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

BRUNA CRISTINA CUSTODIO

NUTRIÇÃO E MECANISMOS DO PARASITISMO DE FUNGOS DO
GÊNERO *Escovopsis*

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

Março – 2019

BRUNA CRISTINA CUSTODIO

**NUTRIÇÃO E MECANISMOS DO PARASITISMO DE FUNGOS DO
GÊNERO *Escovopsis***

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

Orientador: Prof. Dr. André Rodrigues

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Priscila Cintra Socolowski

Março – 2019

C987n Custodio, Bruna Cristina
Nutrição e mecanismos do parasitismo de fungos do gênero
Escovopsis / Bruna Cristina Custodio. -- Rio Claro, 2019
50 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: Andre Rodrigues
Coorientadora: Priscila Cintra Socolowski

1. Nutrição Microbiana. 2. Parasita-Hospedeiro. 3. Infectividade. 4.
Resistência. 5. Fungos Filamentosos. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

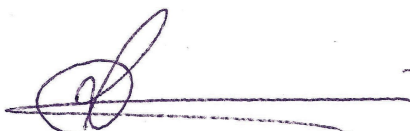
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Nutrição e mecanismos do parasitismo de fungos do gênero *Escovopsis*

AUTORA: BRUNA CRISTINA CUSTODIO

ORIENTADOR: ANDRÉ RODRIGUES

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



Prof. Dr. ANDRÉ RODRIGUES

Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro



Prof. Dr. MAURICIO BACCI JUNIOR

CEIS / IB Rio Claro



Prof. Dr. DARTANHÃ JOSÉ SOARES

x / Embrapa Algodão

Rio Claro, 25 de fevereiro de 2019

*Dedico este trabalho à minha mãe, minha melhor
amiga, que me apoiou e auxiliou em todos os momentos
de minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente aos meus pais, que dedicaram suas vidas para me proporcionarem boas oportunidades. Minha mãe, esteve presente em cada decisão importante em minha vida, me aconselhando e estimulando a nunca desistir dos meus sonhos. Meu pai, meu exemplo de dedicação, esforço e humildade, que sempre me ensinou a conquistar meus objetivos e não permitir que obstáculos me desviem do caminho.

Agradeço ao meu namorado Felipe, meu grande companheiro que está sempre ao meu lado e me apoia em todos os momentos difíceis.

Agradeço ao Prof. Dr. André Rodrigues, que teve um papel muito importante no meu enriquecimento profissional. Aos colegas do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF), por todos os momentos compartilhados.

Agradeço em especial aos queridos amigos Aryel e Maryana, que me ajudaram nos momentos de trabalho diretamente com as formigas, sem vocês eu não teria conseguido.

Agradeço ao Prof. Dr. Henrique Ferreira e seus alunos Kenny, Caio e Guilherme, por auxiliarem nos ensaios de microscopia.

Agradeço também ao Departamento de Bioquímica e Microbiologia, pelo suporte técnico concedido para o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão inicial da bolsa, no período de março a julho de 2017 (Processo CNPq n. 130365/2017-3). Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de mestrado (Processo FAPESP n. 2017/08931-4), no período de agosto de 2017 a fevereiro de 2019; e pelo auxílio financeiro concedido ao laboratório (Processo FAPESP n. 2017/12689-4) para o desenvolvimento desse trabalho.

RESUMO

Em interações parasita-hospedeiro é esperado que o parasita obtenha a maior parte de sua nutrição a partir do hospedeiro. Colônias de formigas atíneas podem ser utilizadas como modelo para estudar diferentes mecanismos envolvidos em interações de parasitismo. Esses insetos cultivam um fungo basidiomiceto, o qual é alvo de micoparasitas do gênero *Escovopsis*. É sabido que o jardim de fungo, local onde as formigas praticam a fungicultura, apresenta uma alta concentração de fontes de carbono simples, de fácil assimilação. No presente estudo investigamos se o parasita se beneficia desses recursos nutricionais e se esses influenciam na infectividade frente ao hospedeiro. Para tanto, realizamos ensaios para avaliar o desenvolvimento de seis isolados de *Escovopsis* em diferentes fontes de carbono tanto na ausência, quanto na presença do fungo cultivado pelas formigas. Além disso, observamos a interação *Escovopsis* - fungo cultivado com microscopia de epifluorescência, a fim de verificar em que momento é iniciada a degradação do micélio do hospedeiro. No geral, o parasita apresentou esporulação abaixo de 59 % quando somente uma fonte simples de carbono estava disponível. Quando interagindo com seus hospedeiros em meio com apenas uma ou duas fontes de carbono, três dentre seis isolados do parasita foram menos infectivos do que o esperado. Observamos que a adição de uma fonte nutricional não aumenta a infectividade do parasita, mas influencia seu crescimento, mesmo na presença do hospedeiro (suposta fonte primária de nutrição). Nossos resultados sugerem que, além do micélio do hospedeiro, *Escovopsis* possa utilizar fontes adicionais de nutrientes presentes no jardim de fungo para seu desenvolvimento. Os ensaios com microscopia de epifluorescência evidenciaram que a degradação micelial do hospedeiro é iniciada antes do estabelecimento de contato físico entre as hifas, sugerindo a ação de metabólitos produzidos por *Escovopsis*.

Palavras chave: Nutrição microbiana. Parasita-Hospedeiro. Infectividade. Resistência. Fungos Filamentosos.

ABSTRACT

In parasite-host interactions it is expected from the former to rely mostly on nutrients derived from the host. Attine ant colonies may be considered as a model system for studying different mechanisms of parasitism. These insects cultivate a basidiomycetous fungus, which is threatened by mycoparasites in the genus *Escovopsis*. It is known that the fungus garden, the substrate where the ants cultivate the fungal cultivar, has a high concentration of simple carbon sources. Here we investigated whether the parasite benefits from these nutritional resources and whether these nutrients influence host infectivity. We performed bioassays to evaluate the development of six *Escovopsis* isolates in different carbon sources in the absence as well as in the presence of the ant fungal cultivar. In addition, we observed the interaction *Escovopsis* – fungal cultivar with epifluorescence microscopy, to assess when the degradation of the host mycelium begins. Overall, the parasite showed sporulation below 59 % when only one carbon source was available. When interacting with their hosts in culture medium with one or two carbon sources, three out of six *Escovopsis* isolates were less infective than expected, probably due to nutritional stress. We observed that the parasite's infectivity did not increase with the addition of one nutritional source, however, influenced its growth, even in the presence of the host (the expected primary source of nutrition). Our results suggest that in addition to the host mycelium, *Escovopsis* may use additional sources of nutrients present in the fungus garden for its development. Analysis with epifluorescence microscopy evidenced that the mycelial degradation of the host initiates before the establishment of physical contact between hyphae, suggesting that metabolites produced by *Escovopsis* are involved.

Key words: Microbial nutrition. Parasite-Host. Infectivity. Resistance. Filamentous fungi.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	MATERIAL E MÉTODOS	12
2.1	Origem do material biológico.....	12
2.2	Desenvolvimento de <i>Escovopsis</i> em diferentes fontes de carbono.....	13
2.3	Bioensaios de co-cultivo na ausência e presença de recursos adicionais de nutrição.....	16
2.4	Interação física com Microscopia de Epifluorescência	18
3	RESULTADOS	20
3.1	Baixo desenvolvimento de <i>Escovopsis</i> em fontes simples de carbono	20
3.2	Inibição dos fungos mutualistas.....	25
3.3	Efeito das possíveis fontes de nutrição no crescimento de <i>Escovopsis</i>	27
3.4	Início da degradação do hospedeiro por <i>Escovopsis</i>	30
4	DISCUSSÃO	34
5	CONSIDERAÇÕES	41
	REFERÊNCIAS	42
	APÊNDICE	46

1 INTRODUÇÃO

Interações simbióticas são inerentes a evolução de todos os seres vivos. O parasitismo é uma simbiose na qual um organismo, o parasita, encontra seu nicho ecológico em outro organismo, o hospedeiro, podendo utilizar este como habitat e fonte de nutrição (ARAÚJO et al., 2003; PATTERSON; RUCKSTUHL, 2013). São considerados parasitas todos os organismos que dependem de outro organismo, ao menos durante parte de seu ciclo de vida (ARAÚJO et al., 2003). Vários processos evolutivos influenciam o dano que um parasita causa a seu hospedeiro. Nesse sistema, os parasitas enfrentam uma troca entre explorar com prudência os recursos de seu hospedeiro ou rápida exploração do mesmo (FRANK, 1996). No primeiro caso, o parasita garante recursos sustentáveis enquanto o hospedeiro se mantenha saudável por um tempo prolongado. No segundo caso, por sua vez, o parasita aumenta suas taxas de reprodução, mas reduz as oportunidades de obtenção de recursos (FRANK, 1996). Um exemplo complexo de tal parasitismo ocorre nas colônias das formigas cultivadoras de fungos (as atíneas).

As formigas atíneas (subfamília Myrmicinae, tribo Attini, subtribo Attina) são conhecidas por cultivarem fungos como alimento. Esse grupo compreende 17 gêneros e aproximadamente 250 espécies de formigas (LI et al., 2018). A associação desses insetos com fungos é resultante de cerca de 55 a 65 milhões de anos de coevolução (SCHULTZ; BRADY, 2008; SOSA-CALVO et al., 2018). As atíneas consideradas basais praticam uma fungicultura de origem mais antiga (SCHULTZ; BRADY, 2008) e utilizam substratos como sementes, material vegetal seco, carcaça de insetos e outros detritos orgânicos para o cultivo de seu parceiro fúngico (LI et al., 2018). Já as atíneas derivadas utilizam substratos vegetais e são subdivididas em formigas cortadeiras e não-cortadeiras de folhas. As formigas dos gêneros *Trachymyrmex* e *Sericomyrmex* forrageiam material vegetal seco para cultivo do seu parceiro fúngico; já as dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta* utilizam folhas e flores frescas (formigas cortadeiras; SCHULTZ, BRADY, 2008). As atíneas derivadas co-evoluíram com dois grupos (ou clados filogenéticos) de fungos basidiomicetos da ordem Agaricales (Agaricaceae), incluindo *Leucoagaricus gongylophorus* e *Leucocoprinus* sp. (MUELLER et al., 2017). Acredita-se que esses fungos perderam a capacidade de viverem fora das colônias das atíneas (i.e., livres na natureza), sendo domesticados pelas formigas e apresentam adaptações ao mutualismo (CHAPELA et al., 1994; SCHULTZ; BRADY, 2008; MUELLER et al., 2017). Um exemplo é a presença dos gongilídios, estruturas localizadas nas extremidades das hifas, e

que fornecem aminoácidos essenciais e enzimas degradadoras de substrato vegetal às formigas (DE FINE LITCH; BOOMSMA; TUNLID, 2014), além de serem ricos em lipídeos e carboidratos (QUINLAN; CHERRETT, 1979).

As formigas atíneas cultivam seus parceiros fúngicos no interior de suas colônias em uma estrutura conhecida como jardim de fungo. Esse substrato contém altas concentrações de fontes simples de carbono, resultantes da degradação do material vegetal pelo fungo cultivado (glicose, xilose, arabinose, ácido galacturônico, celobiose, maltose e sacarose; SIQUEIRA et al., 1998), além de polióis que são secretados pelo mesmo (SOMERA et al., 2015). A glicose, por exemplo, é produzida durante a degradação dos polissacarídeos vegetais, pois sua concentração no jardim das formigas cortadeiras é maior do que aquela presente nas folhas utilizadas como substrato, bem como também é maior do que a concentração desse açúcar nas hifas do fungo mutualista (SILVA et al., 2003). É sabido que o micélio do fungo cultivado provê apenas 9,0 % da energia necessária para as operárias (BASS; CHERRETT, 1995). O restante provavelmente é provido pela seiva do substrato vegetal e pelas fontes simples de carbono disponíveis no jardim de fungo (SILVA et al., 2003), evidenciando a importância dos recursos nutricionais para esses insetos.

A matriz do jardim também abriga um microbioma repleto de leveduras (MENDES et al., 2012), bactérias (KELLNER et al., 2015; KHADEMPOUR et al., 2018) e fungos filamentosos (REIS et al., 2015; PEREIRA et al., 2016). Incluem-se nesse microbioma fungos filamentosos do gênero *Escovopsis*, micoparasitas que infectam o fungo cultivado pelas formigas (CURRIE; MUELLER; MALLOCH, 1999). *Escovopsis* é encontrado exclusivamente associado a esse ambiente e apresenta uma grande diversidade morfológica e filogenética (MEIRELLES et al., 2015; BIRNBAUM; GERARDO, 2016). Infecções por esse parasita causam um impacto negativo no crescimento das colônias, pois reduzem a biomassa do jardim de fungo e, conseqüentemente, o número de operárias e crias (CURRIE, 2001). Devido a tal impacto, as colônias eventualmente são levadas à morte (CURRIE, 2001).

Reynolds e Currie (2004) sugeriram que *Escovopsis* atua como um parasita necrotrófico, secretando metabólitos ativos que destroem as hifas do fungo mutualista, com posterior nutrição dos produtos resultantes dessa quebra. Já Marfetán, Romero e Folgarait (2015) sugeriram que o contato entre as hifas do parasita e do hospedeiro é necessário para ocorrer a degradação do fungo mutualista. Segundo esses autores, *Escovopsis* é um parasita biotrófico destrutivo que se nutre das células vivas do hospedeiro, causando a morte das mesmas. Varanda-Haifig e colaboradores (2017), por sua vez, mostraram que extratos do

caldo de cultivo de *Escovopsis* inibem o crescimento micelial do fungo mutualista. Estudos recentes identificaram os metabólitos secundários produzidos por *Escovopsis weberi* (shearininas, policetídeos, emodina e cicloantropsona) e mostraram que alguns desses compostos inibem o desenvolvimento *in vitro* do fungo cultivado pelas atíneas derivadas (DHODARY et al., 2018), além de reduzirem os comportamentos de defesa das operárias (HEINE et al., 2018).

O sequenciamento do genoma de *E. weberi* evidenciou que esse é reduzido, quando comparado com genomas de outros fungos da família Hypocreaceae (MAN et al., 2016). O genoma do parasita é empobrecido em genes que codificam enzimas ativas em carboidratos, fato consistente com a dependência de um hospedeiro que apresente essas funções. Portanto, *Escovopsis* se depara com limitações para se nutrir diretamente de polímeros vegetais complexos e, ao mesmo tempo, vive naturalmente em um ambiente rico em fontes simples de carbono disponíveis, além do micélio do fungo hospedeiro. Man e colaboradores (2016) demonstraram que uma linhagem de *E. weberi* assimila diferentes fontes de carbono, incluindo aquelas presentes no jardim. Entretanto, nenhum estudo avaliou em detalhe o desenvolvimento de *Escovopsis* nos derivados da degradação da biomassa vegetal, bem como se a presença dessas fontes de carbono pode afetar a interação de *Escovopsis* com seu hospedeiro. Para investigar tal lacuna, realizamos ensaios *in vitro* para avaliar o desenvolvimento de *Escovopsis* com disponibilização de diferentes fontes simples de carbono que estão presentes no jardim de fungo, na presença e na ausência de seu hospedeiro.

Adicionalmente, apesar de todas as informações já obtidas a respeito do mecanismo de ação de *Escovopsis*, não há na literatura uma visualização clara do momento em que é iniciada a degradação do fungo mutualista. A fim de avançar nessa fronteira do conhecimento, utilizamos microscopia de epifluorescência para demonstrar a interação parasita-hospedeiro. Com essa técnica foi possível determinar em que momento a degradação do hospedeiro é, de fato, iniciada.

Diversos estudos na literatura consideram *Escovopsis* como micoparasitas altamente virulentos e especializados na infecção do fungo cultivado pelas formigas atíneas. No entanto, estudos mais recentes demonstraram que os comportamentos de limpeza das formigas, somados à produção de antibióticos por outros simbiontes do sistema, são suficientes para conter a infecção de *Escovopsis*. Ainda assim, é comum encontrar conídios desse parasita em colônias saudáveis, fato que nos leva a questionar se é possível que *Escovopsis* tenha um papel ecológico distinto de ser um parasita destrutivo, como proposto inicialmente. Aqui,

apresentamos um estudo pioneiro que visou explorar outras vertentes da interação parasita-hospedeiro que ocorre nas colônias das formigas atíneas, ou seja, a de entender a nutrição de *Escovopsis* para trazer novas evidências sobre o papel ecológico desse fungo no sistema.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Origem do material biológico

Utilizamos seis isolados de *Escovopsis* provenientes de colônias de diferentes espécies de formigas atíneas derivadas (Tabela 1). Tais isolados foram obtidos em estudos anteriores conduzidos pelo nosso grupo de pesquisa (projeto FAPESP n. 2014/24298-1 e MEIRELLES et al., 2015), os quais constituem espécies ainda não descritas, tendo sido selecionados de modo a representar uma ampla variabilidade filogenética e diferentes regiões geográficas (Tabela 1).

Os fungos estão depositados no acervo do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF), associado à Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP), em suspensão de micélio e conídios, em glicerol 10 %, a - 80 °C. Para a reativação dos isolados, a suspensão de micélio e conídios de *Escovopsis* foi transferida para placas de Petri contendo meio Batata Dextrose Agar (BDA, Acumedia) e incubadas a 25 °C, no escuro, durante sete dias. Além de *Escovopsis*, foram utilizados quatro isolados de fungos mutualistas, mantidos no acervo do LESF em transferência contínua em placas de Petri contendo o meio descrito em Pagnocca et al. (1990), suplementado com 50 g L⁻¹ de extrato de aveia (Tabela 1). Tais isolados são mantidos com essa técnica pois métodos de preservação a médio (Castellani) e longo prazo (ultracongelamento e liofilização) são inviáveis para os fungos mutualistas, pois causam a perda da viabilidade. A presença de gongilídios é uma característica utilizada como controle para assegurar o vigor das colônias. Para os experimentos, esses fungos foram reativados em meio BDA e incubados a 25 °C, no escuro, durante 21 dias.

Um estudo demonstrou o compartilhamento de *Escovopsis* entre colônias de formigas cortadeiras e não-cortadeiras de folhas, sugerindo uma falta de especialização do parasita nesses grupos (MEIRELLES et al., 2015). Portanto, esse trabalho sugere que os mesmos isolados de *Escovopsis* são capazes de infectar hospedeiros pertencentes a ambos os clados cultivados por formigas atíneas derivadas (clados A e B, MUELLER et al., 2017). Para avaliar como os recursos adicionais de nutrição presentes no jardim de fungo influenciam na interação parasita-hospedeiro, selecionamos isolados de *Escovopsis* associados a gêneros de formigas cortadeiras e não-cortadeiras. Além disso, os fungos hospedeiros selecionados são representantes de ambos os clados cultivados pelas formigas atíneas derivadas (clados A e B,

Tabela 1), de modo a obter combinações parasita-hospedeiro que poderiam ocorrer na natureza.

Tabela 1. Origem dos fungos utilizados no presente estudo.

Código ¹	Fungo	Clado ²	Formiga	Cidade/Estado
LESF 017	<i>Escovopsis</i> sp1	I	<i>Atta capiguara</i>	Botucatu/SP
LESF 023	<i>Escovopsis</i> sp2	I	<i>Atta cephalotes</i>	Alta Floresta/MT
LESF 043	<i>Escovopsis</i> sp1	I	<i>Acromyrmex heyeri</i>	Chuvisca/RS
LESF 046	<i>Escovopsis</i> sp3	I	<i>Trachymyrmex</i> sp.	Rio Claro/SP
LESF 048	<i>Escovopsis</i> sp4	V	<i>Trachymyrmex</i> sp.	Uberlândia/MG
LESF 049	<i>Escovopsis</i> sp5	VII	<i>Trachymyrmex</i> sp.	Uberlândia/MG
FF2006	<i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	A	<i>Atta sexdens</i>	Rio Claro/SP
JSP07	<i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	A	<i>Atta sexdens</i>	Botucatu/SP
Trachy	<i>Leucocoprinus</i> sp.	B	<i>Trachymyrmex tucumanus</i>	Rio Claro/SP
Trachy2	<i>Leucocoprinus</i> sp.	B	<i>Trachymyrmex tucumanus</i>	Rio Claro/SP

Fonte: autora

¹ LESF: Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (UNESP, Rio Claro, SP).

² Clado filogenético do qual cada isolado pertence, segundo Meirelles et al. (2015) para *Escovopsis* e Mueller et al. (2017) para os fungos mutualistas.

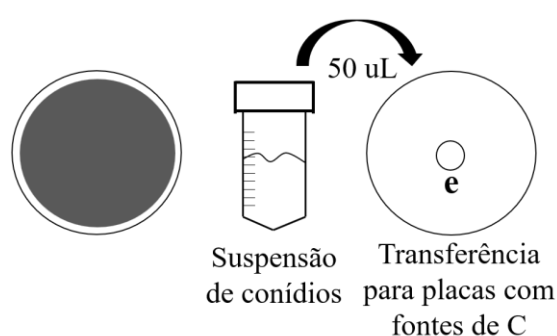
2.2 Desenvolvimento de *Escovopsis* em diferentes fontes de carbono

Para avaliar o desenvolvimento de diferentes isolados de *Escovopsis* na presença dos derivados da degradação dos polímeros vegetais, presentes no jardim de fungo, bem como avaliar se há preferência por algum deles, realizamos o cultivo dos fungos na presença de sete dessas fontes simples de carbono. Para tanto, preparamos suspensões de conídios a partir de culturas de *Escovopsis* crescidas em meio BDA, a 25 °C, durante sete dias, no escuro. A superfície da colônia foi raspada e os conídios e hifas foram suspendidos em 10 mL de água deionizada esterilizada. A suspensão foi agitada durante 2 minutos e filtrada segundo o método de Newmeyer (1990), para separar os conídios dos fragmentos de hifas presentes na suspensão. Após a filtração, a suspensão foi diluída até obter a quantidade de 2×10^4 conídios mL⁻¹, determinada em câmara de Neubauer. Em seguida, adicionou-se ágar a 0,2 % na suspensão e 50 µL (1×10^3 conídios mL⁻¹) foram semeados no centro de placas de Petri contendo 20 mL do seguinte meio de cultivo: *Yeast Nitrogen Base* (YNB, 6,7 g L⁻¹ Difco), ágar (15 g L⁻¹) e 20 g L⁻¹ de uma fonte de carbono (Figura 1). As diferentes fontes de carbono avaliadas nesse bioensaio foram os principais derivados da degradação dos polímeros vegetais, que estão presentes no jardim de fungo, a saber: glicose, xilose, arabinose, ácido galacturônico, celobiose, maltose e sacarose (SIQUEIRA et al., 1998). Após incubação dessas placas a 25 °C, no escuro, o crescimento radial da colônia de *Escovopsis* foi registrado com imagens digitalizadas em *scanner*, em dias alternados, durante 28 dias. O crescimento micelial e a área final de esporulação (dia 28) foram mensuradas (em cm²), no *software*

ImageJ v. 1.6.0_24 (ABRAMOFF; MAGALHÃES; RAM, 2004). Também foram registrados os dias em que ocorreram a germinação e a esporulação em cada placa, bem como o dia em que a colônia atingiu a área final de crescimento (i.e., por ter atingido a área total disponível na placa de Petri (56,6 cm²) ou por simplesmente parar o crescimento). Além dos meios acrescidos com cada uma das fontes simples de carbono, foram realizados o controle positivo (meio BDA) e controle negativo (YNB e ágar, sem fonte de carbono), nos quais os isolados de *Escovopsis* foram semeados pelo mesmo método.

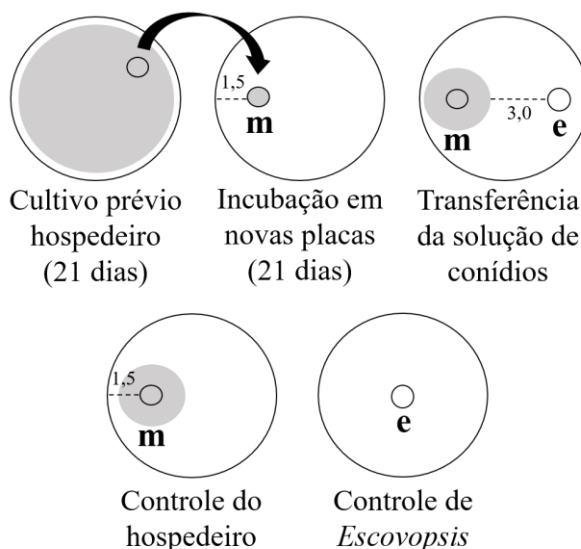
Figura 1. Esquema ilustrativo do desenho experimental dos bioensaios realizados no presente estudo: **I.** desenvolvimento de *Escovopsis* em diferentes fontes de carbono e **II.** bioensaios de co-cultivo com disponibilização ou não de fontes de carbono adicionais.

I. Desenvolvimento



- Micélio do hospedeiro
- Micélio de *Escovopsis*
- Suspensão de conídios de *Escovopsis*

II. Co-cultivo



Fonte: autora

As distâncias estão representadas em cm. M: hospedeiro, fungo mutualista das formigas e E: suspensão de conídios de *Escovopsis*.

Adicionalmente, para investigar a influência do jardim de fungo no crescimento de *Escovopsis*, foi preparado um extrato bruto do jardim cultivado por *Atta sexdens*. O preparo seguiu o método descrito por Silva e colaboradores (2003), com modificações: 10 fragmentos de 1 g de uma área madura (i.e., “velha” e de aspecto amarelado) do jardim de fungo foram coletados e misturados exaustivamente em tampão acetato 50 mM gelado (pH 5,0). Em seguida, a suspensão foi filtrada em papel filtro e, posteriormente, em membrana filtrante de 0,22 µm de porosidade. Após obtenção do extrato esterilizado, 2 mL do mesmo foi adicionado ao meio de cultivo YNB acrescido com ágar e o crescimento de *Escovopsis* foi avaliado conforme descrito anteriormente. Cada tratamento desse bioensaio conteve oito

placas, portanto, cada isolado de *Escovopsis* ($n= 6$), em cada fonte de carbono ($n= 7$), no extrato do jardim ($n= 1$) e nos controles ($n= 2$), totalizou 480 placas de Petri.

Para avaliar a influência de cada fonte de carbono no crescimento micelial de *Escovopsis* ao longo do tempo, utilizamos o teste nparLD. Tal teste estatístico é não paramétrico e com modelo misto para medidas repetidas (NOGUCHI et al., 2012). As análises não-paramétricas de dados longitudinais são projetadas para estudar resultados de bioensaios dependentes do tempo, realizados com um pequeno número de repetições (pseudorréplicas), como é o caso do presente estudo. Realizamos um teste por isolado de *Escovopsis* e o conjunto de dados utilizado foi a área de crescimento ao longo do tempo (dias alternados entre 2 e 28) em cada fonte de carbono simples, no extrato do jardim de fungo e nos controles positivo e negativo. O modelo utilizado foi "F1-LD-F1", pois compara um fator "entre-sujeitos" (diferentes tratamentos) e um fator "dentro dos sujeitos" (tempo). Com esse modelo, foram calculadas as estatísticas tipo-Wald e tipo-ANOVA, seguida por comparações pareadas entre os tratamentos para avaliar a diferença entre eles. Essa análise foi realizada no *software* R v3.5.1 (R Core Team 2018).

Devido ao fato de os isolados apresentarem crescimento micelial mesmo no controle negativo (i.e. sem adição de fontes de carbono), a área de crescimento não consistiu em um bom parâmetro para ser utilizado de maneira única nas comparações. Por esse motivo, a esporulação também foi utilizada para avaliar os experimentos. Mensuramos a área de esporulação total (cm^2) no último dia de bioensaio (dia 28) e calculamos as porcentagens de esporulação em relação a área total da placa de Petri ($56,5 \text{ cm}^2$).

Realizamos o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparar as áreas finais de esporulação (cm^2 , dia 28) nos seguintes tratamentos: controle negativo, controle positivo, extrato do jardim e cada um dos demais tratamentos com as fontes simples de carbono. Essa análise foi realizada no *software* R. Utilizamos o teste de Student Newman Keuls para as comparações múltiplas entre os diferentes tratamentos.

Para avaliar, de maneira conjunta, todos os parâmetros observados durante o desenvolvimento de cada isolado de *Escovopsis* em todos os tratamentos, utilizamos a análise exploratória de escalonamento multidimensional não-métrico (nMDS). Portanto, foram realizados seis nMDS, sendo um para cada isolado de *Escovopsis*. Os dados utilizados foram: (i) área de crescimento micelial no primeiro dia mensurado em que houve medidas para todos os tratamentos, (ii) taxa de crescimento $[\text{Área de crescimento final} - \text{Área de crescimento inicial}]/[\text{Dia final} - \text{Dia inicial}]$, (iii) área final de esporulação, (iv) dia em que houve

germinação, (v) dia em que houve esporulação, (vi) dia em que foi atingida a área de crescimento micelial final e (vii) área micelial final. Em seguida, realizamos também uma única análise de nMDS compreendo todos os dados citados acima referente aos seis isolados de *Escovopsis*, isto é, de uma maneira conjunta, para avaliar as possíveis similaridades no padrão de resposta de cada isolado aos diferentes tratamentos. O índice de dissimilaridade de Bray-Curtis foi utilizado, pois forneceu os menores valores de stress (0,03 a 0,1). As análises de nMDS foram realizadas no *software* PAST v3.20 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

2.3 Bioensaios de co-cultivo na presença e ausência de recursos adicionais de nutrição

A partir dos resultados do bioensaio anterior, identificamos as fontes de carbono que proporcionaram os melhores e piores desenvolvimentos de *Escovopsis*. Com essa informação, selecionamos duas fontes para serem utilizadas nos bioensaios de co-cultivos de *Escovopsis* (n= 6 isolados) e os fungos mutualistas (n= 4 isolados). Foram escolhidas uma fonte de carbono que ocasionou um bom desenvolvimento (tratamento “Bom”) e uma que ocasionou pouco desenvolvimento de cada isolado (tratamento “Ruim”). O objetivo do experimento foi avaliar se a infectividade de *Escovopsis* é influenciada pela presença de recursos adicionais de nutrição, que proporcionam efeitos distintos no seu crescimento. Como houve variação na influência de cada fonte de carbono para cada isolado de *Escovopsis*, a escolha foi realizada de modo individual: para o tratamento “Bom”, utilizamos: arabinose (LESF 017), glicose (LESF 023 e LESF 048), celobiose (LESF 043 e LESF 046) e xilose (LESF 049). Já no tratamento “Ruim”, utilizamos: maltose (LESF 017 e LESF 043) e arabinose (demais isolados). Além disso, foi realizado o controle negativo, que consistiu em meio YNB acrescido de ágar (15 g L⁻¹) e glicose (20 g L⁻¹). A adição de glicose no controle negativo foi necessária para permitir o crescimento dos fungos mutualistas. Portanto, os tratamentos com as fontes adicionais selecionadas (Bom e Ruim) também consistiram em meio YNB acrescido de ágar, glicose e a fonte de carbono adicional (20 g L⁻¹).

Os isolados dos fungos mutualistas de *A. sexdens* (FF2006 e JSP07) e *Trachymyrmex tucumanus* (Trachy e Trachy2) foram previamente cultivados nos meios de cultivos referentes aos três tratamentos descritos acima e incubados a 25 °C, durante 21 dias, no escuro. Após esse período, discos de micélio (6 mm de diâmetro) de cada fungo mutualista foram transferidos a uma distância de 1,5 cm da borda de placas de Petri contendo os três tratamentos em questão. Após 21 dias de incubação, suspensões de conídios dos isolados de *Escovopsis* foram semeadas nas placas, como descrito previamente para o primeiro bioensaio.

Tal suspensão foi semeada à uma distância de 3 cm do limite do micélio de cada fungo mutualista (Figura 1).

Para cada tratamento (Bom, Ruim e Controle Negativo) foi realizado um controle de *Escovopsis* e um do fungo mutualista, nos quais os fungos foram cultivados isoladamente. Cada combinação (seis isolados do parasita x quatro isolados do hospedeiro x três tratamentos = 72 combinações) conteve cinco placas para o controle do parasita, cinco para o controle do hospedeiro e cinco para o confronto (co-cultivo), totalizando 1080 placas de Petri. Todas as repetições foram foto-documentadas e o crescimento micelial de ambos os fungos mensurado conforme descrito anteriormente, durante 14 dias.

Para compreender o efeito das fontes de carbono adicionais nos co-cultivos, primeiramente calculamos um índice de crescimento, proposto por Folgarait, Marfetan e Cafaro (2011): $[\text{Área final (confronto)} - \text{Área inicial (confronto)}] / [\text{Área final (controle)} - \text{Área inicial (controle)}]$. Com os índices calculados, realizamos o Teste *t* para comparar estatisticamente os valores obtidos com o valor fixo 1,0. Quando os valores do índice foram significativamente menores que 1,0, em uma distribuição *t*, consideramos que houve inibição e quando foram significativamente maiores, houve estímulo do crescimento micelial. Utilizamos o índice e o Teste *t* para avaliar o efeito do cultivo pareado em ambos os fungos: no crescimento dos fungos mutualistas e no crescimento de *Escovopsis*. Vale ressaltar que, o uso dos índices permite comparar o crescimento micelial do mesmo fungo em diferentes tratamentos e também comparar o crescimento de diferentes fungos, já que os valores estão todos padronizados com seus respectivos controles.

Após checar a normalidade e homocedasticidade dos dados, realizamos análises de variância (ANOVA dois fatores), com o objetivo de avaliar o efeito causado pelo co-cultivo na infectividade e no crescimento de *Escovopsis*, tendo como fatores: fontes de carbono (tratamentos Bom, Ruim e Controle Negativo) e grupo de hospedeiros (cultivados por formigas cortadeiras - FF2006 e JSP07 - ou não-cortadeiras - Trachy e Trachy2). Para tanto, realizamos doze análises, duas para cada isolado de *Escovopsis*: uma análise com os índices de crescimento dos hospedeiros (para avaliar a infectividade de *Escovopsis*, ou seja, a inibição causada no crescimento dos fungos mutualistas) e uma análise com os índices de crescimento do isolado de *Escovopsis* em questão (para avaliar seu crescimento micelial na presença dos hospedeiros).

À semelhança do bioensaio de desenvolvimento em diferentes fontes de carbono (item 2.2), também realizamos uma única análise com nMDS utilizando todos dados obtidos nos

bioensaios de co-cultivo. Os dados utilizados na análise foram: (i) os índices de crescimento dos fungos mutualistas (n=4) em todos os tratamentos (Bom, Ruim e Controle Negativo) e frente a todos os *Escovopsis* (n=6); (ii) os índices de crescimento dos isolados de *Escovopsis* em todos os tratamentos, frente aos quatro hospedeiros. O objetivo dessa análise foi observar se há similaridade no padrão de infectividade e crescimento micelial dos diferentes isolados de *Escovopsis* na presença dos diferentes hospedeiros.

2.4 Interação física avaliada com Microscopia de Epifluorescência

Para avaliar a interação física entre *Escovopsis* e seu hospedeiro, utilizamos a microscopia de epifluorescência. Realizamos ensaios de interação entre o isolado LESF 017 e um isolado de fungo mutualista (FF2006). Para montagem das preparações, utilizamos placas de Petri forrada com papel filtro, lâminas escavadas e lamínulas. Após a esterilização, foram adicionados 45 μL de meio de cultivo BDA fundido no centro das lâminas, de modo a preencher a região escavada. Em seguida, transferiu-se um pequeno fragmento de micélio do fungo mutualista para uma das bordas da região com meio de cultivo e foi adicionado 1 mL de água deionizada estéril no papel filtro, com objetivo de manter a umidade para o desenvolvimento fúngico. Após seis dias de crescimento do hospedeiro, adicionou-se um pequeno fragmento de micélio e conídios do parasita na região oposta com meio BDA. A adição dos corantes fluorescentes nas amostras teve início entre 20 a 40 horas após a transferência do micélio do parasita para as lâminas.

Utilizamos o seguinte par de corantes fluorescentes: Diacetato de fluoresceína (FDA, que emite fluorescência quando hidrolizado por enzimas esterases, marcando o citoplasma das células com a coloração verde) e Iodeto de Propídeo (IP, que emite fluorescência quando intercalado com o DNA, não é permeável em membranas plasmáticas intactas, marcando em vermelho apenas células com membrana danificada). Com a utilização desses corantes, foi possível observar quais hifas estavam metabolicamente ativas (FDA) e quais apresentavam algum tipo de dano na membrana plasmática (IP). Utilizamos as concentrações de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para FDA e 6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para IP. Para estabilizar as amostras, foram adicionados 200 μL de tampão PBS antes da adição dos corantes. Após a incubação (45 minutos FDA e 15 minutos IP), foram realizadas quatro lavagens com 200 μL de água deionizada esterelizada e, por fim, uma última lavagem com 200 μL com tampão PBS. Como controle do experimento, preparamos lâminas de ambos os fungos (*Escovopsis* LESF 017 e *L. gongylophorus* FF2006) cultivados separadamente. Além disso, um segundo controle consistiu nas lâminas de

crescimento isolado de cada fungo com pré-tratamento com o permeabilizante Triton-X100 (0,5 %), para assegurar o bom funcionamento do corante IP. Todas as observações foram realizadas em microscópio Olympus BX-61 equipado com câmera monocromática Orca-Flash 2.8 (Hamamatsu) e filtros para GFP e TXRED e a captura e processamento das imagens realizado com o *software Cell Sens Dimension* versão 11 (Olympus).

3 RESULTADOS

3.1 Baixo desenvolvimento de *Escovopsis* em fontes simples de carbono

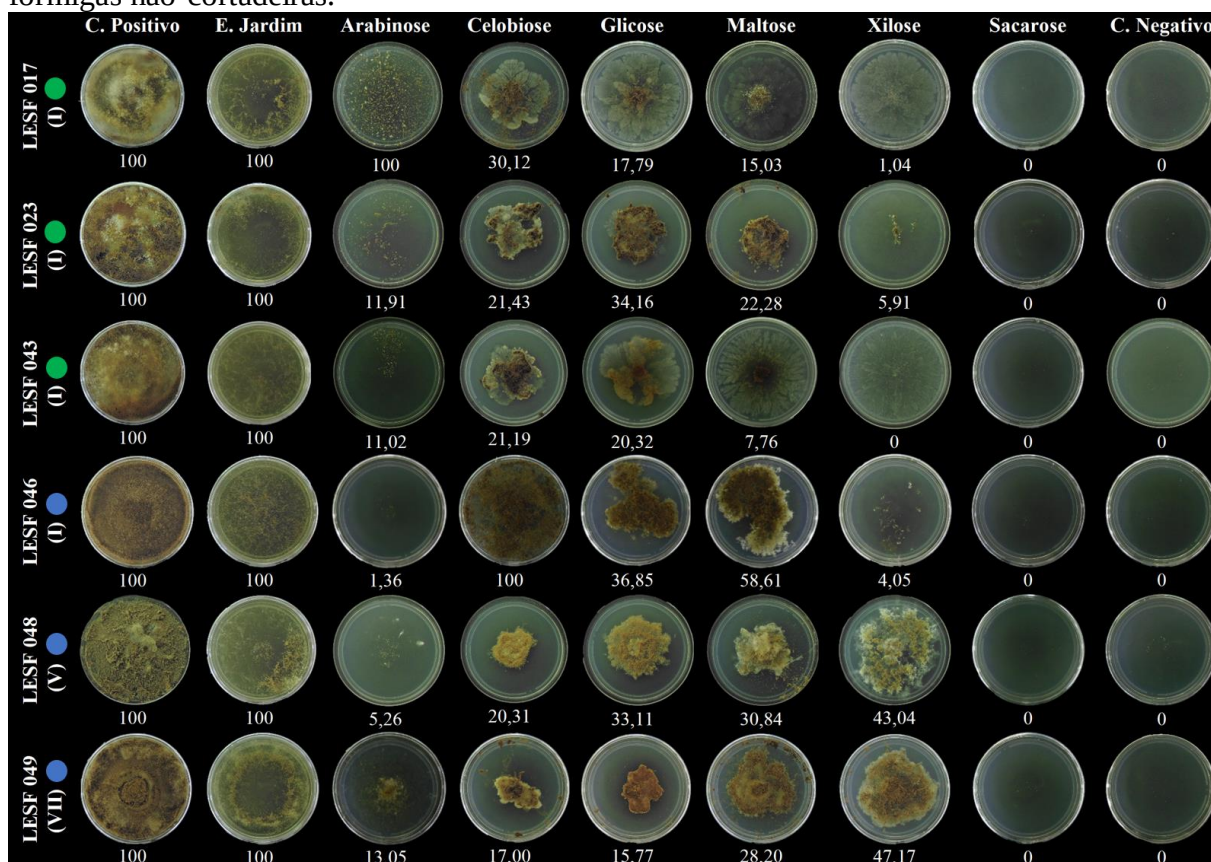
Os bioensaios com as fontes simples de carbono evidenciaram diferenças nos padrões de desenvolvimento (i. e. crescimento e esporulação) de *Escovopsis*, indicando que tais fungos apresentam uma grande diversidade metabólica (Figura 2 e A1). Na presença de fontes simples de carbono, a esporulação do parasita foi abaixo de 59 % da área total da placa de Petri, com apenas duas exceções (LESF 017 na presença de arabinose e LESF 046 na presença de celobiose, Figura 2). A sacarose foi a única fonte de carbono em que houve crescimento, mas não houve esporulação (Figuras 2 e 3). Em relação as demais, glicose e celobiose foram as únicas fontes de carbono em que todos os isolados apresentaram acima de 15 % de esporulação (Figura 2). Em relação à maltose, LESF 043 foi o único isolado que apresentou baixa esporulação (8 %), enquanto os demais isolados apresentaram crescimento mediano e esporulação entre 15 a 59 % da totalidade da placa (Figuras 2 e 3).

Já o tratamento com adição de arabinose forneceu resultados mais variados: LESF 017 apresentou 100 % de esporulação, não diferindo do controle positivo (Figuras 3 e A2), enquanto os demais isolados apresentaram baixas porcentagens de esporulação (1 a 13 %), não diferindo do controle negativo ($P > 0,05$, Student Newman Keuls; Figuras 2 e 3). Portanto, considerando as fontes de carbono em que houve esporulação dos isolados, arabinose sustentou o pior desenvolvimento de *Escovopsis*, com apenas uma exceção (LESF 017; Figura 3 e A2). É importante ressaltar que, apesar do isolado LESF 017 apresentar 100 % de esporulação na presença de arabinose, o crescimento micelial foi lento, em comparação com o controle positivo (meio BDA, Figura A1).

No meio de cultivo com adição de xilose, os isolados do Clado I (LESF 017, LESF 023, LESF 043 e LESF 046) apresentaram o crescimento micelial mais lento em relação as demais fontes simples de carbono (Figura A1), além de baixas porcentagens de esporulação (< 6 %; Figuras 2 e 3). Curiosamente, LESF 048 e LESF 049, pertencentes a outros clados, apresentaram as melhores taxas de esporulação na presença de xilose (43 % e 47 %, respectivamente), em relação as demais fontes de carbono (Figuras 2, 3 e A2). Apesar do alto percentual de área de esporulação no final do experimento (dia 28; 43 %), em relação à esporulação nas demais fontes de carbono, o isolado LESF 048 apresentou um crescimento lento na presença de xilose nos dezesseis primeiros dias de cultivo (Figura A1). Por esse motivo, a xilose não foi considerada como a melhor fonte nutricional para o desenvolvimento

desse isolado, mas sim a glicose. Por fim, LESF 023 e LESF 043 foram os únicos isolados onde a esporulação na presença de todas as fontes simples de carbono não diferiu do controle negativo ($P > 0,05$, Student Newman Keuls; Figura 3).

Figura 2. Crescimento micelial e médias das porcentagens de esporulação (%) de seis isolados de *Escovopsis* (representados por códigos LESF), em diferentes fontes de carbono, no último dia do bioensaio (dia 28). Os algarismos romanos na primeira coluna indicam a qual clado cada isolado pertence, segundo a filogenia de Meirelles et al. (2015). Números representam a área média de esporulação (em %), em relação a área total da placa (Os círculos coloridos indicam a origem quanto ao grupo de formiga: verde – formigas cortadeiras e azul – formigas não-cortadeiras).

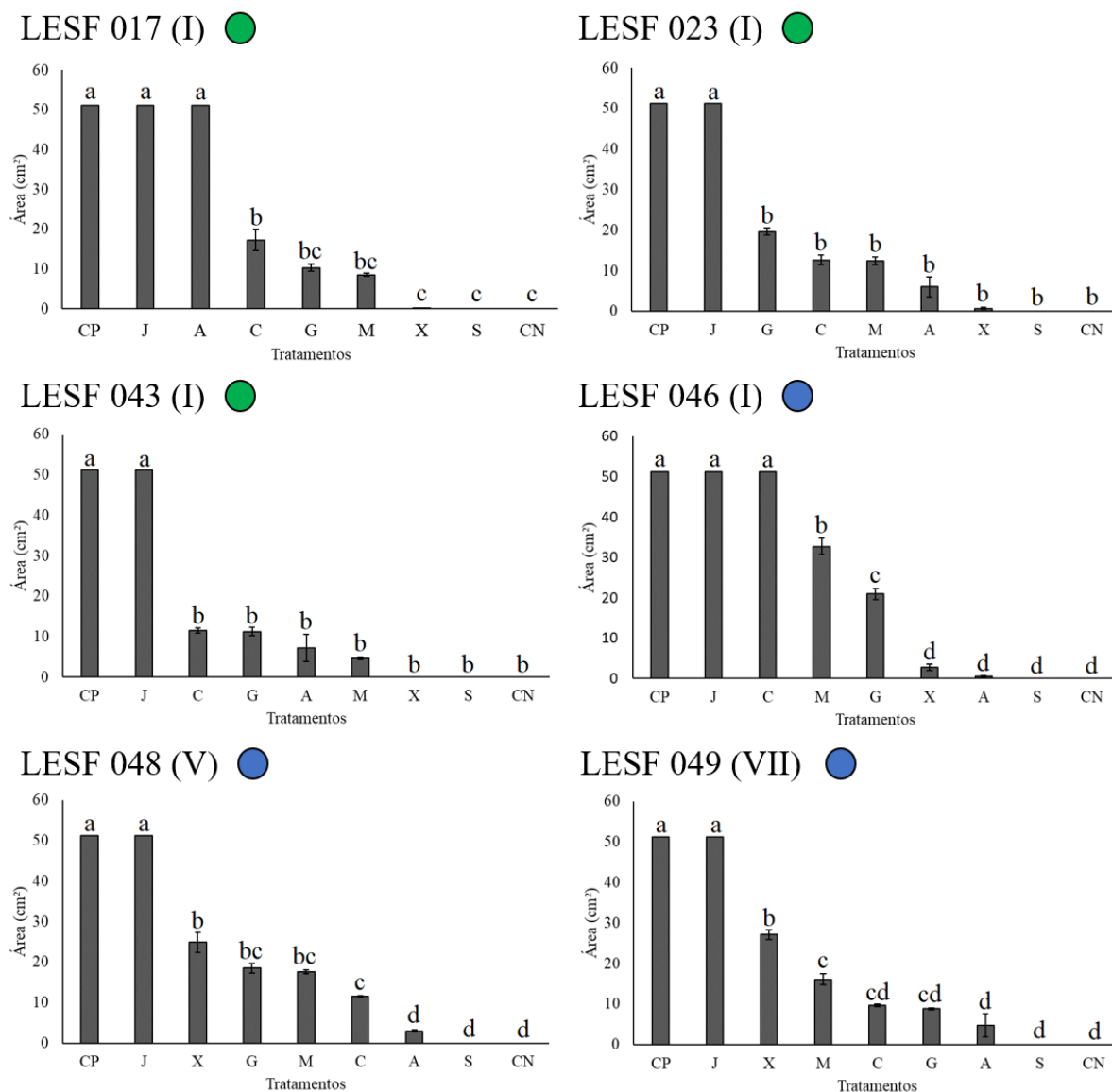


Fonte : autora

Controle positivo: Batata-Dextrose Ágar e Controle negativo: sem fonte de carbono. E. Jardim: Extrato de jardim de fungo.

O tratamento com o extrato do jardim de fungo resultou no melhor desenvolvimento de *Escovopsis*, apresentando as maiores taxas de crescimento micelial e 100 % de esporulação (Figuras 2, 3 e A1). Nos demais tratamentos, nenhum isolado apresentou crescimento micelial semelhante aquele observado no extrato do jardim (Figura A1), com exceção de LESF 017 no controle positivo (meio BDA). Entretanto, é importante ressaltar que o desenvolvimento dos outros cinco isolados no controle positivo foi o que mais se assemelhou ao desenvolvimento no extrato bruto do jardim, pois em ambos os casos houve 100 % de esporulação e taxas de crescimento significativamente maiores que nos demais tratamentos (Figura A1). Não observamos nenhum caso em que o desenvolvimento de *Escovopsis* em uma fonte de carbono simples se assemelhou ao controle positivo ou ao extrato do jardim de fungo. Mesmo nos casos em que houve 100 % de esporulação nos açúcares simples (LESF 017 em arabinose e LESF 046 em celobiose), as taxas de crescimento micelial nessas condições foram significativamente menores do que no controle positivo e no extrato bruto do jardim de fungo (Figura A1).

Figura 3. Médias das áreas de esporulação (em cm^2) de *Escovopsis* nos bioensaios de desenvolvimento em diferentes fontes de carbono, considerando o dia 28 (último dia de experimento). Os algarismos romanos indicam a qual clado cada isolado pertence, segundo a filogenia de Meirelles et al. (2015). Os círculos coloridos indicam a origem quanto ao grupo de formiga: verde – formigas cortadeiras e azul – formigas não-cortadeiras.

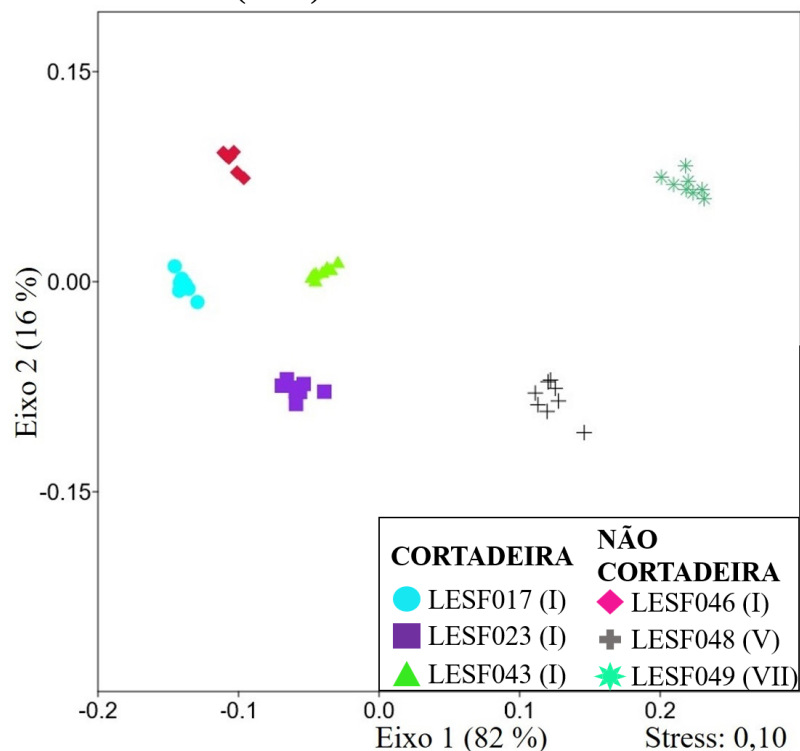


Fonte: autora

Letras distintas representam diferenças estatísticas (Student Newman Keuls $P < 0,05$). Tratamentos: CP: controle positivo, J: extrato do jardim, A: arabinose, C: celobiose, G: glicose, M: maltose, X: xilose, S: sacarose, CN: controle negativo.

Com a análise exploratória nMDS do desenvolvimento de *Escovopsis* nas diferentes fontes de carbono, observamos que o padrão de resposta frente aos diferentes tratamentos está provavelmente relacionado com a distância filogenética entre os isolados. Como é possível observar na Figura 4, obtivemos uma separação dos quatro isolados pertencentes ao Clado I da filogenia de Meirelles et al. (2015), dos demais isolados pertencentes aos clados V e VII (LESF 048 e LESF 049, respectivamente).

Figura 4. Desenvolvimento dos seis isolados de *Escovopsis* nas diferentes fontes de nutrição, analisado por escalonamento multidimensional não-métrico. Os algarismos romanos indicam a qual clado cada isolado pertence, segundo filogenia de Meirelles et al. (2015).



Fonte: autora

O ácido galacturônico inibiu a germinação de todos os isolados de *Escovopsis*. Vale ressaltar que, mesmo na ausência de qualquer fonte de carbono (controle negativo), houve crescimento micelial dos isolados. No entanto, no tratamento com esse ácido não houve germinação dos conídios de *Escovopsis* em nenhuma placa. Na tentativa de entender esse resultado, utilizamos também meios com concentrações menores de ácido galacturônico (10, 5 e 2,5 g L⁻¹) e cultivamos um isolado representando cada clado filogenético (Clado I – LESF 017, Clado V – LESF 048 e Clado VII – LESF 049). Nessas condições, houve germinação apenas no tratamento de menor concentração de ácido galacturônico (2,5 g L⁻¹) e o crescimento foi baixo, em relação ao controle (LESF 017: 1,79 cm² ± 0,06, LESF 048: 1,48 cm² ± 0,64 e LESF 049: 2,72 cm² ± 0,07). Para avaliar se os conídios perderam a viabilidade (nos tratamentos que não foi observada a germinação), retiramos um fragmento do meio de cultivo no qual foram semeados os conídios e transferimos para placas contendo meio BDA. Após incubação, houve crescimento micelial em todas as placas com o novo meio de cultivo. Portanto, a presença de ácido galacturônico nas concentrações avaliadas apenas inibiu a germinação.

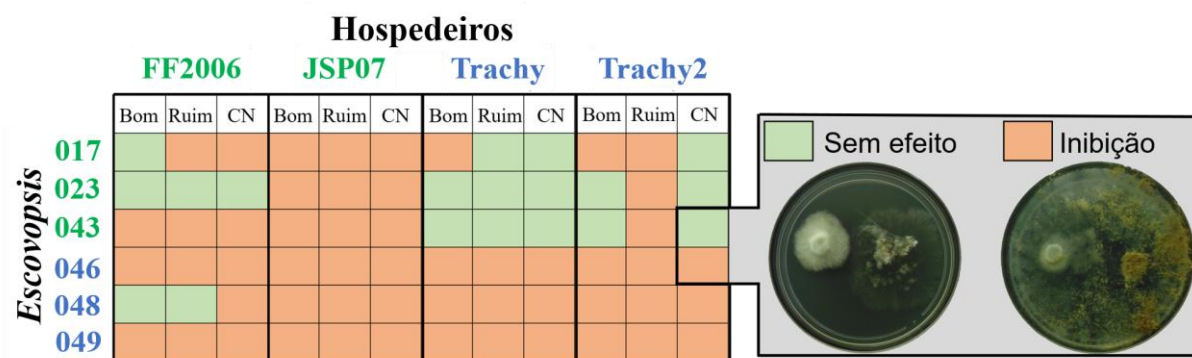
Para avaliar se a inibição ocorreu devido ao baixo pH do meio de cultivo, causado pela adição das diferentes concentrações de ácido galacturônico (pH 2,5 a 3,0), realizamos um tratamento com 5 g L⁻¹ de ácido galacturônico neutralizado com hidróxido de sódio até a obtenção de pH 5,0. Ainda assim, não houve germinação de nenhum isolado de *Escovopsis*. Preparamos um extrato de jardim de fungo de *A. sexdens* mantido em nosso laboratório e observamos que o pH desse ambiente é 4,8. Portanto, não parece ser o pH que esteja interferindo na germinação de *Escovopsis* na presença de ácido galacturônico. Realizamos, por fim, o cultivo de um isolado de *Trichoderma spirale* e um isolado de *Fusarium oxysporum* (ambos provenientes de colônias de formigas atíneas) nas quatro concentrações de ácido galacturônico e também no tratamento neutralizado com NaOH. Curiosamente, os dois fungos apresentaram germinação e crescimento micelial em todos os tratamentos.

3.2 Inibição dos fungos mutualistas

Os fungos cultivados pela formiga cortadeira *A. sexdens* foram os mais susceptíveis a infecção dos parasitas. O fungo mutualista *L. gongylophorus* FF2006 foi inibido em todos os tratamentos por *Escovopsis* sp. LESF 043, LESF 046 e LESF 049 (Figura 5). Já frente à LESF 017 e LESF 048, a inibição ocorreu, mas não em todos os tratamentos, pois não foi inibido na presença de arabinose e arabinose/glicose, respectivamente. O isolado LESF 023 não foi capaz de inibir tal fungo mutualista, independente das diferentes fontes de carbono presentes no meio de cultivo (Figura 5 e Tabela A1). Já o fungo *L. gongylophorus* JSP07 foi inibido por todos os isolados de *Escovopsis*, em todos os tratamentos (Figura 5).

A interação de *Escovopsis* com os fungos cultivados pela formiga não-cortadeira *T. tucumanus* apresentou resultados diferentes. O fungo mutualista Trachy não foi inibido em nenhum tratamento por LESF 023 e LESF 043, enquanto LESF 017 o inibiu apenas em arabinose (Teste *t*, $P < 0,05$; Tratamento Bom, Figura 5). Já os três isolados restantes (LESF 046, LESF 048 e LESF 049) causaram uma inibição significativa do fungo Trachy, com índices de crescimento variando de 0,13 a 0,76 (Figura 5 e Tabela A2). Os resultados da interação de *Escovopsis* com o fungo mutualista Trachy2 foram parcialmente semelhantes com aqueles obtidos com o fungo Trachy: LESF 046, LESF 048 e LESF 049 também inibiram tal hospedeiro em todos os tratamentos (Figura 5). Já frente aos demais isolados, houve uma variação maior entre tratamentos: LESF 017 inibiu Trachy2 nos tratamentos Bom e Ruim, enquanto LESF 023 e LESF 043 o inibiram apenas no tratamento Ruim (Teste *t*, $P < 0,05$; Figura 5). É importante mencionar que, quando ocorreu, a inibição causada por esses últimos três isolados do parasita foi mediana (Índices de crescimento $> 0,60$; Tabela A2).

Figura 5. Efeito no crescimento dos fungos mutualistas (FF2006 e JSP07, cultivados por formigas cortadeiras e Trachy e Trachy2, cultivados por formigas não-cortadeiras), quando na presença de seis isolados de *Escovopsis* (códigos LESF: 017, 023 e 043, associados a formigas cortadeiras e 046, 048 e 049, associados a formigas não-cortadeiras), nos diferentes tratamentos (Bom, Ruim e Controle Negativo). A cor verde representa as combinações nas quais não houve diferença no crescimento micelial dos hospedeiros na presença ou ausência do parasita (Teste *t*, $P > 0,05$) e a cor laranja representa as combinações nas quais houve inibição significativa (Teste *t*, $P < 0,05$).



Fonte: autora

Os resultados da análise de variância (ANOVA dois fatores) mostraram que, para *Escovopsis* LESF 017 e LESF 023, não houve diferença significativa de infectividade frente aos diferentes hospedeiros, independente da adição ou não das fontes de carbono no meio de cultivo. Sempre que a inibição ocorreu, essa foi baixa (Tabelas 2, A1 e A2). Já em relação aos demais isolados, foram observadas diferenças em suas infectividades. LESF 043 inibiu os fungos mutualistas de *A. sexdens* (FF2006 e JSP07; Tabelas 2 e A1), diferindo do efeito causado em Trachy e Trachy2 (sem inibição; Tabelas 2 e A2). Não houve diferença significativa no fator fonte de carbono para esse isolado. Já LESF 046 foi o mais infectivo dentre todos, pois inibiu todos os fungos mutualistas (Figura 5 e Tabelas 2, A1 e A2), apresentando uma maior inibição dos fungos cultivados por *T. tucumanus* ($P < 0,05$, Tukey HSD; Tabelas 2 e A2). Além disso, a análise evidenciou que LESF 046 foi o único isolado que teve sua infectividade significativamente influenciada pelos diferentes tratamentos (ANOVA dois fatores, $P < 0,05$), diferindo entre os tratamentos Bom e Controle Negativo (Tabela 2). LESF 048 também inibiu todos os fungos mutualistas, apresentando uma maior inibição dos fungos cultivados por *T. tucumanus* ($P < 0,05$, Tukey HSD; Tabela 2). Por fim, *Escovopsis* sp. LESF 049 foi o mais infectivo frente aos fungos cultivados por *A. sexdens* (Tabela 2 e A1).

Tabela 2. Inibição do crescimento dos fungos mutualistas ocasionada por *Escovopsis*, representada pelos índices de crescimento* (média $\pm$ erro padrão). Quanto menor o valor do índice de crescimento, maior a inibição causada. As médias foram calculadas em relação aos diferentes grupos de hospedeiros (i. e. fungos cultivados por formigas cortadeiras ou não-cortadeiras) e aos diferentes tratamentos (disponibilidade ou não de recursos de nutrição adicionais). Letras distintas representam as diferenças significativas dentro de cada fator avaliado (hospedeiros ou fontes de carbono; Tukey HSD, $P < 0.05$).

<i>Escovopsis</i>	Hospedeiros		Fontes de Carbono		
	Cortadeiras	Não Cortadeiras	Bom	Ruim	Controle Negativo
LESF 017	0,66 $\pm$ 0,04a	0,75 $\pm$ 0,05a	0,67 $\pm$ 0,04a	0,71 $\pm$ 0,06a	0,73 $\pm$ 0,07a
LESF 023	0,89 $\pm$ 0,04a	0,92 $\pm$ 0,06a	0,92 $\pm$ 0,07a	0,91 $\pm$ 0,05a	0,87 $\pm$ 0,05a
LESF 043	0,35 $\pm$ 0,04a	0,87 $\pm$ 0,08b	0,60 $\pm$ 0,08a	0,53 $\pm$ 0,07a	0,70 $\pm$ 0,13a
LESF 046	0,46 $\pm$ 0,05a	0,29 $\pm$ 0,04b	0,28 $\pm$ 0,05a	0,38 $\pm$ 0,04ab	0,48 $\pm$ 0,07b
LESF 048	0,58 $\pm$ 0,06a	0,37 $\pm$ 0,05b	0,42 $\pm$ 0,08a	0,53 $\pm$ 0,07a	0,49 $\pm$ 0,06a
LESF 049	0,40 $\pm$ 0,03a	0,65 $\pm$ 0,05b	0,43 $\pm$ 0,05a	0,58 $\pm$ 0,04a	0,58 $\pm$ 0,07a

Fonte: autora

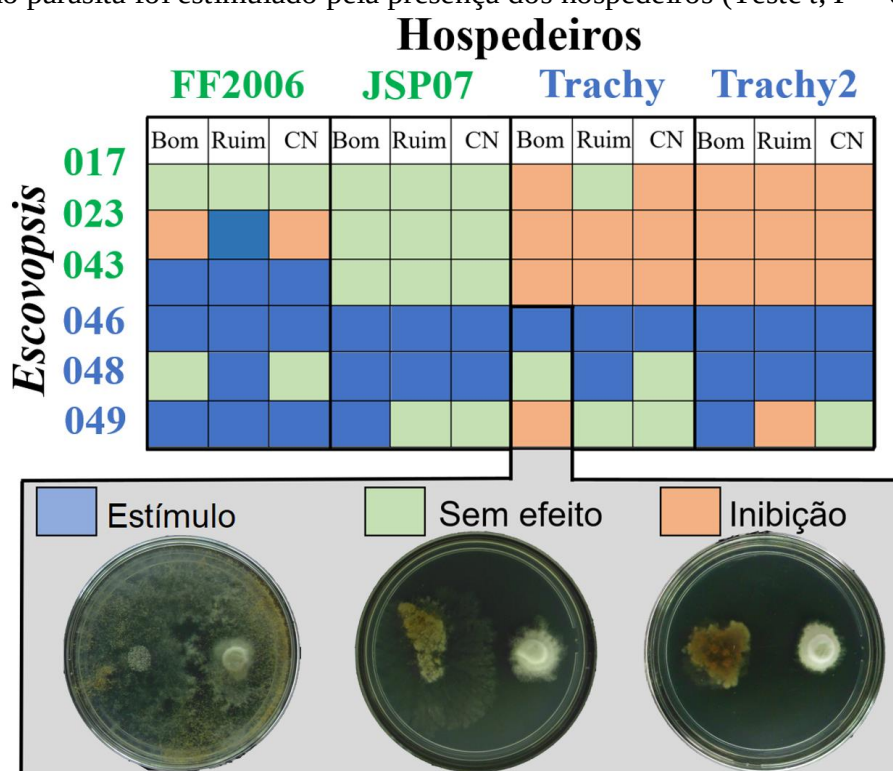
* $[(\text{área final co-cultivo} - \text{área inicial co-cultivo})/(\text{área final controle} - \text{área inicial controle})]$
 Tratamento Bom: fonte de carbono de melhor desenvolvimento de *Escovopsis*; Tratamento Ruim: fonte de carbono de pior desenvolvimento e Controle Negativo: YNB + agar + glicose.

3.3 Efeitos das possíveis fontes de nutrição no crescimento de *Escovopsis*

A presença dos fungos cultivados pelas formigas atíneas causou efeitos variáveis no crescimento de *Escovopsis*. Os isolados LESF 017 e LESF 023 não apresentaram crescimento estimulado frente a nenhum hospedeiro, exceto LESF 023 interagindo com FF2006 (Tratamento Ruim, Figura 6). Além disso, tal isolado foi inibido na presença de FF2006 nos demais tratamentos e também pelos fungos Trachy e Trachy2 (índices de crescimento entre 0,24 e 0,59; Figura 6 e Tabela A4). Já LESF 017 não teve seu crescimento afetado pelos fungos cultivados por *A. sexdens* (FF2006 e JSP07; $P > 0,05$, Teste *t*; Figura 6 e Tabela A3) e foi inibido pelos fungos cultivados por *T. tucumanus* (Trachy e Trachy2). LESF 043 teve seu crescimento estimulado quando interagindo com FF2006, não alterado quando interagindo com JSP07 (em relação ao controle) e inibido por ambos os fungos de *T. tucumanus* (Teste *t*, $P < 0,05$; Figura 6 e Tabelas A3 e A4). Já LESF 046 foi o único isolado que apresentou crescimento estimulado em todos os tratamentos frente a todos os fungos mutualistas (Figura 6), com valores médios de índices de crescimento variando entre 1,36 a 4,15, ou seja, teve seu crescimento até 4 vezes maior na presença dos hospedeiros (Tabelas A3 e A4). LESF 048 teve seu crescimento estimulado em todos os tratamentos frente aos fungos JSP07 e Trachy2 (Teste *t*, $P < 0,05$; Figura 6). LESF 048 foi estimulado também no tratamento com arabinose (Ruim) frente a Trachy e FF2006, mas nos demais tratamentos não houve diferença no crescimento desse isolado, em relação ao controle ($P > 0,05$, Teste *t*). LESF049 apresentou

crescimento estimulado em todos os tratamentos quando na interação com o hospedeiro FF2006, enquanto na interação com JSP07 e Trachy2 foi estimulado somente no tratamento com xilose e, finalmente, foi inibido por Trachy no tratamento com xilose e por Trachy2 no tratamento com arabinose (Ruim; $P < 0,05$, Teste t ; Figura 6).

Figura 6. Crescimento de seis isolados de *Escovopsis* (códigos LESF: 017, 023 e 043, associados a formigas cortadeiras e 046, 048 e 049, associados a formigas não-cortadeiras), na presença dos fungos mutualistas (FF2006 e JSP07, cultivados por formigas cortadeiras e Trachy e Trachy2, cultivados por formigas não-cortadeiras), nos diferentes tratamentos (Bom, Ruim e Controle Negativo). A cor verde representa as combinações nas quais não houve diferença no crescimento micelial de *Escovopsis* na presença ou ausência dos hospedeiros (Teste t , $P > 0,05$), a cor laranja representa as combinações nas quais houve inibição significativa do crescimento de *Escovopsis* e a cor azul representa as combinações nas quais o crescimento do parasita foi estimulado pela presença dos hospedeiros (Teste t , $P < 0,05$).



Fonte: autora

Os resultados da análise de variância (ANOVA dois fatores) mostraram que ambos os fatores (grupo de hospedeiros e diferentes fontes de carbono) influenciaram significativamente o crescimento da maioria dos isolados de *Escovopsis*. Em relação ao fator hospedeiro, observamos que LESF 017, LESF 023 e LESF 043 foram inibidos pelos fungos cultivados por *T. tucumanus*, diferindo do efeito causado pelos fungos cultivados por *A. sexdens*: enquanto os primeiros (LESF 023 e LESF 017) não tiveram seu crescimento influenciado por sua presença, LESF043 foi estimulado pelos mesmos (Tukey HSD, Tabela 3;

Fator Hospedeiro). O isolado LESF 048 teve seu crescimento mais estimulado pelos fungos cultivados por *T. tucumanus*, enquanto LESF 049 apresentou estímulo apenas na presença dos fungos mutualistas de *A. sexdens*. Já LESF 046 foi o único isolado que apresentou igualmente estimulado por ambos os grupos de hospedeiros ($P > 0,05$, Tukey HSD; Tabela 3, Fator Hospedeiro). Quanto ao fator fonte de carbono, também observamos algumas particularidades para cada isolado. LESF 017 foi menos inibido pela presença de seus hospedeiros no tratamento controle negativo, enquanto LESF 023 foi menos inibido no tratamento ruim (Tukey HSD, Tabela 3; Fator Fonte de Carbono). Para os isolados LESF 043 e LESF 049, o fator fonte de carbono não foi significativo e seu crescimento foi semelhante nos três tratamentos (Tabela 3). Já LESF 046 apresentou maior crescimento no tratamento bom, diferindo do seu crescimento no tratamento controle negativo, e LESF048 apresentou maior crescimento no tratamento ruim, diferindo dos demais ($P < 0,05$, Tukey HSD, Tabela 3, Fator Fonte de Carbono).

Tabela 3. Efeito causado no crescimento de *Escovopsis* pela presença dos fungos hospedeiros, representado pelos índices de crescimento* (média $\pm$ erro padrão). As médias foram calculadas em relação aos diferentes grupos de hospedeiros (i. e. fungos cultivados por formigas cortadeiras ou não-cortadeiras) e aos diferentes tratamentos (disponibilidade ou não de recursos de nutrição adicionais).

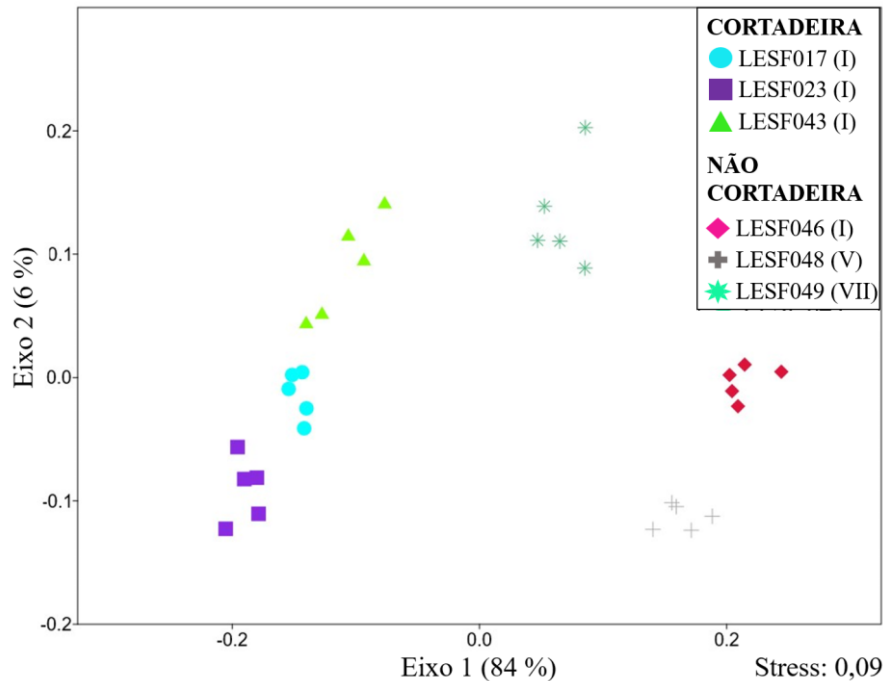
	Fator Hospedeiro		Fator Fonte de Carbono		
	Cortadeiras	Não Cortadeiras	Bom	Ruim	Controle Negativo
LESF 017	0,98 $\pm$ 0,03a	0,46 $\pm$ 0,05b	0,63 $\pm$ 0,07a	0,73 $\pm$ 0,07ab	0,81 $\pm$ 0,09b
LESF 023	0,89 $\pm$ 0,14a	0,39 $\pm$ 0,03b	0,46 $\pm$ 0,06a	0,99 $\pm$ 0,20b	0,46 $\pm$ 0,06a
LESF 043	1,59 $\pm$ 0,17a	0,46 $\pm$ 0,04b	1,19 $\pm$ 0,27a	1,06 $\pm$ 0,16a	0,83 $\pm$ 0,12a
LESF 046	2,73 $\pm$ 0,17a	2,53 $\pm$ 0,21a	3,23 $\pm$ 0,27a	2,75 $\pm$ 0,21a	1,91 $\pm$ 0,09b
LESF 048	1,58 $\pm$ 0,10a	2,44 $\pm$ 0,21b	1,72 $\pm$ 0,18a	2,67 $\pm$ 0,25b	1,63 $\pm$ 0,16a
LESF 049	2,52 $\pm$ 0,24a	0,99 $\pm$ 0,13b	2,07 $\pm$ 0,25a	1,41 $\pm$ 0,26a	1,79 $\pm$ 0,35a

Fonte: autora

* $[(\text{área final co-cultivo} - \text{área inicial co-cultivo})/(\text{área final controle} - \text{área inicial controle})]$
 Tratamento Bom: fontes de carbono de melhor desenvolvimento de *Escovopsis*; Tratamento Ruim: fontes de carbono de pior desenvolvimento e Controle Negativo: YNB + ágar + glicose.

A análise exploratória nMDS evidenciou que, diferentemente do resultado encontrado no primeiro bioensaio, o padrão de resposta dos isolados de *Escovopsis* nos bioensaios de co-cultivo está provavelmente relacionado com a origem dos isolados, isto é, a qual formigas estão associadas (Tabela 1). A Figura 7 evidencia a separação dos três isolados provenientes de formigas cortadeiras (LESF 017, LESF 023 e LESF 043), dos demais isolados provenientes de formigas não-cortadeiras (LESF 046, LESF 048, LESF 049).

Figura 7. Padrão de crescimento e infectividade de *Escovopsis* frente a quatro hospedeiros e em três tratamentos diferentes (i. e. com a disponibilização ou não de recursos de nutrição adicionais), analisado por escalonamento multidimensional não-métrico. Os algarismos romanos indicam a qual clado cada isolado pertence, segundo a filogenia de Meirelles et al. (2015).



Fonte: autora

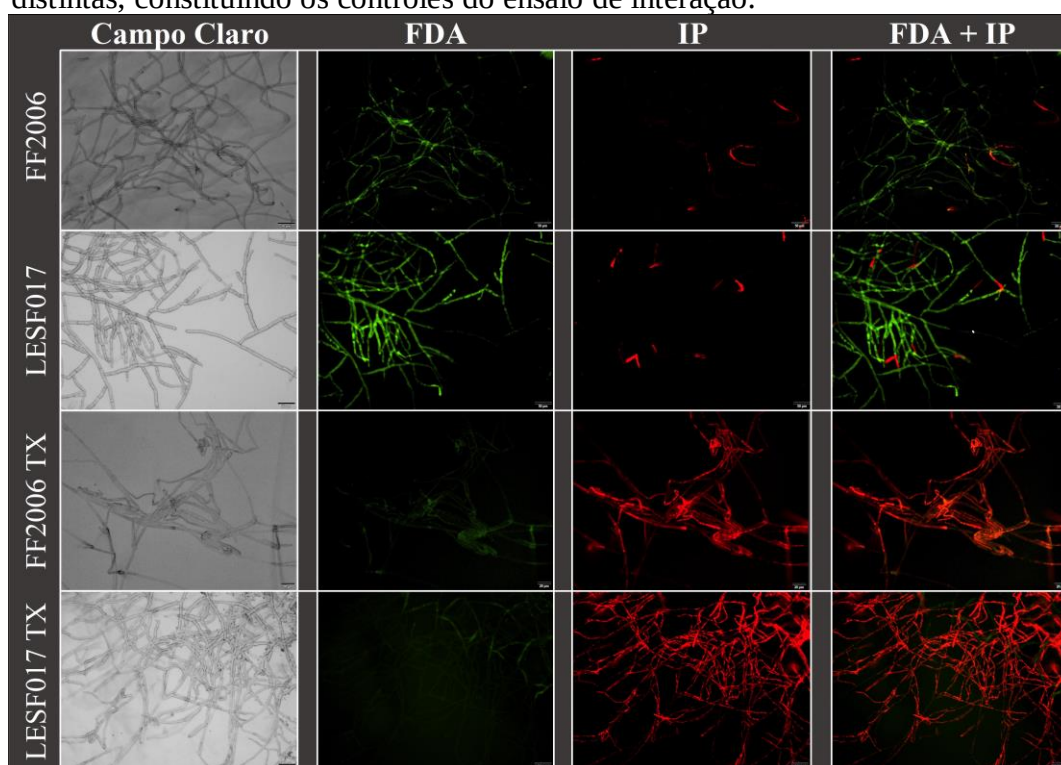
3.4 Início da degradação do hospedeiro por *Escovopsis*

Apesar de muitos estudos desvendarem diversas vertentes da interação de *Escovopsis* e os fungos cultivados pelas formigas atíneas, ainda não havia uma visualização clara (i.e. microscópica) do momento em que o parasita inicia a degradação das hifas do seu hospedeiro. Observando a interação com uso de microscopia de epifluorescência, os resultados evidenciam o início da degradação do fungo mutualista antes do contato físico com as hifas do parasita. Observamos que, mesmo após o contato, há uma baixa fluorescência do corante FDA nas hifas do fungo mutualista, indicando ainda certa atividade enzimática. Entretanto, observamos a marcação com o corante IP (coloração vermelha) em todo o micélio do hospedeiro, mesmo nas regiões em que não houve contato com as hifas do parasita. Tal resultado sugere a presença de metabólitos ativos produzidos por *Escovopsis* que iniciam a degradação das hifas do fungo mutualista.

Para avaliar o efeito da interação no crescimento de ambos os fungos, foi necessário diferenciar as hifas dos mesmos. As principais características que distinguem as hifas do parasita e do hospedeiro são: o diâmetro das mesmas (as hifas do fungo mutualista são mais

finas) e a fácil visualização dos septos nas hifas de *Escovopsis* (Figura A3). Observamos nas lâminas com crescimento isolado de cada fungo (controles) que, mesmo sem o pré-tratamento com o permeabilizante Triton-X100, algumas regiões das hifas apresentaram marcação com o corante IP (coloração vermelha; Figura 8). Entretanto, é visível a diferença de quando as hifas estão permeabilizadas, onde ocorre 100 % de marcação com IP (Figura 8). Portanto, nas lâminas contendo ambos os fungos (interação), consideramos que houve degradação das hifas do fungo mutualista apenas quando houve marcação da maioria das hifas com o corante IP, sendo que pequenas regiões marcadas com esse corante foram consideradas como naturais do próprio fungo, independente da presença do parasita.

Figura 8. Crescimento dos fungos *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006 e *Escovopsis* sp. LESF 017 observada com microscopia de campo claro e de epifluorescência. Os fungos foram cultivados separadamente, em lâminas distintas, constituindo os controles do ensaio de interação.



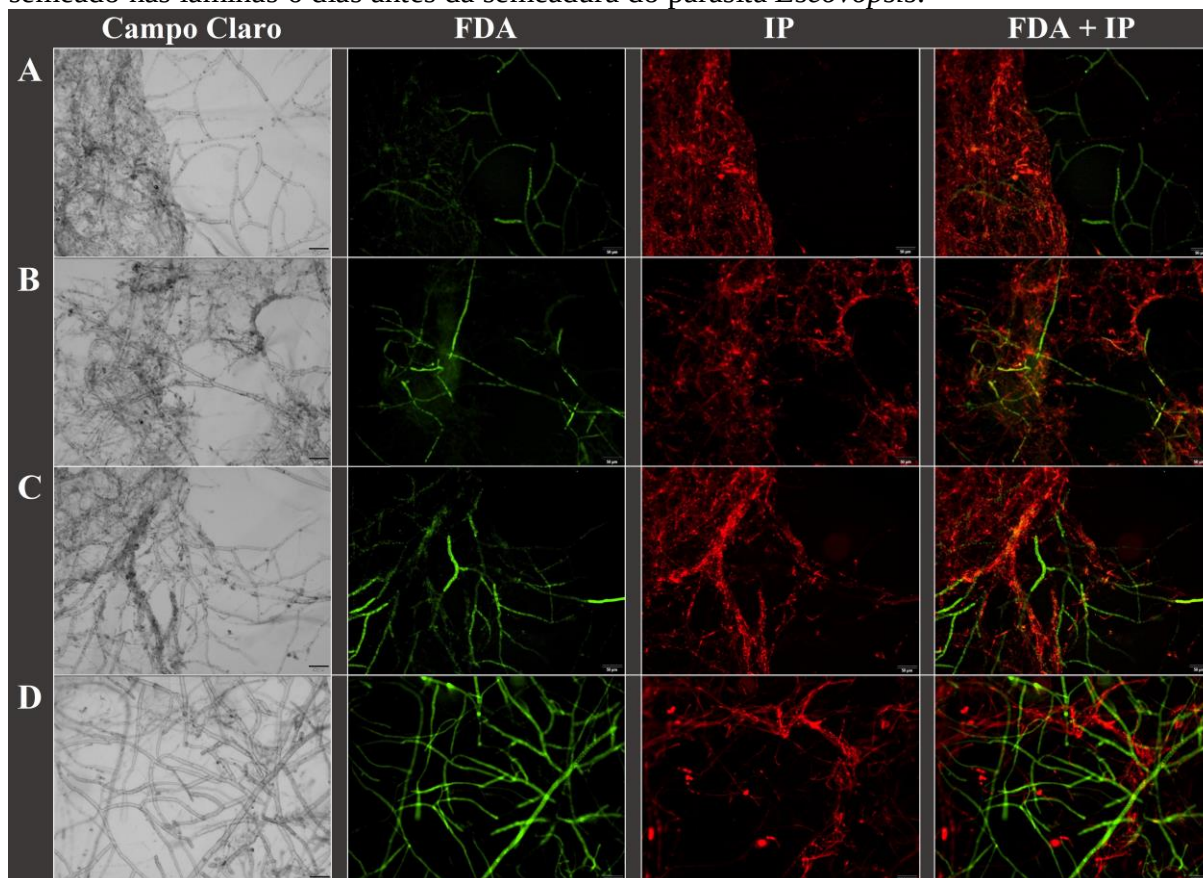
Fonte: autora.

FDA: Diacetato de fluoresceína; IP: Iodeto de propídeo; TX: Lâminas tratadas com o permeabilizante Triton-X100.

Foi possível observar a degradação das hifas do fungo mutualista (indicada pela marcação do corante IP) na presença de *Escovopsis*. No entanto, as hifas do hospedeiro também apresentaram marcação com a coloração verde (corante FDA), indicando que ainda havia certa atividade enzimática (Figura 9). Independente do tempo de crescimento do parasita (24, 32, 36 ou 40 horas), houve marcação das hifas do hospedeiro com ambos os

corantes, embora a marcação com FDA tenha sido fraca (Figura 9). Tanto as hifas do fungo mutualista em contato direto com as hifas de *Escovopsis*, quanto aquelas distantes da zona de contato com o parasita apresentaram marcação com o corante IP (coloração vermelha).

Figura 9. Interação entre *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006 (esquerda) e *Escovopsis* sp. LESF 017 (direita), observada em microscopia de campo claro e epifluorescência. As letras A – D representam diferentes tempos de crescimento do parasita nas preparações: (A) 24 horas de crescimento; (B) 32 horas; (C) 36 horas e (D) 40 horas. O fungo mutualista FF2006 foi semeado nas lâminas 6 dias antes da semeadura do parasita *Escovopsis*.

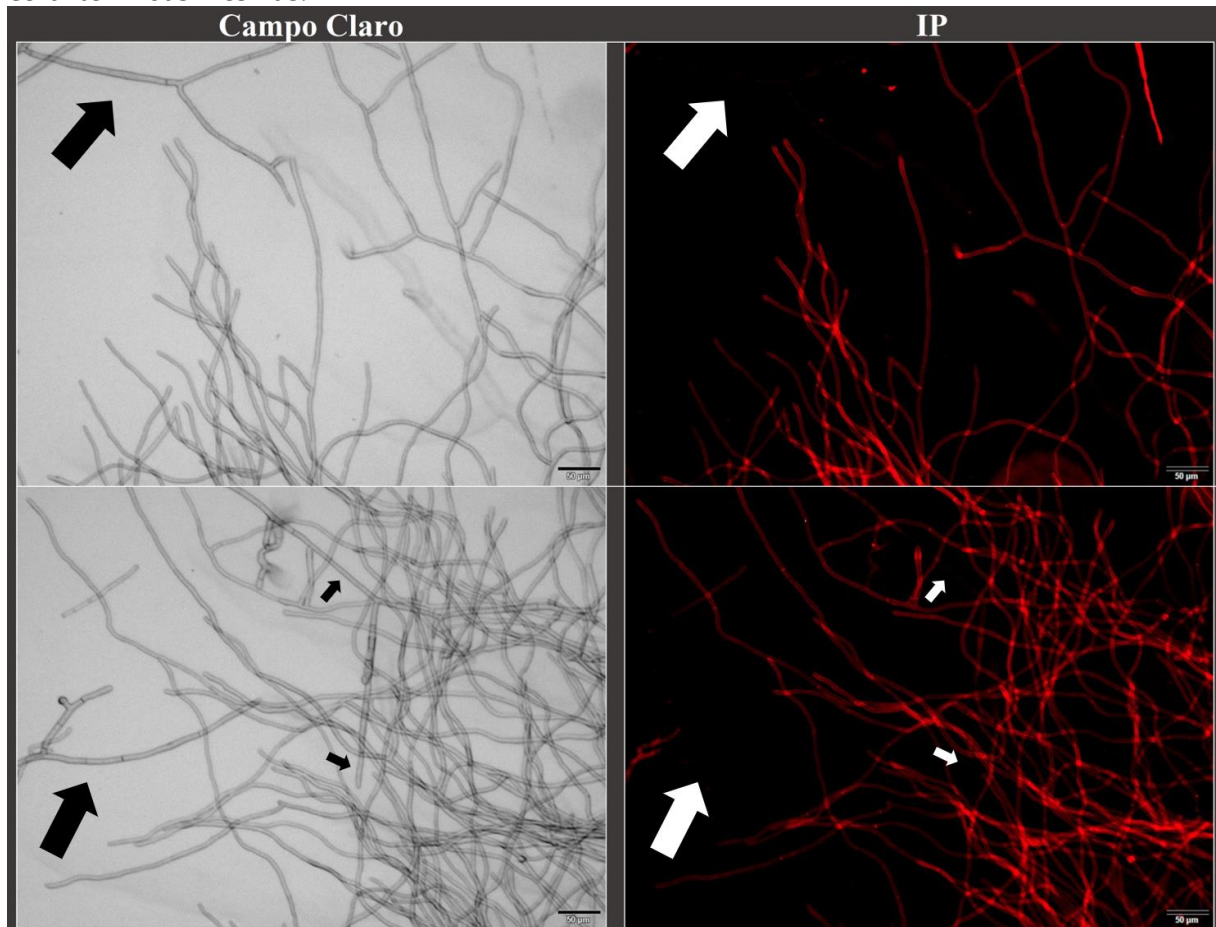


Fonte: autora

FDA: Diacetato de fluoresceína e IP: Iodeto de propídeo.

A Figura 10 demonstra a interação parasita-hospedeiro com apenas 20 horas de incubação de *Escovopsis*. Apesar do contato recente com apenas algumas hifas do hospedeiro, é possível observar que todo o micélio do fungo mutualista está marcado com coloração vermelha, portanto, já apresenta algum tipo de dano na membrana plasmática. Enquanto isso, as hifas do parasita não apresentam marcação de fluorescência com o corante IP, o que sugere que não se apresentavam permeáveis.

Figura 10. Interação entre *Escovopsis* sp. LESF 017 e *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006, observada em microscopia de campo claro e epifluorescência. As setas pretas indicam a localização das hifas do parasita e as setas brancas evidenciam a falta de marcação com corante IP das mesmas.



Fonte: autora

IP: Iodeto de Propídeo.

4 DISCUSSÃO

O uso de derivados simples da degradação dos polímeros vegetais como única fonte de carbono resultou em diferentes níveis de desenvolvimento (crescimento e esporulação) de cada isolado de *Escovopsis*. Tal resultado evidencia a diversidade metabólica do gênero. No entanto, o padrão geral observado foi que uma única fonte de carbono não é suficiente para um bom desenvolvimento *in vitro*, pois apenas nos ensaios com o extrato bruto do jardim de fungo (contendo diferentes fontes nutricionais, os metabólitos do próprio hospedeiro e as secreções das formigas) observamos um desenvolvimento ótimo desses fungos. É possível que a complexidade química presente na matriz do jardim de fungo das formigas atíneas seja importante para o crescimento de *Escovopsis*. Observamos também que o cultivo do parasita na presença de apenas uma ou duas fontes simples de carbono prejudicou a infectividade de três isolados de *Escovopsis*, os quais não foram capazes de causar dano frente a dois fungos mutualistas. Esse resultado pressupõe que o parasita provavelmente deva utilizar de fontes adicionais de nutrientes para infectar o hospedeiro. Adicionalmente, observamos que, na interação parasita-hospedeiro, a degradação do fungo mutualista é iniciada antes do contato físico com as hifas do parasita, sugerindo que *Escovopsis* utilize metabólitos ativos que iniciam o dano no hospedeiro.

No tratamento sem nenhuma fonte de carbono houve crescimento micelial de *Escovopsis*. O crescimento nessa condição consistiu em um micélio fino, aderido ao ágar e visível apenas quando observado contra uma fonte luminosa. Já em alguns tratamentos com a presença de fontes de carbono, observamos um micélio aéreo denso e com esporulação. Segundo Deacon (2006), o crescimento micelial de fungos filamentosos *in vitro* ocorre na superfície do ágar na mesma extensão, seja em um meio sem carbono ou em um meio rico em nutrientes. A diferença está na ramificação das hifas: no meio sem nutrientes o micélio é pouco ramificado, enquanto com alta disponibilidade de carbono, o padrão de ramificação é denso (DEACON, 2006). Sendo assim, nossos resultados evidenciaram que *Escovopsis* é capaz de crescer mesmo na ausência de fontes de carbono. Muitos fungos são capazes de germinar utilizando as próprias reservas dos esporos, normalmente na forma de glicogênio (GOTTLIEB, 1950). No entanto, como não foi observada a formação de conídios por nenhum isolado nessa condição, consideramos que o consumo das fontes simples de carbono e, consequente desenvolvimento de *Escovopsis*, ocorreu apenas quando houve esporulação.

A sacarose é um dissacarídeo formado por glicose e frutose e foi a única fonte de carbono na qual houve crescimento micelial, mas nenhum *Escovopsis* apresentou formação de

conídios. Observamos o crescimento de um micélio fino e aderido ao agar, à semelhança do controle negativo, no entanto, em alguns casos, com taxa de crescimento maior. Talvez o fungo possua um sistema de reconhecimento da presença do açúcar, por isso o crescimento foi mais acelerado, mas devido à ausência de esporulação, suspeita-se que esse fungo provavelmente não seja capaz de assimilar esse dissacarídeo. Já nos tratamentos com maltose e celobiose, dissacarídeos provenientes da degradação de amido e celulose, respectivamente, observamos que todos os isolados apresentaram crescimento e esporulação (portanto, desenvolvimento). Ambos os dissacarídeos são formados pela junção de duas moléculas de glicose, diferindo apenas na configuração da ligação glicosídica e nas enzimas envolvidas em sua hidrólise: maltase e beta-glicosidase, respectivamente. A glicose, por sua vez, é o açúcar mais abundante presente no jardim de fungo de formigas cortadeiras de folhas (SILVA et al., 2003) e foi o único monossacarídeo que forneceu um bom desenvolvimento para todos os isolados no presente estudo. Portanto, *Escovopsis* é capaz de catabolizar esses carboidratos (MAN et al., 2016).

Arabinose e xilose são monossacarídeos que não foram bem assimilados por todos os isolados de *Escovopsis*, quando comparado com a glicose. Os isolados dos clados V (LESF 048) e VII (LESF 049) foram os únicos que apresentaram altos percentuais de esporulação na presença da xilose. Por outro lado, os demais isolados (pertencentes ao clado I) apresentaram baixo desenvolvimento e crescimento micelial lento na presença desse açúcar, com área de esporulação abaixo de 6 %. Man e colaboradores (2016) também demonstraram baixo crescimento de *E. weberi* (também pertencente ao clado I) na presença de xilose. O metabolismo da xilose compreende duas reações de oxi-redução e uma fosforilação, envolvendo as enzimas xilose redutase, xilitol desidrogenase e xiluloquinase, resultando na molécula xilulose 5-fosfato, a qual é metabolizada na via de fosfopentoses (FUGITA, 2010). Portanto, nossos resultados sugerem que apenas os isolados LESF 048 e LESF 049 são capazes de realizar o metabolismo completo dessa molécula. Em relação à arabinose, apenas o isolado LESF 017 (clado I) apresentou um ótimo desenvolvimento nesse monossacarídeo, enquanto os demais apresentaram baixas taxas de esporulação (de 1 a 13 %). A arabinose também não é diretamente utilizada como fonte de carbono, assim como a xilose. É preciso que ocorra uma modificação, resultando na mesma molécula final do metabolismo da xilose. Para isso, é necessária a síntese das enzimas arabinose redutase, arabinitol desidrogenase e xilulose redutase, além das enzimas citadas para o metabolismo da xilose (PEREIRA, 2010).

Portanto, nossos resultados indicam que os isolados LESF 048 e LESF 049 são capazes de realizar o metabolismo completo da xilose, mas não da arabinose, indicando a possibilidade de não produção de alguma das três enzimas necessárias para converter arabinose em xilitol. Já, quanto aos isolados do clado I, uma possível explicação para o bom desenvolvimento de LESF 017 na presença de arabinose, porém ruim na presença de xilose, pode ser a ausência da enzima xilose redutase, necessária no metabolismo de xilose, mas não no de arabinose. Ainda em relação aos demais isolados do clado I (LESF 023, LESF 043 e LESF 046), nossos resultados sugerem que esses possam ter um complexo enzimático mais simples para o consumo de carboidratos, já que não se desenvolveram bem em nenhuma das duas aldopentoses.

No geral, observamos que o perfil de nutrição dos isolados de *Escovopsis* a partir das diferentes fontes de carbono, provavelmente está associado com a proximidade filogenética entre os fungos. Por outro lado, não encontramos uma associação entre o perfil de nutrição e a origem dos isolados, isto é, da formiga atínea da qual foram recuperados. Portanto, o fato de os isolados pertencerem às formigas cortadeiras e não-cortadeiras de folhas, aparentemente não está associado às divergências de desenvolvimento de *Escovopsis* nas fontes simples de carbono avaliadas nesse estudo.

Nossos resultados mostraram diferenças no padrão de desenvolvimento dos seis isolados de *Escovopsis* nas fontes simples de carbono avaliadas, mesmo entre aqueles pertencentes a um mesmo clado filogenético. A distinção entre os isolados segundo aos cladogramas que pertencem ficou evidente, principalmente, pelo desenvolvimento na presença de xilose. No entanto, é importante ressaltar que na presença das demais fontes nutricionais também observamos diferenças entre todos os isolados. Em nenhum caso observamos ao menos dois isolados que apresentassem os mesmos padrões de melhor e pior desenvolvimento em cada tratamento avaliado. Cada um deles apresentou um padrão distinto. Esses resultados indicam uma diversidade metabólica desses fungos, a qual possivelmente esteja relacionada com a diversidade filogenética do gênero. Estudos futuros poderão entender como tal variabilidade metabólica de *Escovopsis* pode afetar a ecologia desses parasitas.

A pectina é um polímero que compreende cerca de 30 % da matéria seca da biomassa vegetal e é constituída principalmente por cadeias de ácido galacturônico (KAKAZU et al., 2017). A pectinase, enzima responsável por sua hidrólise, é produzida em grande quantidade *in vitro* por *L. gongylophorus*, entretanto, sabe-se que o ácido galacturônico é pouco assimilado pelo mesmo (SIQUEIRA et al., 1998). Sabe-se ainda que a presença de ácido

galacturônico pode causar um efeito negativo na sobrevivência das operárias de formigas cortadeiras, e estima-se que há uma grande concentração desse monômero nesse ambiente (SILVA et al., 2003). Nossos resultados mostraram que, mesmo em concentrações reduzidas (10 e 5 g L⁻¹) e com pH 5, a adição de ácido galacturônico no meio de cultivo inibiu a germinação de *Escovopsis*, enquanto outros fungos filamentosos (*T. artroviridae* e *F. oxysporum*) apresentaram crescimento nas mesmas condições. Estudos adicionais serão realizados para explorar a ação inibitória dessa molécula na germinação e crescimento de *Escovopsis*.

Pela primeira vez, demonstramos o crescimento de *Escovopsis* no extrato do jardim de fungo das formigas atíneas, isto é, na combinação de recursos nutricionais e metabólitos em que o parasita vive na natureza. A taxa de crescimento no extrato do jardim foi significativamente maior que nos demais tratamentos, provavelmente devido aos metabólitos produzidos pelo hospedeiro e reconhecidos pelo parasita. No entanto, observamos que o desenvolvimento dos isolados no meio BDA, o meio de cultivo mais comumente utilizado em bioensaios com *Escovopsis*, foi próximo a aquele observado no extrato do jardim de fungo. Portanto, esse meio artificial de fato aplica-se para ensaios *in vitro* com esses organismos e essa informação suporta os resultados obtidos na literatura até então (FOLGARAIT; MARFETÁN; CAFARO, 2011; MARFETÁN; ROMERO; FOLGARAIT, 2015; BIRNBAUM; GERARDO, 2016; GÓMEZ, 2017; VARANDA-HAIFIG et al., 2017). Já o crescimento de *Escovopsis* em fontes simples de carbono, independente de qual, diferiu do crescimento em BDA e em extrato do jardim de fungo.

Ao contrário do esperado, observamos que alguns isolados de *Escovopsis* não foram capazes de causar dano nos hospedeiros e tiveram seu crescimento micelial prejudicado, quando em co-cultivo na presença de apenas um ou dois açúcares simples. LESF 017, LESF 023 e LESF 043 foram inibidos pelos fungos cultivados por *T. tucumanus* (Trachy e Trachy2, e no caso do parasita LESF023 também por *L. gongylophorus* FF2006). No entanto, crescendo isoladamente em meio BDA ou em extrato do jardim de fungo, os três isolados apresentaram crescimento ótimo e 100 % de esporulação. Varanda-Haifig e colaboradores (2017) encontraram que, quando cultivado em meio BDA, LESF 023 foi capaz de inibir o fungo mutualista FF2006 em 56 %, em relação ao controle, enquanto em nosso estudo tal inibição não foi observada. Semelhantemente, Gómez (2017) avaliou a interação de 21 isolados de *Escovopsis* frente aos fungos mutualistas FF2006 e Trachy (em meio BDA) e todos os isolados do parasita causaram inibição do hospedeiro e apresentaram

desenvolvimento ótimo nesses experimentos. Tais resultados sugerem que a falta de uma fonte complexa de nutrientes pode estar associada ao enfraquecimento de alguns isolados de *Escovopsis*, fazendo com que as defesas (possivelmente químicas) apresentadas pelos hospedeiros sejam suficientes para controlar a infecção e o crescimento do parasita.

O fungo mutualista JSP07 (cultivado por *A. sexdens*) foi o mais susceptível do estudo, pois foi inibido por todos os isolados de *Escovopsis*, seguido por FF2006, também cultivado pela mesma formiga. Esse fungo não foi inibido apenas por LESF 023, isolado menos infectivo do estudo. Já os fungos mutualistas cultivados por *T. tucumanus* não foram inibidos por três dentre seis isolados de *Escovopsis*. Novamente, tal resultado não corrobora com os resultados obtidos por Gómez (2017), que observou em meio de cultivo BDA, que o fungo mutualista de *T. tucumanus* foi mais susceptível à infecção frente a diversos isolados do parasita (n= 21), do que o fungo cultivado por *A. sexdens* (FF2006). De alguma forma, no presente estudo, a interação parasita-hospedeiro em meio com apenas uma ou duas fontes de carbono levou os fungos mutualistas de *T. tucumanus* a resistirem mais à infecção por *Escovopsis*, do que os fungos mutualistas de *A. sexdens*. É possível que a falta de nutrientes complexos faça com que alguns isolados de *Escovopsis* deixem de produzir metabólitos importantes para sua infectividade, com isso, as defesas dos mutualistas constituam em barreiras que superem o ataque do parasita. Portanto, esse conflito de resultados evidencia o quanto o contexto é importante para o estabelecimento desse sistema parasita-hospedeiro. É importante mencionar que as alterações entre os resultados da interação em determinados tratamentos podem estar relacionadas também com o vigor do fungo mutualista, isto é, podem haver variações na sua susceptibilidade resultantes da presença/ausência de determinada fonte de carbono, independente do parasita em si.

Existem diversas definições para classificar fungos parasitas. Segundo Thrower (1966) e Jeffries (1995), esses organismos podem ser divididos em biotróficos (obtem energia a partir de células vivas) e necrotróficos (obtem energia a partir de células mortas). Além disso, Thrower (1966) afirma que os fungos podem ser parasitas obrigatórios (não-cultiváveis) ou facultativos. Brian (1967) ainda subdivide o grupo de parasitas obrigatórios em duas classificações: parasitas ecologicamente obrigatórios (parasitas na natureza, mas podem ser cultivados) e parasitas fisiologicamente obrigatórios (não-cultiváveis). Independente das classificações, foi proposto ainda que condições ambientais podem determinar se a nutrição de um fungo parasita é biotrófica ou necrotrófica (LEWIS, 1973). Observamos em nosso estudo que, independente da presença de uma ou duas fontes simples de carbono no meio de

cultivo, alguns isolados ainda permaneceram com sua infectividade prejudicada, em relação a ensaios realizados em meios de cultivo ricos em nutrientes.

Curiosamente, nossas análises mostraram também que a adição de fonte de carbono influencia significativamente o crescimento micelial da maioria dos isolados de *Escovopsis*. Isto é, o recurso nutricional adicionado, quando em meio com apenas glicose, não alterou a infectividade da maioria dos isolados, mas influenciou o crescimento dos mesmos. Por ser um fungo conhecido como micoparasita, esperávamos que a presença dos hospedeiros, em um meio pobre em nutrientes, resultaria em um grande estímulo do crescimento de *Escovopsis*, levando à altas taxas de maximização de crescimento micelial do parasita (FOLGARAIT; MARFETÁN; CAFARO, 2011). No entanto, observamos o esperado apenas para dois isolados, enquanto que os demais não tiveram seu crescimento estimulado ou, ainda, foram inibidos pela presença de alguns hospedeiros. Com esses resultados, supomos duas hipóteses: (i) o cultivo de *Escovopsis* em meio com apenas uma ou duas fontes simples de carbono prejudica a infectividade e, com isso, o parasita não foi capaz de se nutrir a partir de seus hospedeiros; e (ii) tais isolados não têm seus hospedeiros como principal fonte de nutrição, mesmo quando estão expostos em situações *in vitro*, sem a proteção das formigas.

Pela primeira vez foi demonstrada a interação de *Escovopsis* e o fungo cultivado por formigas atíneas utilizando corantes fluorescentes. Nossos resultados evidenciam a degradação das hifas do hospedeiro mesmo sem contato físico com as hifas do parasita, corroborando com estudos anteriores que avaliaram o efeito inibitório de metabólitos produzidos por *Escovopsis* (VARANDA-HAIFIG et al., 2017; HEINE et al., 2018; DHODARY et al., 2018). No entanto, mesmo após o início da degradação das hifas do fungo mutualista, ainda observamos uma certa atividade enzimática, evidenciada pela marcação com o corante FDA. Sendo assim, não é possível concluir se *Escovopsis* mata seu hospedeiro somente por ação química, mas sim que seus metabólitos são os responsáveis por iniciar a degradação do mesmo.

Embora observamos grandes variações nos experimentos de interação *Escovopsis*-fungo mutualista, é possível supor que os padrões observados estão claramente relacionados com a infectividade de *Escovopsis* (alguns isolados foram capazes de inibir os quatro hospedeiros, outro inibiu fracamente apenas um) e com a susceptibilidade dos fungos mutualistas. A adição de mais uma fonte de carbono em meio contendo apenas glicose não alterou essas interações. Ainda assim, é importante ressaltar que, apesar de não ter causado

influência na interação de ambos os fungos em si, demonstramos que a presença desses recursos adicionais influencia o crescimento da maioria dos isolados de *Escovopsis*.

5 CONSIDERAÇÕES

- Os resultados evidenciaram a diversidade metabólica de *Escovopsis*, pois cada isolado avaliado apresentou capacidade distinta de desenvolvimento nas diferentes fontes simples de carbono.
- O oferecimento de apenas uma fonte de carbono não é suficiente para prover um desenvolvimento ótimo de *Escovopsis*. Entretanto, em meio de cultivo contendo extrato do jardim de fungo (contendo vários recursos nutricionais e metabólitos do jardim, do próprio fungo hospedeiro e das formigas), *Escovopsis* apresentou melhor desenvolvimento. Portanto, nossos dados sugerem que o parasita necessita da complexidade do jardim para seu desenvolvimento.
- Observamos que o cultivo em meio com apenas uma ou duas fontes simples de carbono prejudicou a infectividade de alguns isolados de *Escovopsis*. Tal resultado indica que talvez o parasita necessite de uma quantidade inicial de fontes de nutrientes prontamente assimiláveis para conseguir sobrepujar as defesas dos hospedeiros e estabelecer a infecção.
- *Escovopsis* utiliza de mecanismos químicos para atacar o hospedeiro, pois a degradação micelial do último é iniciada antes do contato físico entre as hifas.

REFERÊNCIAS

- ABRÀMOFF, M. D.; MAGALHÃES, P. J.; RAM, S. J. Image processing with ImageJ. **Biophotonics International**, Pittsfield, v. 11, n. 7, p. 36-42, 2004.
- ARAÚJO, A.; JANSEN, A. M.; BOUCHET, F.; REINHARD, K.; FERREIRA, L. F. Parasitism, the diversity of life, and paleoparasitology. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 1, p. 5-11, 2003.
- BASS, M.; CHERRETT, J.M. Fungal hyphae as a source of nutrientes for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **Physiology Entomology**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 1-6, 1995.
- 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.
- BRIAN, P.W. The Leeuwenhoek Lecture, 1966 - Obligate parasitism in fungi. **Proceedings of The Royal Society B-Biological Sciences**, London, v. 168, n. 1011, p. 101-118, 1967.
- 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. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 96, n. 7, p. 7998-8002, 1999.
- CURRIE, C. R. Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. **Oecologia**, Berlin, v. 128, n. 1, p. 99-106, 2001.
- DEACON, J. W. **Fungal biology**. Blackwell Publishing Ltd, Hoboken, 4ed, p. 1-371, 2006.
- DE FINE LICHT, H.; BOOMSMA, J. J.; TUNLID, A. Symbiotic adaptations in the fungal cultivar of leaf-cutting ants. **Nature Communications**, London, v. 5, n. 5675, p. 1-10, 2014.
- DHODARY, B.; SCHILG, M.; WIRTH, R.; SPITELLER, D. Secondary Metabolites from *Escovopsis weberi* and Their Role in Attacking the Garden Fungus of Leaf - Cutting Ants. **Chemistry-A European Journal**, Weinheim, v. 24, n. 17, p. 4445-4452, 2018.
- FOLGARAIT, P. J.; MARFETÁN, J. A.; CAFARO, M. J. Growth and conidiation response of *Escovopsis weberi* (Ascomycota: Hypocreales) against the fungal cultivar of *Acromyrmex lundii* (Hymenoptera: Formicidae). **Environmental Entomology**, College Park, v. 40, n. 2, p. 342-349, 2011.
- FRANK, S. A. Models of parasite virulence. **The Quarterly Review of Biology**, Chicago, v. 71, n. 1, p. 37-78, 1996.
- FUGITA, T. P. L. **Desempenho de leveduras que metabolizam xilose para produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana**. 2010. 60f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Jaboticabal, 2010.
- GÓMEZ, I. J. **Interação patógeno-hospedeiro na fungicultura das formigas atíneas derivadas**. 2017. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2017.

GOTTLIEB, D. The physiology of spore germination in fungi. **The Botanical Review**, New York, v. 16, n. 5, p. 229-257, 1950.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, College Station, v. 4, n. 1, p. 1–9, 2001.

HEINE, D.; HOLMES, N. A.; WORSLEY, S. F.; SANTOS, A. C. A.; INNOCENT, T. M.; SCHERLACH, K.; PATRICK, E. H.; YU, D. W.; MURRELL, J. C.; VIERIA, P. C.; BOOMSMA, J. J.; HERTWECK, C.; HUTCHINGS, M. I.; WILKINSON, B. Chemical warfare between leafcutter ant symbionts and a co-evolved pathogen. **Nature Communications**, London, v. 9, n. 1, p. 2208, 2018.

JEFFRIES, P. Biology and ecology of mycoparasitism. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, n. S1, p. 1284-1290, 1995.

KAKAZU, S. **Evolução metabólica e potencial biotecnológico de jardins de fungo de formigas Attini avaliados por metatranscriptômica**. 2017. 105f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2017.

KELLNER, K.; ISHAK, H. D.; LINKSVAYER, T. A.; MUELLER, U. G. Bacterial community composition and diversity in an ancestral ant fungus symbiosis. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 91, n. 7, fiv073, 2015.

KHADEMPOUR, L.; FAN, H.; KEEFOVER-RING, K.; CARLOS, C.; NAGAMOTO, N. S.; DAM, M. A.; PUPO, M. T.; CURRIE, C. M. Metagenomics reveals diet-specific specialization in fungus gardens of grass-and dicot-cutter ants. **bioRxiv**, [s.v.], [s.n.], p. 250993, 2018.

LEWIS, D. H. Concepts in fungal nutrition and the origin of biotrophy. **Biological Reviews**, Cambridge, v. 48, n. 2, p. 261-277, 1973.

LI, H.; SOSA-CALVO, J.; HORN, H. A.; PUPO, M. T.; CLARDY, J.; RABELING, C.; SCHULTZ, T.; CURRIE, C. R. Convergent evolution of complex structures for ant–bacterial defensive symbiosis in fungus-farming ants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Whashington, v. 115, n. 42, p. 10720-10725, 2018.

MAN, T. J. B.; STAJICH, J. E.; KUBICEKC, C. P.; TEILING, C.; CHENTHAMARA, K.; ATANASOVA, L.; DRUZHININA, I. S.; LEVENKOVA, N.; BIRNBAUM, S. S. L.; BARRIBEAU, S. M.; BOZICK, B. A.; SUEN, G.; CURRIE, C. R.; GERARDO, N. M. Small genome of the fungus *Escovopsis weberi*, a specialized disease agent of ant agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 113, n. 13, p. 3567-3572, 2016.

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

MEIRELLES, L. A.; SOLOMON, S. E.; BACCI Jr., M.; WRIGHT, A. M.; MUELLER, U. G.; RODRIGUES, A. Shared *Escovopsis* infections between leaf-cutting and non-leaf-cutting ants in the higher-attine fungus-growing ant symbiosis. **Royal Society Open Science**, London, v. 2, n. 9, p. 150257, 2015.

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**, Portland, v. 3, n. 1, p. 228-245, 2012.

MUELLER, U. G.; ISHAK, H. D.; BRUSCHI, S. M.; SMITH, C. C.; HERMAN, J. J.; SOLOMON, S. E.; MIKHEYEV, A. S.; RABELING, C.; SCOTT, J. J.; COOPER, M.; RODRIGUES, A.; ORTIZ, A.; BRANDÃO, C. R. F.; LATTLE, J. E.; PAGNOCCA, F. C.; REHNER, S. A.; SCHULTZ, T. R.; VASCONSELOS, H. L.; ADAMS, R. M. M.; BOLLAZZI, M.; CLARK, R. M.; HIMLER, A. G.; SOSA-CAVO, J.; WIRTH, R.; BACCI Jr, M. Biogeography of mutualistic fungi cultivated by leafcutter ants. **Molecular Ecology**, Chichester, v. 26, n. 24, p. 6921–6937, 2017.

NEWMAYER, D. Filtering small quantities of conidial suspensions to remove mycelial fragments. **Fungal Genetics Newsletter**, Kansas City, v. 37, n. 1, p. 27. 1990.

NOGUCHI, K.; GEL, Y. R.; BRUNNER, E.; FRANK, K. nparLD: an R software package for the nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments. **Journal of Statistical Software**, Los Angeles, v. 50, n. 12, p. 1-23, 2012.

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

PATTERSON, J. E. H.; RUCKSTUHL, K. E. Parasite infection and host group size: a meta-analytical review. **Parasitology**, Chichester, v. 140, n. 7, p. 803-813, 2013.

PEREIRA, F. C. **Avaliação da capacidade de bioconversão de hexoses e pentoses em bioetanol por *Spathaspora arborariae***. 2010. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Engenharia Química, Porto Alegre, 2010.

PEREIRA, J. S.; COSTA, R. R.; NAGAMOTO, N. S.; FORTI, L. C.; RODRIGUES, A. Comparative analysis of fungal communities in colonies of two leaf-cutting ant species with different substratum preferences. **Fungal Ecology**, Exeter, v. 21, [s.n.], p. 68-75, 2016.

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

R Core Team (2018) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

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

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

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

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.

SIQUEIRA, C. G.; BACCI, M. Jr.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. A.; HEBLING, M. J. A. Metabolism of Plant Polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the Symbiotic Fungus of the

Leaf-Cutting Ant *Atta sexdens* L. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 12, p. 4820–4822, 1998.

SOMERA, A. F.; LIMA, A. M.; DOS SANTOS, A. J.; LANÇAS, F. M.; BACCI Jr, M. Leaf-Cutter Ant Fungus Gardens are Biphasic Mixed Microbial Bioreactors that Convert Plant Biomass to Polyols with Biotechnological Application. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 81, n. 13, p. 4525-4535, 2015.

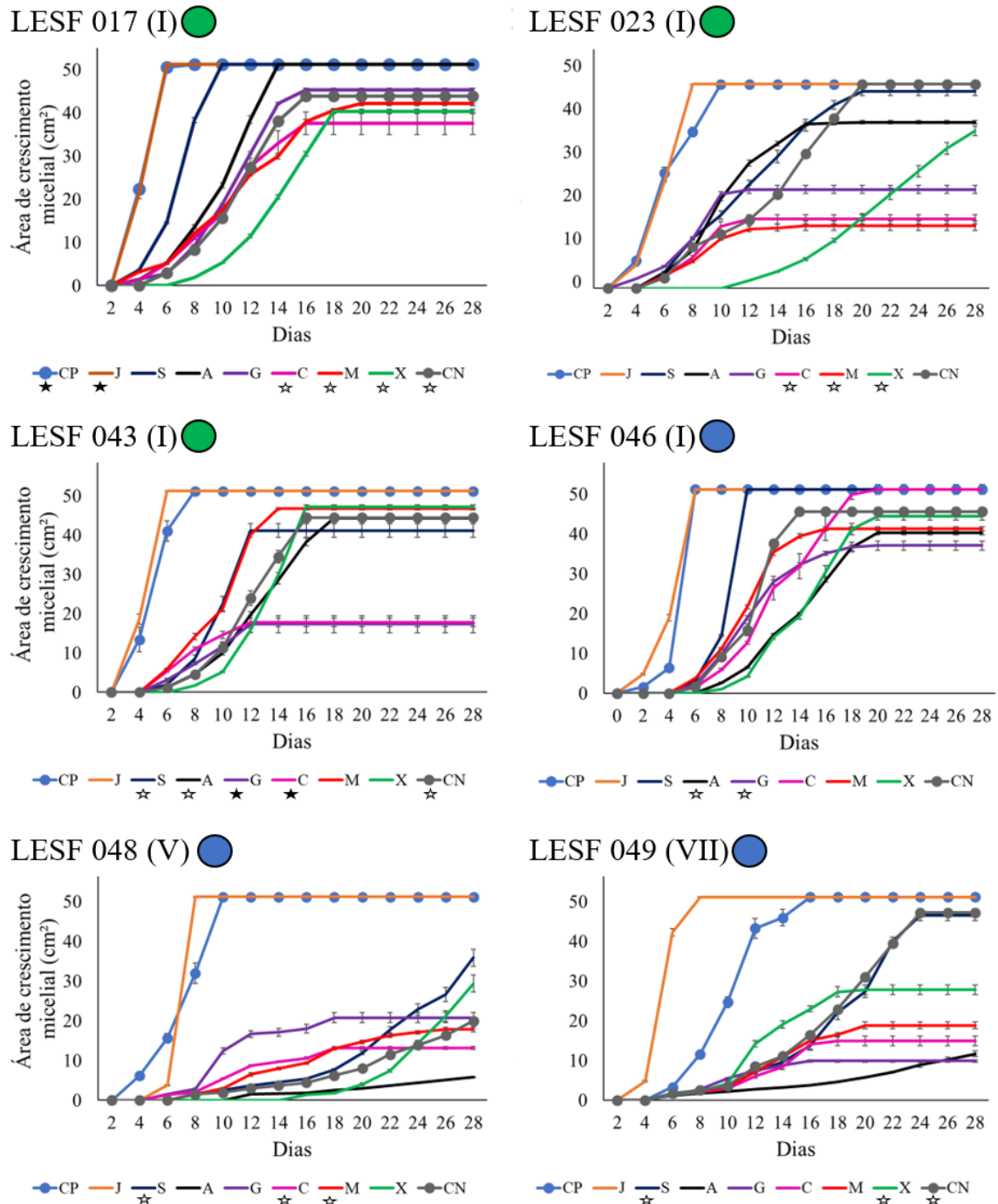
SOSA-CALVO, J.; SCHULTZ, T. R.; JEŠOVNIK, A.; DAHAN, R. A.; RABELING, C. Evolution, systematics, and natural history of a new genus of cryptobiotic fungus-growing ants. **Systematic Entomology**, Oxford, v. 43, n. 3, p. 549-567, 2018.

THROWER, L. B. Terminology for plant parasites. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 56, n. 3, p. 258-259, 1966.

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.

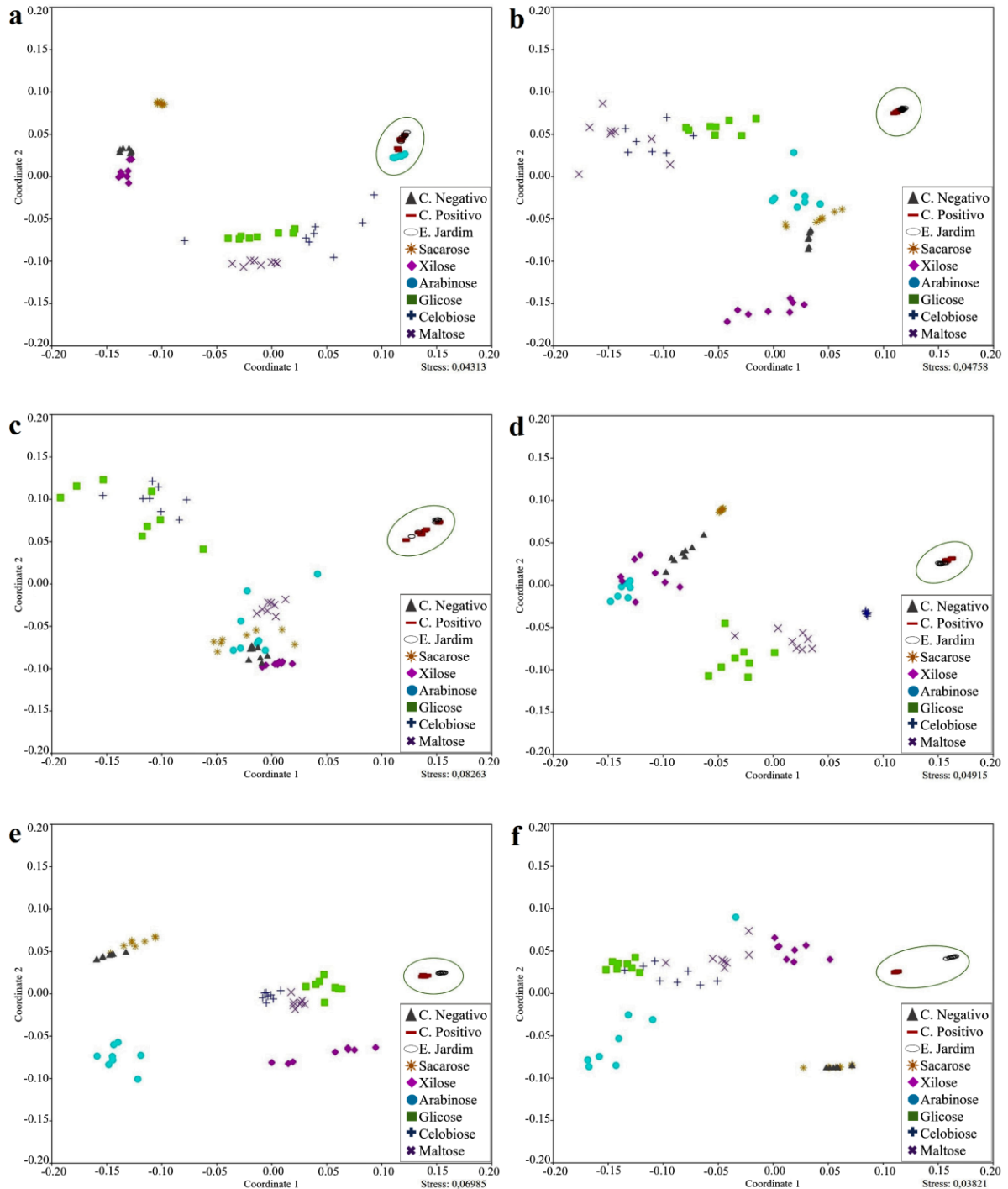
APÊNDICE

Figura A1 – Crescimento micelial (média, em cm²) de *Escovopsis* (LESF 017, LESF 023, LESF 043, LESF 046, LESF 048 e LESF 049) na presença de fontes simples de carbono, extrato bruto do jardim de fungo e controles positivo (PDA) e negativo (sem fonte). Os algarismos romanos indicam a qual clado cada isolado pertence, segundo a filogenia de Meirelles et al. (2015). Os círculos coloridos indicam a origem quanto ao grupo de formiga: verde – formigas cortadeiras e azul – formigas não-cortadeiras.



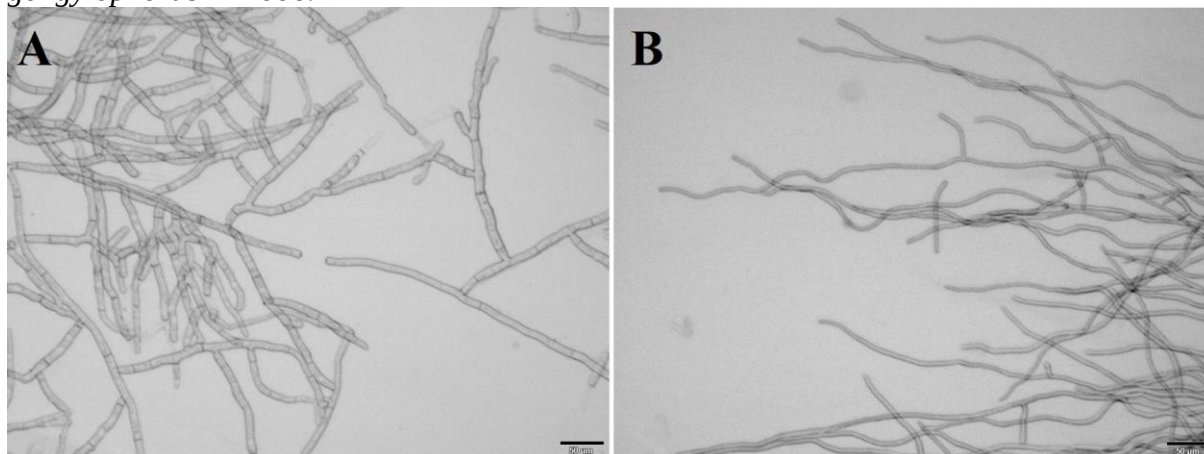
Tratamentos: CP: controle positivo; J: extrato do jardim; S: sacarose; A: arabinose; G: glicose; C: celobiose; M: maltose; X: xilose; CN: controle negativo. As estrelas representam os tratamentos que não diferiram entre si (comparações pareadas pós F1-LD-F1, $P < 0,05$).

Figura A2. Desenvolvimento de seis isolados de *Escovopsis* em nove tratamentos diferentes, analisado por escalonamento multidimensional não-métrico. Os círculos verdes apontam os tratamentos que não diferiram do controle positivo (crescimento ótimo). *Escovopsis* (a) LESF 017, (b) LESF 023, (c) LESF 043, (d) LESF 046, (e) LESF 048 e (f) LESF 049.



Fonte: autora

Figura A3. Crescimento micelial de (A) *Escovopsis* sp. LESF 017 e (B) *Leucoagaricus gongylophorus* FF2006.



Fonte: autora

Tabela A1. Índices de crescimento* dos fungos mutualistas cultivados por *Atta sexdens* (formiga cortadeira).

Tratamentos	FF2006			JSP07		
	Bom	Ruim	Controle Negativo	Bom	Ruim	Controle Negativo
LESF 017	0,84 ± 0,07	0,73 ± 0,04	0,43 ± 0,12	0,70 ± 0,08	0,52 ± 0,13	0,74 ± 0,06
LESF 023	0,96 ± 0,05	1,13 ± 0,04	0,94 ± 0,10	0,72 ± 0,06	0,80 ± 0,06	0,77 ± 0,04
LESF 043	0,64 ± 0,06	0,41 ± 0,07	0,14 ± 0,07	0,25 ± 0,11	0,23 ± 0,02	0,43 ± 0,03
LESF 046	0,53 ± 0,09	0,44 ± 0,04	0,50 ± 0,14	0,12 ± 0,07	0,42 ± 0,05	0,77 ± 0,07
LESF 048	0,85 ± 0,11	1,01 ± 0,10	0,59 ± 0,07	0,14 ± 0,03	0,31 ± 0,05	0,59 ± 0,06
LESF 049	0,38 ± 0,02	0,39 ± 0,03	0,36 ± 0,08	0,34 ± 0,07	0,55 ± 0,06	0,42 ± 0,10

Fonte: autora

* [(área final co-cultivo – área inicial co-cultivo)/(área final controle – área inicial controle)]

Tabela A2. Índices de crescimento* dos fungos mutualistas cultivados por *Trachymyrmex tucumanus* (formiga não-cortadeira).

Tratamentos	Trachy			Trachy 2		
	Bom	Ruim	Controle Negativo	Bom	Ruim	Controle Negativo
LESF 017	0,56 ± 0,08	0,86 ± 0,12	0,89 ± 0,17	0,60 ± 0,04	0,73 ± 0,09	0,87 ± 0,07
LESF 023	1,13 ± 0,21	0,90 ± 0,13	0,91 ± 0,12	0,88 ± 0,10	0,82 ± 0,04	0,87 ± 0,13
LESF 043	0,67 ± 0,23	0,81 ± 0,17	1,17 ± 0,32	0,85 ± 0,07	0,64 ± 0,04	1,06 ± 0,11
LESF 046	0,13 ± 0,09	0,28 ± 0,14	0,36 ± 0,08	0,34 ± 0,01	0,36 ± 0,06	0,30 ± 0,15
LESF 048	0,59 ± 0,06	0,50 ± 0,08	0,53 ± 0,13	0,08 ± 0,08	0,28 ± 0,04	0,22 ± 0,09
LESF 049	0,65 ± 0,13	0,71 ± 0,03	0,76 ± 0,17	0,37 ± 0,05	0,65 ± 0,06	0,77 ± 0,09

Fonte: autora

* [(área final co-cultivo – área inicial co-cultivo)/(área final controle – área inicial controle)]

Tabela A3. Índices de crescimento* dos isolados de *Escovopsis* frente aos fungos mutualistas cultivados por *Atta sexdens* (formiga cortadeira).

Tratamentos	FF2006			JSP07		
	Bom	Ruim	Controle Negativo	Bom	Ruim	Controle Negativo
LESF 017	0,82 ± 0,09	1,15 ± 0,06	1,08 ± 0,01	0,98 ± 0,06	0,91 ± 0,07	0,96 ± 0,08
LESF 023	0,27 ± 0,06	1,69 ± 0,55	0,32 ± 0,02	0,79 ± 0,12	1,40 ± 0,28	0,84 ± 0,13
LESF 043	2,80 ± 0,67	1,85 ± 0,31	1,53 ± 0,15	1,04 ± 0,03	1,34 ± 0,15	1,00 ± 0,06
LESF 046	3,70 ± 0,13	2,88 ± 0,43	2,14 ± 0,15	3,71 ± 0,17	1,79 ± 0,23	2,14 ± 0,15
LESF 048	1,04 ± 0,09	1,28 ± 0,11	1,06 ± 0,11	2,28 ± 0,15	1,94 ± 0,07	1,85 ± 0,17
LESF 049	3,22 ± 0,25	2,96 ± 0,48	4,15 ± 0,51	2,45 ± 0,23	1,15 ± 0,27	1,18 ± 0,21

Fonte: autora

* [(área final co-cultivo – área inicial co-cultivo)/(área final controle – área inicial controle)]

Tabela A4. Índices de crescimento* dos isolados de *Escovopsis* frente aos fungos mutualistas cultivados por *Trachymyrmex tucumanus* (formiga não-cortadeira).

Tratamentos	Trachy			Trachy 2		
	Bom	Ruim	Controle Negativo	Bom	Ruim	Controle Negativo
LESF 017	0,28 ± 0,05	0,93 ± 0,14	0,51 ± 0,06	0,44 ± 0,05	0,26 ± 0,03	0,35 ± 0,04
LESF 023	0,43 ± 0,06	0,59 ± 0,06	0,47 ± 0,05	0,35 ± 0,03	0,26 ± 0,04	0,24 ± 0,02
LESF 043	0,30 ± 0,02	0,74 ± 0,02	0,58 ± 0,07	0,61 ± 0,05	0,30 ± 0,05	0,21 ± 0,02
LESF 046	1,36 ± 0,24	3,28 ± 0,33	1,71 ± 0,07	4,15 ± 0,28	3,04 ± 0,31	1,66 ± 0,19
LESF 048	1,21 ± 0,23	3,72 ± 0,13	1,37 ± 0,16	2,36 ± 0,37	3,72 ± 0,13	2,24 ± 0,42
LESF 049	0,56 ± 0,17	1,07 ± 0,22	0,75 ± 0,13	2,04 ± 0,27	0,47 ± 0,14	1,07 ± 0,37

Fonte: autora

* [(área final co-cultivo – área inicial co-cultivo)/(área final controle – área inicial controle)]