	<b>43,81 ± 0,56</b>	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00
LESF 325	C	0,75 ± 0,01	<b>14,22 ± 0,41</b>	25,58 ± 1,21	25,62 ± 1,15	26,92 ± 1,53	30,51 ± 2,01	38,92 ± 3,05	45,13 ± 3,58
	E	0,75 ± 0,01	<b>44,21 ± 1,23</b>	49,67 ± 0,70	49,85 ± 0,71	50,17 ± 0,64	50,31 ± 0,61	50,55 ± 0,40	50,85 ± 0,30
LESF 046	C	0,73 ± 0,00	<b>21,92 ± 0,75</b>	48,64 ± 0,35	50,60 ± 0,38	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00
	E	0,74 ± 0,01	<b>33,64 ± 2,10</b>	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00
LESF 315	C	0,76 ± 0,01	<b>7,42 ± 0,32</b>	29,95 ± 1,05	49,27 ± 1,21	50,69 ± 0,45	50,96 ± 0,20	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00
	E	0,77 ± 0,01	<b>38,71 ± 0,59</b>	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00
LESF 318	C	0,72 ± 0,01	<b>20,10 ± 0,90</b>	36,12 ± 2,01	43,29 ± 2,10	46,23 ± 2,26	48,47 ± 1,68	49,89 ± 0,86	50,99 ± 0,18
	E	0,72 ± 0,01	<b>32,32 ± 1,58</b>	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00
LESF 319	C	0,73 ± 0,01	<b>7,47 ± 0,62</b>	14,92 ± 0,54	25,98 ± 2,59	39,74 ± 2,35	45,62 ± 1,98	48,50 ± 1,11	50,46 ± 0,44
	E	0,73 ± 0,01	<b>23,09 ± 1,56</b>	50,75 ± 0,40	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00	51,18 ± 0,00

Tabela A5. Área de crescimento micelial (média  $\pm$  erro padrão, em cm<sup>2</sup>) dos 21 isolados de *Escovopsis* na ausência (tratamento C) e na presença (tratamento E) do fungo mutualista de *Trachymyrmex*. Os valores destacados em negrito apresentaram diferenças significativa ( $P < 0,05$ ) segundo o teste Mann–Whitney.

<i>Escovopsis</i>	Tratamento	Dias							
		0	1	2	3	5	7	10	14
LESF 021	C	0,79 $\pm$ 0,01	<b>7,73 <math>\pm</math> 1,23</b>	17,90 $\pm$ 3,62	9,91 $\pm$ 1,33	28,35 $\pm$ 4,46	48,28 $\pm$ 1,93	51,18 $\pm$ 0,00	51,18 $\pm$ 0,00
	E	0,77 $\pm$ 0,01	<b>15,77 <math>\pm</math> 2,45</b>	33,66 $\pm$ 4,55	42,95 $\pm$ 3,18	51,05 $\pm$ 0,11	51,18 $\pm$ 0,00	51,18 $\pm$ 0,00	51,18 $\pm$ 0,00
LESF 022	C	0,78 $\pm$ 0,01	<b>7,77 <math>\pm</math> 0,56</b>	14,28 $\pm$ 0,73	20,97 $\pm$ 1,02	30,16 $\pm$ 2,03	36,16 $\pm$ 2,03	42,76 $\pm$ 3,02	46,75 $\pm$ 1,93
	E	0,76 $\pm$ 0,01	<b>11,69 <math>\pm</math> 1,09</b>	21,55 $\pm$ 2,02	24,96 $\pm$ 2,65	34,07 $\pm$ 3,91	37,05 $\pm$ 3,34	42,39 $\pm$ 2,37	47,70 $\pm$ 0,99
LESF 044	C	0,80 $\pm$ 0,01	<b>3,18 <math>\pm</math> 0,13</b>	6,23 $\pm$ 0,41	9,94 $\pm$ 0,61	18,34 $\pm$ 0,60	26,95 $\pm$ 1,05	39,32 $\pm$ 2,32	48,12 $\pm$ 2,70
	E	0,80 $\pm$ 0,01	<b>15,11 <math>\pm</math> 1,53</b>	42,01 $\pm$ 2,95	44,38 $\pm$ 2,89	45,46 $\pm$ 2,56	48,35 $\pm$ 1,51	48,45 $\pm$ 1,45	51,18 $\pm$ 0,00
LESF 045	C	0,79 $\pm$ 0,01	<b>13,90 <math>\pm</math> 0,54</b>	33,12 $\pm$ 0,94	36,30 $\pm$ 1,17	43,80 $\pm$ 2,03	47,22 $\pm$ 2,40	48,33 $\pm$ 2,43	48,56 $\pm$ 2,45
	E	0,79 $\pm$ 0,01	51,18 $\pm$ 0,00	51,18 $\pm$ 0,00	51,18 $\pm$ 0,00	51,18 $\pm$ 0,00	51,18 $\pm$ 0,00	51,18 $\pm$ 0,00	51,18 $\pm$ 0,00
LESF 052	C	0,78 $\pm$ 0,01	<b>5,86 <math>\pm</math> 0,33</b>	8,45 $\pm$ 0,34	12,89 $\pm$ 0,62	24,08 $\pm$ 0,58	31,91 $\pm$ 0,93	43,57 $\pm$ 1,28	50,86 $\pm$ 0,30
	E	0,75 $\pm$ 0,01	<b>22,17 <math>\pm</math> 2,24</b>	29,35 $\pm$ 3,41	31,51 $\pm$ 3,36	36,59 $\pm$ 3,55	43,79 $\pm$ 2,13	48,97 $\pm$ 0,69	51,07 $\pm$ 0,10
LESF 106	C	0,80 $\pm$ 0,01	<b>15,91 <math>\pm</math> 2,83</b>	26,03 $\pm$ 3,85	29,67 $\pm$ 3,52	44,04 $\pm$ 2,29	49,25 $\pm$ 0,53	51,03 $\pm$ 0,14	51,18 $\pm$ 0,00
	E	0,80 $\pm$ 0,01	<b>34,77 <math>\pm</math> 2,92</b>	50,60 $\pm$ 0,37	51,18 $\pm$ 0,00	51,18 $\pm$ 0,00	51,18 $\pm$ 0,00	51,18 $\pm$ 0,00	51,18 $\pm$ 0,00
LESF 135	C	0,77 $\pm$ 0,01	<b>3,16 <math>\pm</math> 0,19</b>	12,74 $\pm$ 0,84	21,29 $\pm$ 1,21	23,82 $\pm$ 1,19	24,50 $\pm$ 1,18	24,67 $\pm$ 1,19	26,13 $\pm$ 1,64
	E	0,78 $\pm$ 0,01	<b>8,59 <math>\pm</math> 1,81</b>	41,70 $\pm$ 2,67	50,12 $\pm$ 0,98	50,88 $\pm$ 0,28	50,90 $\pm$ 0,26	50,94 $\pm$ 0,22	50,96 $\pm$ 0,20
LESF 316	C	0,79 $\pm$ 0,01	<b>17,97 <math>\pm</math> 0,65</b>	35,03 $\pm$ 1,18	39,30 $\pm$ 1,15	45,32 $\pm$ 2,18	47,13 $\pm$ 2,00	48,62 $\pm$ 1,31	49,33 $\pm$ 1,15
	E	0,79 $\pm$ 0,01	<b>51,18 <math>\pm</math> 0,0</b>	51,18 $\pm$ 0,00	51,18 $\pm$ 0,00	51,18 $\pm$ 0,00	51,18 $\pm$ 0,00	51,18 $\pm$ 0,00	51,18 $\pm$ 0,00
LESF 317	C	0,75 $\pm$ 0,01	<b>6,09 <math>\pm</math> 0,28</b>	16,71 $\pm$ 1,16	38,39 $\pm$ 1,16	47,16 $\pm$ 1,88	47,57 $\pm$ 1,90	48,97 $\pm$ 1,17	50,54 $\pm$ 0,41
	E	0,75 $\pm$ 0,01	<b>17,62 <math>\pm</math> 0,25</b>	49,96 $\pm$ 0,38	50,41 $\pm$ 0,44	50,58 $\pm$ 0,38	51,03 $\pm$ 0,10	51,16 $\pm$ 0,02	51,16 $\pm$ 0,01
LESF 858	C	0,78 $\pm$ 0,00	<b>12,01 <math>\pm</math> 0,98</b>	24,50 $\pm$ 1,72	41,93 $\pm$ 0,96	49,25 $\pm$ 0,94	50,05 $\pm$ 0,85	50,36 $\pm$ 0,76	50,77 $\pm$ 0,38
	E	0,77 $\pm$ 0,01	<b>24,15 <math>\pm</math> 0,75</b>	51,18 $\pm$ 0,00	51,18 $\pm$ 0,00	51,18 $\pm$ 0,00	51,18 $\pm$ 0,00	51,18 $\pm$ 0,00	51,00 $\pm$ 0,17
LESF 326	C	0,71 $\pm$ 0,01	<b>10,25 <math>\pm</math> 1,31</b>	21,58 $\pm$ 3,38	25,38 $\pm$ 2,36	28,31 $\pm$ 2,62	32,92 $\pm$ 2,47	39,42 $\pm$ 2,54	45,34 $\pm$ 2,17
	E	0,71 $\pm$ 0,01	<b>18,61 <math>\pm</math> 2,09</b>	50,60 $\pm$ 0,27	50,92 $\pm$ 0,16	51,04 $\pm$ 0,12	51,05 $\pm$ 0,11	51,06 $\pm$ 0,10	51,18 $\pm$ 0,00



Figura A1. Crescimento micelial relativo de *Leucoagaricus gongylophorus* frente a 21 isolados de *Escovopsis*, após 14 dias de confronto. As linhas verticais de cada cor indicam do lado esquerdo *Escovopsis* isolados de formigas cortadeiras e do lado direito *Escovopsis* isolados de formigas não-cortadeiras de folhas. No eixo "x": \* isolados provenientes de formigas cortadeiras; números representam os códigos de cada isolado.

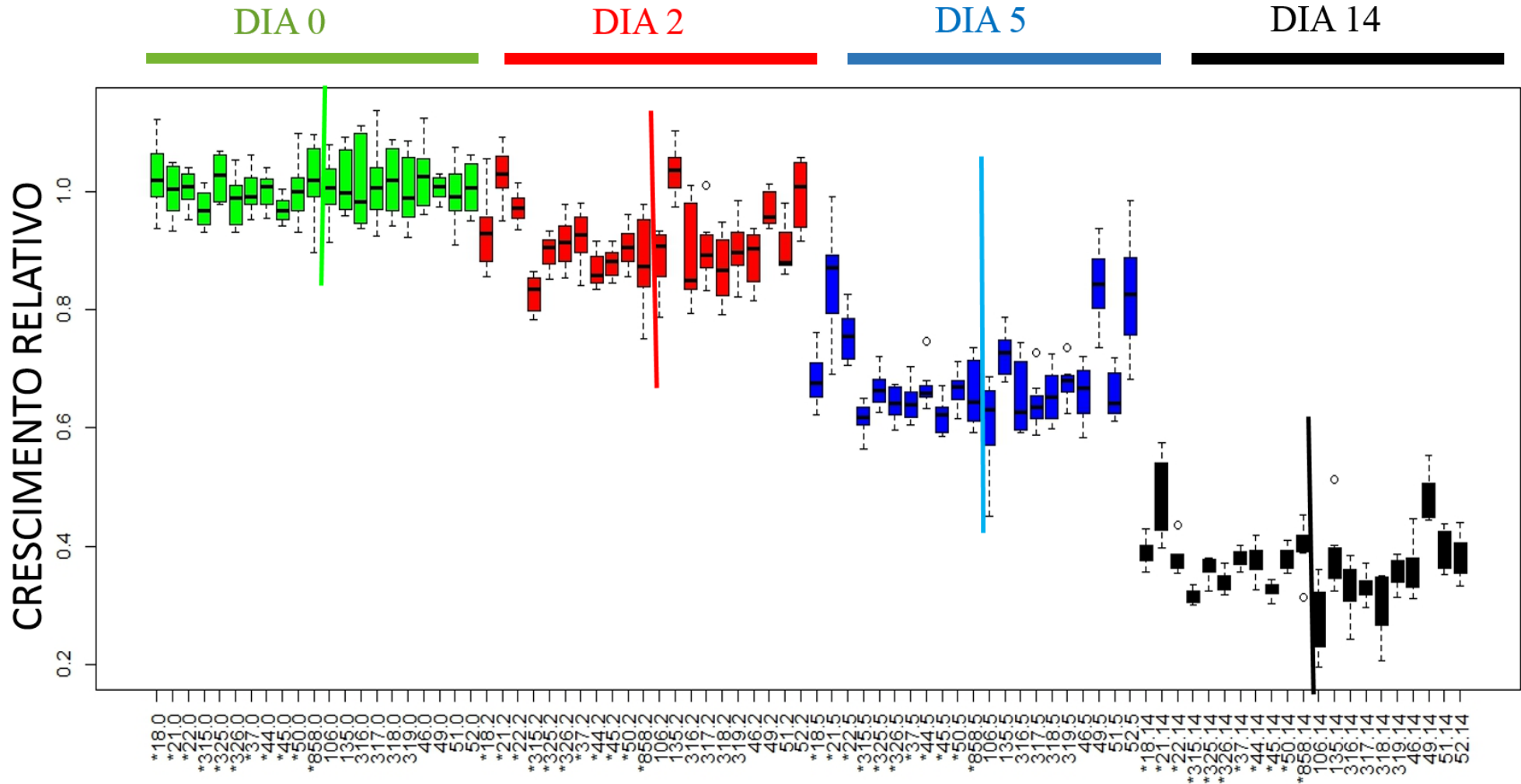


Figura A2. Crescimento micelial relativo do fungo mutualista de *Trachymyrmex* sp. frente a 21 isolados de *Escovopsis*, após 14 dias de confronto. As linhas verticais de cada cor indicam do lado esquerdo *Escovopsis* isolados de formigas cortadeiras e do lado direito *Escovopsis* isolados de formigas não-cortadeiras de folhas. No eixo “x”: \* isolados provenientes de formigas cortadeiras; números representam os códigos de cada isolado.

