

---

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

---

**BRUNA CRISTINA CUSTODIO**

**PARASITISMO DE *ESCOVOPSIS* FRENTE AO  
FUNGO CULTIVADO PELAS FORMIGAS  
ATÍNEAS BASAIS**



Rio Claro  
2016

BRUNA CRISTINA CUSTODIO

PARASITISMO DE *ESCOVOPSIS* FRENTE AO FUNGO CULTIVADO  
PELAS FORMIGAS ATÍNEAS BASAIS

Orientador: Prof. Dr. André Rodrigues

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Instituto de Biociências da Universidade  
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,  
Campus de Rio Claro, para obtenção do grau de  
Bacharela em Ciências Biológicas

Rio Claro  
2016

589.2 Custodio, Bruna Cristina  
C987p Parasitismo de Escovopsis frente ao fungo cultivado pelas  
formigas atíneas basais / Bruna Cristina Custodio. - Rio Claro,  
2016  
50 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

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

1. Fungos. 2. Interação. 3. Simbiose. 4. Antagonismo. 5.  
Fungos filamentosos. 6. Inseto. I. Título.

*Dedico esse trabalho ao meu pai, Gilmar  
(in memoriam), que viverá eternamente  
em meu coração como o grande herói da  
minha vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço especialmente aos meus pais, que dedicaram suas vidas para me proporcionarem boas oportunidades. Minha mãe, minha melhor amiga, 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 Prof. Dr. André Rodrigues, que teve um papel essencial no meu enriquecimento pessoal e profissional, sendo o responsável pela maior parte do meu conhecimento adquirido durante os últimos três anos de minha graduação. Aos colegas do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos – LESF, por todos os momentos compartilhados e toda a ajuda que recebi dos mesmos. Agradeço em especial às minhas queridas amigas, Irina e Lorena, que me apoiaram e me auxiliaram nos momentos mais difíceis.

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

Por fim, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), agradeço pela concessão da bolsa de iniciação científica (Processo FAPESP n. 2015/15299-7) e pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento desse trabalho.

## RESUMO

As formigas da tribo Attini apresentam como principal característica o cultivo de fungos como alimento. Nessa associação, o fungo fornece os nutrientes necessários para a colônia e, em contrapartida, as formigas garantem a proteção e dispersão do seu parceiro. Fungos do gênero *Escovopsis* são parasitas específicos do fungo cultivado pelas formigas. Estudos prévios mantiveram o foco em linhagens de *Escovopsis* sp. que parasitam o fungo cultivado pelas formigas cortadeiras (saúvas e quenquéns), as atíneas mais derivadas da tribo. No entanto, poucos estudos exploraram as interações de *Escovopsis* sp. com fungos cultivados pelas atíneas basais que compreendem a maior diversidade de espécies de formigas da tribo. Nosso grupo de pesquisa descreveu a primeira espécie de *Escovopsis* (*E. kreiselii*) proveniente de colônias dessas atíneas, contudo, a patogenicidade e virulência desse fungo permanece desconhecida. Com experimentos *in vitro*, investigamos a patogenicidade e especificidade de *E. kreiselii* e de outros isolados de *Escovopsis* sp. frente aos fungos cultivados por uma atínea basal. Todos os *Escovopsis* sp. investigados inibiram os fungos mutualistas de *Mycetophylax morschi*, além disso, exibiram graus variados de especificidade com seus hospedeiros. O presente estudo reuniu informações inéditas sobre a biologia desses importantes fungos, o que preencheu a lacuna no conhecimento sobre a interação de *Escovopsis* sp. com as formigas atíneas basais e seus fungos.

**Palavras chave:** Interação. Simbiose. Antagonismo. Fungos Filamentosos. Inseto.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1-</b> Esquema geral do bioensaio com chance de escolha com <i>Escovopsis</i> sp. LESF312 no primeiro dia após inoculação.....	21
<b>Figura 2-</b> Árvore filogenética de <i>Escovopsis</i> sp. baseada nas sequências de <i>tefl</i> , ITS e LSU analisados com o algoritmo de Inferência Bayesiana.....	23
<b>Figura 3-</b> Crescimento micelial dos isolados de <i>Escovopsis</i> sp. e do fungo mutualista AR02 no sétimo dia de bioensaio de antagonismo.....	30
<b>Figura 4-</b> Crescimento micelial relativo do fungo mutualista AR01 frente a cada isolado de <i>Escovopsis</i> sp., com 3 dias de confronto (A), 7 dias de confronto (B) e 14 dias de confronto (C).....	33
<b>Figura 5-</b> Crescimento relativo do fungo mutualista AR02 frente a cada isolado de <i>Escovopsis</i> sp., com 3 dias de confronto (A), 7 dias de confronto (B) e 14 dias de confronto (C).....	34
<b>Figura 6-</b> Bioensaio com chance de escolha das dez linhagens do parasita <i>Escovopsis</i> sp. frente a três fungos mutualistas.....	36
<b>Figura 7-</b> Crescimento micelial de <i>Escovopsis kreiselii</i> LESF 053 no 23º dia de bioensaio (duas réplicas experimentais, réplicas 2 e 7, respectivamente).....	41

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Origem dos fungos <i>Escovopsis</i> sp. utilizados no estudo. Com exceção do isolado LESF 315, obtido de colônia de <i>Atta sexdens rubropilosa</i> (saúva), os demais são provenientes de colônias de <i>Mycetophylax morschi</i> .....	17
<b>Tabela 2-</b> Área de crescimento micelial (em cm <sup>2</sup> ) do fungo mutualista ( <i>Leucocoprinus</i> sp. AR01), na ausência e presença do parasita <i>Escovopsis</i> sp.....	26
<b>Tabela 3-</b> Área de crescimento micelial em (cm <sup>2</sup> ) dos isolados de <i>Escovopsis</i> sp., na ausência e presença do fungo mutualista ( <i>Leucocoprinus</i> sp. AR01).....	27
<b>Tabela 4-</b> Área de crescimento micelial em (cm <sup>2</sup> ) do fungo mutualista ( <i>Leucocoprinus</i> sp. AR02), na ausência e presença do parasita <i>Escovopsis</i> sp.....	28
<b>Tabela 5-</b> Área de crescimento micelial em (cm <sup>2</sup> ) dos isolados de <i>Escovopsis</i> sp., na ausência e presença do fungo mutualista ( <i>Leucocoprinus</i> sp. AR02).....	29
<b>Tabela 6-</b> Distância (em cm) entre o micélio de <i>Escovopsis</i> sp. e o final das quatro extremidades da placa de Petri.....	39

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	8
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO</b> .....	10
2.1 Relação entre as formigas atíneas e o fungo mutualista.....	10
2.2 O gênero <i>Escovopsis</i> e a interação com o fungo cultivado pelas formigas atíneas.....	11
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	15
3.1 Objetivo geral.....	15
3.2 Objetivos específicos.....	15
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	16
4.1 Origem do material biológico e manutenção das culturas.....	16
4.2 Caracterização molecular de <i>Escovopsis</i> sp.....	17
4.3 Bioensaios de antagonismo de <i>E. kreiselii</i> e outros isolados de <i>Escovopsis</i> sp.....	18
4.4 Bioensaios com chance de escolha.....	20
<b>5 RESULTADOS</b> .....	22
5.1 Caracterização molecular dos isolados de <i>Escovopsis</i> sp.....	22
5.2 Bioensaios de antagonismo.....	24
5.3 Bioensaios com chance de escolha.....	35
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	42
<b>7 CONSIDERAÇÕES</b> .....	47
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	48

## 1 INTRODUÇÃO

As formigas pertencentes à tribo Attini (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae) apresentam como principal característica o cultivo de fungos como alimento. A associação entre as formigas e o fungo cultivado é considerada um mutualismo obrigatório, pois ambos os organismos apresentam adaptações recíprocas para viverem em conjunto, garantindo a estabilidade da interação. Nesse mutualismo, o fungo fornece os nutrientes necessários para a colônia, principalmente para as larvas desses insetos. Em contrapartida, as formigas garantem a proteção e dispersão do parceiro fúngico, além de proverem o substrato vegetal para o cultivo deste.

A maioria das espécies da tribo Attini cultiva o fungo no interior de câmaras subterrâneas; entretanto, algumas constroem ninhos diretamente na superfície do solo (sendo esses recobertos por folhas) ou em troncos de árvores em decomposição. Independente da arquitetura do ninho, as atíneas cultivam o fungo mutualista em uma estrutura conhecida como “jardim de fungo”, constituída por micélio fúngico e fragmentos de substrato vegetal coletado pelas operárias. As formigas cortadeiras (gêneros *Atta* e *Acromyrmex*) são as atíneas mais derivadas da tribo e utilizam folhas e flores frescas como substrato para seus jardins de fungo. Devido ao hábito de forrageamento, as formigas cortadeiras são consideradas pragas agrícolas na América do Sul e na América Central. Por outro lado, a maioria das espécies de formigas atíneas não é considerada praga, pois utilizam substratos diversificados, como carcaças de insetos e sementes para o cultivo do fungo.

É sabido que os jardins de fungo dessas formigas abrigam um microbioma complexo. Além do fungo mutualista, outros micro-organismos podem ser encontrados nesse substrato, destacando-se bactérias, leveduras e fungos filamentosos. A diversidade encontrada de micro-organismos nas colônias das formigas atíneas, bem como a relação desses insetos com o fungo cultivado, faz dessa interação uma das mais fascinantes da natureza.

Dentre os micro-organismos encontrados nos jardins das atíneas, fungos do gênero *Escovopsis* são considerados parasitas específicos do fungo mutualista. Alguns estudos avaliaram aspectos evolutivos do parasitismo de *Escovopsis* sp. e demonstraram que este ataca o micélio do fungo mutualista, atuando como um micoparásita. Colônias infectadas com *Escovopsis* sp. apresentam retardo no desenvolvimento do jardim, levando-a eventualmente à morte.

Durante duas décadas os estudos relacionados com o gênero *Escovopsis* mantiveram o foco apenas em linhagens advindas de jardins de formigas cortadeiras, as atíneas mais derivadas da tribo e que ocasionam impacto econômico significativo, consequentemente, as mais estudadas. Por outro lado, iniciativas do nosso grupo de pesquisa no sentido de desvendar a diversidade genética de *Escovopsis* sp. encontrados nos jardins das atíneas basais, culminaram, em 2015, na descrição da primeira espécie de *Escovopsis* (*E. kreiselii*) isolada a partir de colônia de uma atínea basal (*Mycetophylax morschi*). Entretanto, nenhum estudo foi realizado quanto as interações ecológicas dessa espécie de *Escovopsis*, abrindo uma lacuna para estudos que visem entender os aspectos da interação com o fungo mutualista das atíneas basais. Baseado em estudos prévios com *Escovopsis* sp. que parasitam o fungo das formigas cortadeiras, a hipótese do presente trabalho é que isolados desse fungo advindos de jardins de atíneas basais também sejam parasitas (pelo fato do gênero *Escovopsis* constituir um grupo monofilético). Nesse contexto, pretendemos responder as seguintes perguntas: (i) Fungos do gênero *Escovopsis* isolados a partir de jardins de fungo de atíneas basais (incluindo *E. kreiselii*) são parasitas? (ii) Tais fungos apresentam especificidade ao hospedeiro (fungo mutualista) cultivado pelas atíneas basais? (iii) Existem outras espécies de *Escovopsis* associadas às atíneas basais não conhecidas pela ciência? Para tanto, foram realizados experimentos *in vitro* para a avaliação da interação e especificidade destes micro-organismos, bem como a caracterização molecular dos isolados.

O presente estudo é de extrema importância, pois reuniu informações inéditas quanto a ecologia de *E. kreiselii*, espécie recém descrita do gênero *Escovopsis* e de outras linhagens desse fungo advindas de colônias de atíneas basais. Entender o antagonismo de *Escovopsis* sp. frente ao hospedeiro e a diversidade filogenética do parasita são os primeiros passos para futuros estudos que visem utilizá-lo como biocontrole das formigas cortadeiras.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO

### 2.1 Relação entre as formigas atíneas e o fungo mutualista

A tribo Attini compreende formigas que cultivam fungos para alimentação. Considerada um grupo monofilético, a tribo compreende 17 gêneros e aproximadamente 257 espécies distribuídas na região neotropical, desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (MEHDIABADI; SCHULTZ, 2010; BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES; SANHUDO, 2011; SOSA-CALVO et al., 2013). As formigas dessa tribo ocupam diferentes biomas, tais como a Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Cerrado até regiões extremas, como desertos. De acordo com análises moleculares, estima-se que a fungicultura na tribo Attini surgiu há 50 milhões de anos (SCHULTZ; BRADY, 2008). Os fungos mutualistas são cultivados por esses insetos em diferentes tipos de substratos. As espécies de atíneas consideradas basais na classificação filogenética, utilizam carcaças de insetos mortos, fezes de insetos e folhas secas para o crescimento fúngico (CURRIE, 2001; SCHULTZ; BRADY, 2008). Em contrapartida, as formigas cortadeiras (gêneros *Acromyrmex* e *Atta*), consideradas as mais derivadas da tribo, utilizam folhas e flores frescas para o cultivo do fungo (SCHULTZ; BRADY, 2008; CARLOS et al., 2011).

A maioria dos fungos mutualistas pertence à família Agaricaceae (Basidiomycota, tribo Leucocoprinae) (MUELLER et al., 1998). Entretanto, o gênero *Apterostigma* compreende um grupo de 34 espécies de formigas - grupo “*pilosum*” - que cultiva fungos da família Pterulaceae (Basidiomycota), conhecidos como fungos coral (ou *coral fungi*; SCHULTZ; BRADY, 2008). Tal caso é o único reportado na tribo onde ocorreu a substituição de fungos mutualistas fora da família Agaricaceae. Nos outros gêneros de atíneas basais ocorre uma maior diversidade genética dos cultivares mutualistas, quando comparado com os fungos cultivados pelas formigas cortadeiras. Essas últimas cultivam uma única espécie de fungo mutualista, denominada *Leucoagaricus gongylophorus* (PAGNOCCA et al., 2001; MIKHEYEV et al., 2006).

Segundo Schultz e Brady (2008), a fungicultura das formigas da tribo Attini pode ser dividida em cinco sistemas de “agricultura”, segundo o tipo de fungo que cultivam e outras características ecológicas das formigas: 1) a fungicultura das Attini basais, praticada pela maioria das espécies da tribo, abriga formigas que cultivam fungos basidiomicetos (da tribo Leucocoprineae). Esses fungos também são

encontrados fora do jardim de fungo (i.e. em vida livre), o que sugere que a associação formiga-fungo nesse tipo de agricultura foi permeada por várias aquisições de fungos de vida livre durante a evolução. Nessa fungicultura inclui também a única espécie de *Apterostigma* (*A. auriculatum*) que cultivava esses fungos; 2) a fungicultura praticada pelas formigas do “grupo *Apterostigma pilosum* Mayr” compreende o cultivo dos fungos corais (Pterulaceae), que inclui fungos relacionados filogeneticamente com os gêneros *Pterula* e *Deflexula*; 3) a fungicultura de fungos leveduriformes (Leucocoprineae), praticada pelas espécies do “grupo *Cyphomyrmex rimosus*”; 4) a fungicultura das formigas Attini derivadas, praticada por dois gêneros, *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex*, que também cultivam fungos da tribo Leucocoprineae e 5) a fungicultura das formigas cortadeiras, praticada pelos gêneros *Acromyrmex* e *Atta*, que cultivam o fungo basidiomiceto, *L. gongylophorus*.

Diferente das espécies de atíneas basais da tribo, as formigas cortadeiras utilizam folhas e flores frescas para o cultivo do fungo mutualista (SCHULTZ; BRADY, 2008) e, por esse motivo, são consideradas pragas agrícolas, principalmente nos países da América Latina. Devido à importância econômica, as formigas cortadeiras são as mais estudadas dentre as atíneas.

## 2.2 O gênero *Escovopsis* e a interação com o fungo cultivado pelas formigas atíneas

Além do fungo mutualista é sabido que existe uma diversidade de outros micro-organismos presentes nos jardins de fungo das formigas atíneas, tais como bactérias, leveduras e fungos filamentosos (CURRIE et al., 1999; RODRIGUES et al., 2008, 2011, 2014). Para muitos desses micro-organismos ainda não se conhece o real papel na simbiose formiga-fungo. Entretanto, alguns são considerados transitórios nos jardins, ou seja, sem uma função específica.

Fungos do gênero *Escovopsis* são considerados parasitas especializados do fungo cultivado pelas formigas (CURRIE et al., 1999). Reynolds e Currie (2004) sugerem que *Escovopsis* sp. atue como um parasita necrotrófico, secretando metabólitos ativos que destroem as hifas do fungo mutualista, com posterior utilização dos produtos resultantes dessa quebra. Embora os autores tenham sido os pioneiros a demonstrar a ação de *Escovopsis* sp., o mecanismo do parasitismo ainda não está totalmente esclarecido, devido à falta de estudos e evidências experimentais concretas para

entender os mecanismos físicos e/ou químicos de ação do parasita (MARFETÁN et al., 2015).

O gênero *Escovopsis* foi descrito em 1990 baseado em uma única espécie, *E. weberi*. A segunda espécie do gênero, *E. aspergilloides*, foi descrita em 1995 por Seifert e colaboradores. Durante duas décadas não houve estudos taxonômicos nesse grupo. Entretanto, em 2013, Augustin e colaboradores descreveram três espécies novas: *E. microspora*, *E. moelleri* e *E. lentecrescens*, oriundas de colônias de formigas cortadeiras. Recentemente, nosso grupo de pesquisa descreveu *E. kreiselii*, a primeira espécie de *Escovopsis* a partir de jardins de fungo de atíneas basais (*Mycetophylax morschi*, MEIRELLES et al. 2015a). Em estudos posteriores de nosso grupo, Masiulionis et al. (2015) descreveram *E. trichodermoides*, a segunda espécie de *Escovopsis* advinda de uma colônia de atínea basal. Segundo Currie et al. (2003), *Escovopsis* sp. coevoluiu com o fungo cultivado pelas formigas da tribo Attini desde os primórdios da origem da fungicultura, há cerca 50 milhões de anos. Durante a evolução dessa associação, a seleção natural levou a uma especificidade de *Escovopsis* sp. e o fungo mutualista cultivado pelos diferentes grupos de formigas (i.e. as diferentes fungiculturas). Gerardo et al. (2006) investigaram diferentes isolados de *Escovopsis* sp. frente aos fungos mutualistas de *Apterostigma* spp. Os autores sugeriram que *Escovopsis* sp. isolados de *Apterostigma* parasitam mais facilmente o fungo mutualista que ele ataca na natureza (ou seja os cultivares de *Apterostigma*); porém, quando a mesma linhagem de *Escovopsis* sp. é disposta frente a fungos mutualistas que não encontraria na natureza (i. e. pertencentes à outras formigas atíneas), ocorre um fraco parasitismo por parte do parasita. É importante notar que *Apterostigma* cultiva fungos filogeneticamente diversos, com algumas espécies de formigas que cultivam fungos da tribo Leucocoprineae e outras que cultivam representantes da família Pterulaceae, fato que reforça a co-diversificação de *Escovopsis* sp. com seus hospedeiros.

A maioria dos trabalhos sobre *Escovopsis* sp. manteve o foco na relação com o fungo mutualista cultivado pelas formigas cortadeiras, devido à grande importância econômica desses insetos. Taerum e colaboradores (2007) e Rodrigues e colaboradores (2008) demonstraram que linhagens de *Escovopsis* sp. que infectam jardins das formigas cortadeiras formam dois grupos geneticamente distintos. No entanto, linhagens de ambos os clados podem infectar jardins de fungo tanto de *Atta*, quanto de *Acromyrmex* (pois cultivam a mesma espécie de fungo mutualista, *L. gongylophorus*). Conforme observado por Taerum, Cafaro e Currie (2010), colônias de formigas

cortadeiras podem apresentar infecções por diferentes linhagens de *Escovopsis* sp. simultaneamente, reforçando a baixa especificidade desse parasita dentro do grupo das formigas cortadeiras. Recentemente, Wallace e colaboradores (2014) realizaram um estudo da correlação entre a virulência e a estrutura genética de diversas linhagens de *Escovopsis* sp. oriundas de colônias de atíneas dos gêneros *Atta*, *Acromyrmex*, *Apterostigma* e *Trachymyrmex* da Costa Rica. Os resultados mostraram que alguns isolados apresentam maior resistência aos mecanismos de defesa das formigas e do fungo mutualista do que outros. Curiosamente, as linhagens mais virulentas agruparam em um clado bem definido (monofilético). A falta de um padrão geográfico sugere que genótipos do parasita não são adaptados a um local em particular, o que pode acontecer devido à baixa variação genética ou ao parasita migrar demasiadamente longe e de maneira rápida, impedindo a especialização em populações locais. Entretanto, o estudo de Wallace et al. (2014) sugere que existem variações genotípicas suficientes que estão correlacionadas com linhagens que apresentam virulências diferentes.

Man e colaboradores (2015) sequenciaram o genoma de uma linhagem de *E. weberi*, isolada a partir de jardim de fungo de colônia de *Atta cephalotes*, uma formiga cortadeira. Os autores observaram que *E. weberi* apresenta um genoma reduzido, quando comparado com fungos relacionados filogeneticamente e menos especializados. Apesar de genes responsáveis pelo metabolismo primário terem sido mantidos, o genoma de *E. weberi* é empobrecido em enzimas ativas de carboidratos, fato consistente com a dependência de um hospedeiro que apresenta essas funções. Além disso, foram mantidos genes necessários para a produção de enzimas hidrolíticas (quitinases) e toxinas, um passo crítico para o ataque de seus hospedeiros.

Nosso grupo de pesquisa explorou as relações filogenéticas de várias linhagens de *Escovopsis* sp. advindas de diferentes espécies de atíneas (MEIRELLES et al., 2015b), o que culminou com a descrição de *E. kreiselii* (MEIRELLES et al. 2015a). A patogenicidade e virulência de *E. kreiselii* permanecem desconhecidas até o momento. De fato, existem poucos estudos com *Escovopsis* sp. associados aos jardins de fungo de atíneas basais.

Dois estudos de Gerardo e colaboradores (2004 e 2006) avaliaram *Escovopsis* sp. de atíneas basais e evidenciaram que linhagens desse fungo oriundas de colônias de *Apterostigma* e de *Cyphomyrmex* são mais atraídas pelo fungo mutualista que parasitam na natureza, e seu crescimento é mais lento frente aos fungos mutualistas filogeneticamente distintos dos seus hospedeiros naturais. Recentemente, Birnbaum e

colaboradores (2016) avaliaram os padrões filogenéticos e os fatores ecológicos responsáveis pela especificidade do parasitismo de *Escovopsis* sp. Através de diversos ensaios, variando a complexidade dos fatores envolvidos na interação parasita-hospedeiro (ensaios em jardins com microbioma diverso, com interação com as formigas e ensaios isolados com apenas o parasita e hospedeiro), concluíram que a fidelidade de linhagens de *Escovopsis* sp. com os fungos mutualistas é mediada por características tanto do parasita, quanto do hospedeiro, bem como pelas interações químicas entre eles. Tais estudos demonstraram que *Escovopsis* sp. genotipicamente similares parasitam um grupo de fungos mutualistas geneticamente próximos, enquanto que *Escovopsis* sp. genotipicamente diversos parasitam outros grupos de fungos mutualistas, ou seja, um cenário de co-diversificação bem diferente daquele descrito por Taerum et al. (2007) para as formigas cortadeiras.

Devido aos poucos estudos sobre antagonismo de *Escovopsis* sp. frente aos fungos cultivados por atíneas basais, este trabalho investigou as interações *in vitro* de *E. kreiselii* e de outros isolados de *Escovopsis* sp. obtidos de colônias de atíneas basais, com o fungo cultivado por essas formigas. Além disso, considerando os poucos estudos taxonômicos já realizados com *Escovopsis* sp. dessas atíneas (MEIRELLES et al. 2015a), nossa intenção foi caracterizar as linhagens utilizadas neste estudo devido ao grande potencial de serem espécies novas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a interação de *E. kreiselii* e de outras linhagens de *Escovopsis*, frente ao fungo mutualista cultivado pela formiga *Mycetophylax morschi* (uma atínea basal).

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a inibição do crescimento do fungo mutualista de *M. morschi* frente a linhagens de *Escovopsis* sp. isoladas de jardins de fungo desse inseto (*E. kreiselii* e outras linhagens).
- Avaliar se *E. kreiselii* e as demais linhagens de *Escovopsis* sp. apresentam preferência (especificidade) pelo fungo mutualista de *M. morschi* ou pelo fungo cultivado pelas formigas cortadeiras.
- Caracterizar as linhagens de *Escovopsis* sp. desse estudo (exceto *E. kreiselii*), visto que representam potenciais espécies novas desse gênero.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Origem do material biológico e manutenção das culturas

Foram utilizadas quatro linhagens de *E. kreiselii* e outros cinco isolados de *Escovopsis* sp. provenientes de colônias de *M. morschi* (Tabela 1). Todos os fungos foram obtidos durante o estudo de Meirelles e colaboradores (2015a), realizado em Florianópolis, SC. Adicionalmente, foi utilizado um isolado de *Escovopsis* que parasita colônias de atíneas derivadas (Tabela 1). Tal isolado foi escolhido para um estudo comparativo mais amplo com observação do comportamento deste isolado frente aos fungos mutualistas de atíneas basais. Os fungos estão depositados no acervo do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF/IB/UNESP/Rio Claro), em glicerol 10% à - 80 °C (suspensão de esporos) e em água destilada estéril (Castellani). Para a reativação dos fungos, os isolados foram retirados do ultrafreezer, dispostos em freezer à - 20 °C, durante 20 minutos, e mantidos em geladeira até seu completo descongelamento. A suspensão de esporos foi transferida para placas de Petri contendo meio BDA com cloranfenicol (150 µg mL<sup>-1</sup>) e foram incubadas à 25 °C no escuro, durante sete dias. As culturas axênicas foram transferidas para tubos contendo BDA inclinado com o mesmo antibiótico e armazenadas em geladeira (coleção de trabalho).

Para os bioensaios de co-cultivo foram utilizados dois isolados de *Leucocoprinus* sp., fungos mutualistas cultivado por *M. morschi* (AR01 e AR02), cada um obtido de uma colônia distinta. Para a realização do bioensaio de especificidade do parasitismo (item 4.4), foram utilizadas os dois isolados do cultivar de *M. morschi* e uma linhagem de *L. gongylophorus*, o fungo mutualista da atínea *A. sexdens rubropilosa* (uma formiga cortadeira). As linhagens do fungo mutualista de *M. morschi* estão mantidas no acervo do LESF e foram reativadas em meio A suplementado com aveia. A linhagem do fungo mutualista das formigas cortadeiras (FF2006), isolada de colônia de laboratório de *A. sexdens rubropilosa*, também está mantida no acervo do LESF e foi reativada no mesmo meio de cultivo e incubada à 25 °C, no escuro, durante 15 a 20 dias. Todos os fungos utilizados no estudo foram examinados periodicamente para garantir a pureza e vigor dos isolados para a realização dos experimentos.

**Tabela 1** - Origem dos fungos *Escovopsis* sp. utilizados no estudo. Com exceção do isolado LESF 315, obtido de colônia de *Atta sexdens rubropilosa* (saúva), os demais são provenientes de colônias de *Mycetophylax morschi*.

Código do isolado	Fungo	Cor do esporo	Código do ninho	Substrato	Local de coleta
LESF 310	<i>Escovopsis</i> sp.	Amarelo	AR140226-04	Jardim	Florianópolis, SC
LESF 311	<i>Escovopsis</i> sp.	Amarelo	AR140226-04	Lixo	Florianópolis, SC
LESF 312	<i>Escovopsis</i> sp.	Amarelo	AR140226-04	Jardim	Florianópolis, SC
LESF 313	<i>Escovopsis</i> sp.	Amarelo	AR140226-06	Jardim	Florianópolis, SC
LESF 314	<i>Escovopsis</i> sp.	Amarelo	AR140226-06	Jardim	Florianópolis, SC
LESF 053	<i>E. kreiselii</i>	Rosa	AR090306-01	Jardim	Florianópolis, SC
LESF 303	<i>E. kreiselii</i>	Rosa	AR140227-05	Jardim	Florianópolis, SC
LESF 305	<i>E. kreiselii</i>	Rosa	AR140226-01	Jardim	Florianópolis, SC
LESF 309	<i>E. kreiselii</i>	Rosa	AR140226-05	Jardim	Florianópolis, SC
LESF 315	<i>Escovopsis</i> sp.	Marrom	N68	Jardim	Botucatu, SP

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

#### 4.2 Caracterização molecular de *Escovopsis* sp.

As quatro linhagens de *E. kreiselii* utilizadas no estudo foram caracterizadas no trabalho de Meirelles e colaboradores (2015a). Portanto, neste trabalho foi realizada a caracterização molecular dos outros seis isolados de *Escovopsis* sp. (Tabela 1).

O DNA genômico foi extraído seguindo o método CTAB (MEIRELLES et al. 2015a). Em seguida, foi realizada a amplificação do gene que codifica para o fator alfa de alongação (*tefl*) com a utilização dos *primers* EF6-20F e EF6-1000RA (MEIRELLES et al., 2015a). As condições de reação no termociclador seguiram aquelas descritas no mesmo trabalho: desnaturação inicial à 96 °C durante 3 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação à 96 °C por 30s, anelamento à 61 °C por 45s e extensão a 72 °C por 1 min. Também foi amplificada a região ITS, com os *primers* ITS4 e ITS5 e o gene que codifica para a subunidade maior do ribossomo (28S do rRNA ou LSU) com os *primers* CLA-F e CLA-R. As condições de reação da amplificação também estão descritas em Meirelles et al. (2015a). A purificação dos *amplicons* foi realizada com o *kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega). Os *amplicons* purificados foram utilizados na reação de sequenciamento pelo método de Sanger empregando

*BigDye*<sup>®</sup> *Terminator* v. 3.1 (Life Technologies). As sequências geradas (*forward* e *reverse*) foram unidas em *contigs* no programa BioEdit v7.2.5 (HALL, 1999), sendo avaliada a qualidade dos *tracers*. As sequências foram comparadas com outras presentes na base de dados do NCBI – GenBank através da ferramenta BLASTn.

Análises filogenéticas foram realizadas para elucidar a afiliação taxonômica dos fungos utilizados. As sequências de *tef1*, ITS e LSU foram alinhadas separadamente utilizando o *software* MAFFT (KATO; STANDLEY, 2013). Posteriormente, os três alinhamentos foram concatenados no *software* Winclada v1.00.08. Em um primeiro momento, foram elaboradas árvores filogenéticas com o *software* MEGA v7.1 (TAMURA et al., 2013) seguindo o método de *Neighbor Joining* para escolha de *outgroups* e de outras sequências para a análise *a posteriori*. As árvores foram inferidas utilizando o modelo de substituição nucleotídica de Kimura 2-parâmetros com exclusão dos *gaps*. A robustez das árvores foi calculada através do método de *bootstrap* (utilizando 1.000 pseudoréplicas). Essa primeira parte denominamos de análise global.

Em um segundo momento, foram realizadas análises filogenéticas mais refinadas utilizando Inferência Bayesiana, com o *software* Mr. Bayes v. 3.2.6 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003). Utilizamos JmodelTest 2 (DARRIBA et al., 2012) para selecionar o melhor método de substituição nucleotídica para a análise. Os métodos escolhidos foram GTR+I+G para LSU e *tef1* e JC para ITS. Foram realizadas duas corridas independentes no *software* Mr. Bayes v. 3.2.6 e cada uma consistiu em uma amostragem de 2 milhões de gerações das Cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC). Houve convergência quando o desvio padrão das frequências de divisão apresentaram um valor abaixo de 0,01. Os primeiros 25% das gerações de MCMC foram descartados como *burn-in*.

#### 4.3 Bioensaios de antagonismo de *E. kreiselii* e outros isolados de *Escovopsis* sp.

Para responder a primeira pergunta sobre o potencial antagônico de *Escovopsis* sp. frente ao fungo cultivado pelas atíneas basais, foram realizados ensaios *in vitro* para avaliar o crescimento micelial do fungo mutualista na presença das diferentes linhagens de *Escovopsis* sp. (Tabela 1). Os experimentos seguiram os métodos propostos por Silva et al. (2006) e Moia (2014). Foram utilizados dois isolados do fungo mutualista cultivado por *M. morschi* (AR01 e AR02), previamente cultivados em meio BDA, a

partir do método de espalhamento micelial na superfície do meio e incubadas à 25 °C, durante 18 dias, no escuro.

Após incubação, discos de micélio (seis mm de diâmetro) do fungo mutualista foram inoculados a uma distância de 1,5 cm da borda das placas de Petri contendo meio BDA. Após 14 dias de incubação nessas placas à 25 °C, um disco de micélio (seis mm de diâmetro) de uma cultura de *Escovopsis* sp., previamente incubada em meio BDA, durante sete dias, foi inoculado a uma distância de 3 cm do micélio do fungo mutualista. As placas com os co-cultivos foram incubadas durante 14 dias à 25 °C. O fungo mutualista foi inoculado na placa de Petri com 14 dias de antecedência de *Escovopsis* sp., pois apresenta um crescimento micelial muito lento e, se fosse inoculado ao mesmo tempo que *Escovopsis* sp., não apresentaria qualquer crescimento.

Placas controles foram inoculadas com o mesmo fungo mutualista utilizado nas placas com os co-cultivos, entretanto, nenhum isolado de *Escovopsis* sp. foi inoculado. Também foram realizadas placas controles para o crescimento de *Escovopsis* sp., as quais foram inoculadas com um disco de micélio do mesmo, na ausência do fungo mutualista. Esse controle foi realizado para verificar se o fungo mutualista apresentaria algum efeito no crescimento micelial de *Escovopsis* sp.

Foram realizadas combinações dos dez *Escovopsis* sp. com cada fungo mutualista, avaliadas separadamente, resultando num total de 20 bioensaios *in vitro*. Cada combinação contou com dez réplicas biológicas do confronto (i. e. 10 placas de um isolado de *Escovopsis* sp. frente a um dos fungos mutualistas). Somado a isso, as combinações contaram com dez réplicas biológicas para o controle do fungo mutualista, ou seja, na ausência do *Escovopsis* sp.; e dez réplicas biológicas para o controle do *Escovopsis* sp., na ausência do fungo das formigas. Sendo assim, cada uma das vinte combinações contou com 30 réplicas, portanto, o experimento todo resultou em 600 réplicas biológicas.

O crescimento radial das colônias do fungo mutualista e de *Escovopsis* sp. em todas as réplicas foi registrado em imagens digitalizadas (i.e. as placas de Petri foram digitalizadas em *scanner* HP Deskjet F2050, com 600 dpi de resolução). Além disso, as placas foram foto-documentadas (com câmera digital Sony DSC H100) nos intervalos de 0, 1, 3, 5, 7, 10 e 14 dias após inocular as culturas de *Escovopsis* sp. As áreas de crescimento micelial (em cm<sup>2</sup>) dos fungos mutualistas e dos isolados de *Escovopsis* sp. de todas as réplicas dos confrontos e controles, foram mensuradas no *software* ImageJ

(ABRAMOFF; MAGALHÃES; RAM, 2004). Em seguida todos os valores obtidos foram tabulados e organizados em planilhas do Microsoft Excel.

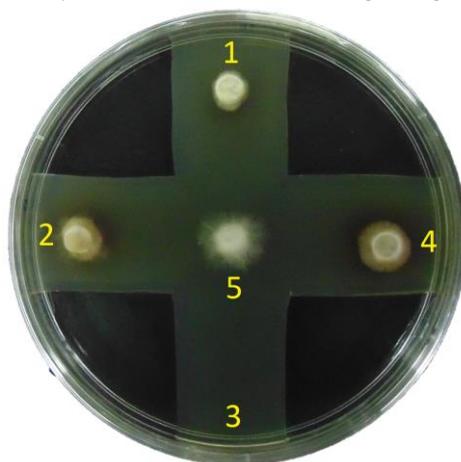
Posteriormente, realizamos dois tipos de análises: (i) Teste de Wilcoxon (equivalente ao Teste U de Mann-Whitney) – essa primeira análise foi realizada com o objetivo de comparar estatisticamente o crescimento micelial (em cm<sup>2</sup>) do fungo mutualista na presença (confronto) e na ausência (controle) de *Escovopsis* sp., em todos os dias registrados com *scanner*, realizando análises separadamente para cada dia. Além da análise com o crescimento micelial do fungo mutualista, também foi realizada a mesma análise considerando o crescimento micelial (em cm<sup>2</sup>) dos isolados de *Escovopsis* sp., com o objetivo de visualizar se havia diferença no crescimento dos mesmos na presença do fungo mutualista. Em seguida, realizamos o (ii) Teste de Kruskal-Wallis, com o objetivo de comparar a virulência entre os dez *Escovopsis* sp. Inicialmente, os dados foram normalizados (i. e. a área de crescimento micelial do mutualista mensurada em cada réplica biológica do confronto foi dividida pela média aritmética das áreas de crescimento micelial do mutualista mensuradas nas réplicas controle, para cada dia registrado). Os dados normalizados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, resultando em uma comparação entre as inibições de cada *Escovopsis* sp. Alguns valores do conjunto de dados (*outliers*) foram removidos devido à grande discrepância em relação aos demais dados.

#### 4.4 Bioensaios com chance de escolha

Esse experimento foi realizado na tentativa de responder a segunda pergunta do trabalho, ou seja, de verificar se há preferência de *E. kreiselii* e dos demais isolados de *Escovopsis* sp. frente a seu hospedeiro natural (i.e. fungo mutualista cultivado pela mesma espécie de atínea de onde o parasita foi isolado). O método seguiu o protocolo estabelecido em Gerardo et al. (2006). Placas de Petri (150 cm x 40 cm) contendo 80 ml de meio BDA foram preparadas de modo a montar faixas de meio de cultivo sólido no centro da placa, formando uma “cruz” de meio de cultivo (Figura 1). Em três extremidades da “cruz” foi inoculado um disco (6 mm de diâmetro) de micélio dos dois fungos mutualistas, originados de *M. morschi* (um isolado em cada uma das extremidades) e de *Atta sexdens rubropilosa* (em outra extremidade). Em uma extremidade da “cruz” não houve inóculo, pois foi o controle do experimento. Após inocular os fungos mutualistas, as placas foram incubadas durante sete dias à 25 °C, no

escuro. Em seguida, foi inoculado no centro da cruz, um disco de micélio (6 mm de diâmetro) de *Escovopsis* sp. (previamente cultivado em BDA, nas mesmas condições). As réplicas experimentais (n= 10 por isolado de *Escovopsis* sp.) foram incubadas durante 45 dias e a análise foi realizada pela visualização e comparação do crescimento de *Escovopsis* sp. em direção às quatro extremidades.

**Figura 1** - Esquema geral do bioensaio com chance de escolha com *Escovopsis* sp. LESF312 no primeiro dia após inoculação. 1 – linhagem do fungo mutualista das formigas cortadeiras (FF2006); 2 – isolado 1 do cultivar de *M. morschi* (AR01); 3 – controle negativo; 4 – isolado 2 do cultivar de *M. morschi* (AR02) e 5 – isolados de *Escovopsis* sp.



O crescimento micelial das colônias dos fungos mutualistas e do parasita em todas as réplicas foi registrado em imagens digitalizadas por *scanner* HP Deskjet F2050 (com 600 dpi de resolução). Além disso, as placas foram foto-documentadas com câmera digital (Sony DSC H100) em dias intercalados ao longo de toda a duração do experimento (45 dias).

A distância (em cm) entre o micélio do parasita *Escovopsis* sp. e o final de cada uma das extremidades da placa foi mensurada no *software* ImageJ v. 1.6.0\_24 (ABRAMOFF; MAGALHÃES; RAM, 2004). Em seguida, todos os valores obtidos foram tabulados e organizados em uma planilha do Microsoft Excel. Nesse software foram calculadas as médias das distâncias (considerando as dez réplicas) e calculados o erro padrão.

Posteriormente, realizamos a análise estatística dos dados com o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, no *software* R v3.3.1. Essa análise foi realizada com o objetivo de comparar a distância entre o micélio do parasita e o final de cada uma das extremidades.

## 5 RESULTADOS

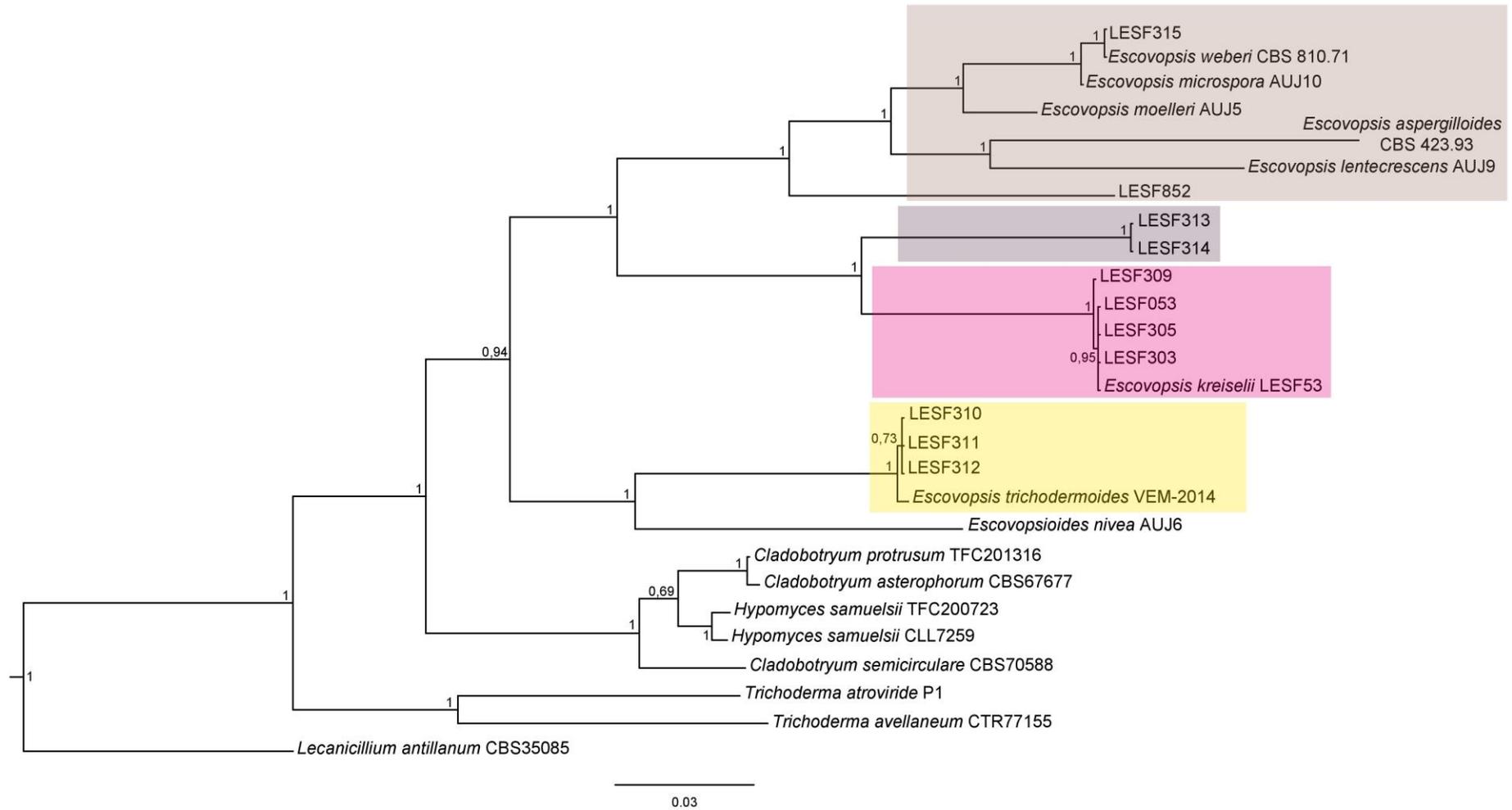
### 5.1 Caracterização molecular dos isolados de *Escovopsis* sp.

A partir da caracterização molecular obtivemos as sequências de *tef1*, ITS e LSU para todos os isolados utilizados no presente estudo (Figura 2). Baseado nas análises filogenéticas concluímos que os isolados LESF 313 e LESF 314 são uma potencial nova espécie filogenética, pois formaram um clado com probabilidade posterior de suporte de 1. Esses isolados não apresentaram diferenças nas três sequências analisadas, portanto, são idênticos. Os demais isolados de *Escovopsis* sp. sequenciados foram identificados como *E. trichodermoides*, com exceção do isolado LESF 315, obtido a partir de colônia da formiga cortadeira *A. sexdens rubropilosa* e identificado como *E. weberi*.

Como esperado, as quatro linhagens de *E. kreiselii* utilizadas no presente trabalho, provenientes de quatro colônias distintas de *M. morschi* (Tabela 1), foram agrupadas em um único clado na árvore filogenética. É importante ressaltar a distância filogenética das linhagens de *E. kreiselii* e do grupo monofilético dos isolados de *Escovopsis* sp. que são encontrados naturalmente associados a colônias de atíneas derivadas, como *E. weberi* (LESF 315). Tal distância corrobora com as grandes diferenças morfológicas (i. e. coloração dos esporos, presença e ausência de vesículas, velocidade de crescimento micelial, entre outros) e de interações frente a diferentes fungos mutualistas entre esses dois grupos de parasita.

No presente estudo avaliamos duas linhagens potencialmente pertencentes a uma espécie ainda desconhecida pela ciência (LESF 313 e LESF 314). Estas linhagens constituem um grupo irmão de *E. kreiselii* (Figura 2), no entanto, os dois grupos apresentam características morfológicas diferentes (coloração do esporo e velocidade de crescimento micelial), reforçando a hipótese de constituírem uma nova espécie do gênero *Escovopsis*.

**Figura 2** - Árvore filogenética de *Escovopsis* sp. baseada nas sequências de *tefl*, ITS e LSU analisados com o algoritmo de Inferência Bayesiana. Probabilidades posteriores (números nos ramos) foram obtidas com duas análises independentes compreendendo um milhão de gerações de cadeias de Markov – Monte Carlo. Os clados correspondentes aos táxons estudados estão destacados em cores. *Lecanicillium antillanum* foi utilizado como *outgroup*. Nome das espécies estão seguidos dos códigos depositados em coleções de cultura. Barra indica número de substituições por sítio.



## 5.2 Bioensaios de antagonismo

Com a análise estatística foi possível observar as diferenças entre o crescimento micelial dos dois fungos mutualistas (AR01 e AR02) na presença e na ausência de *Escovopsis* sp., bem como saber a partir de qual dia as diferenças foram significativas (Tabelas 2 e 3). Com exceção do isolado LESF 313, em todos os bioensaios houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o crescimento micelial do mutualista na presença e na ausência de *Escovopsis* sp. A influência do fungo mutualista no crescimento micelial dos isolados de *Escovopsis* sp. também foi analisada com esse mesmo teste estatístico (Tabelas 4 e 5).

Os resultados dos bioensaios demonstraram que *E. kreiselii* é um fungo que inibe o crescimento micelial de ambos os isolados do fungo mutualista de *M. morschi* (*Leucocoprinus* sp. AR01 e AR02). Além disso, *E. kreiselii* apresenta um crescimento micelial mais lento, quando comparado com os outros isolados de *Escovopsis* sp. utilizados nesse trabalho (Tabelas 4 e 5, Figura 3). Sendo assim, linhagens dessa espécie levam mais tempo para entrar em contato com o micélio do fungo mutualista e, com isso, a inibição leva mais tempo para ocorrer. Em ambos os bioensaios realizados com os fungos *Leucocoprinus* sp. AR01 e AR02, só houve diferença significativa entre o crescimento micelial desses mutualistas na presença e ausência das linhagens de *E. kreiselii* a partir do quinto, sétimo e, ainda, décimo dia de confronto (Tabelas 2 e 3). Esses foram os dias nos quais o micélio de *E. kreiselii* alcançou o micélio de *Leucocoprinus* sp.

As três linhagens de *E. trichodermoides* (LESF 310, LESF 311 e LESF 312) apresentaram o mesmo padrão de comportamento nos bioensaios, inibindo significativamente ambos os fungos mutualistas de *M. morschi*. Tais linhagens apresentaram crescimento micelial rápido, sendo capazes de tomar toda a placa de Petri em apenas três ou cinco dias, tanto na presença, quanto ausência do mutualista (Tabelas 3 e 4). Portanto, foram responsáveis pelas inibições com início mais rápido, quando comparado com as demais linhagens. Pode-se observar nas Tabelas 3 e 4 que as áreas de crescimento micelial dos fungos mutualistas na presença e ausência desses dois isolados apresentaram diferenças significativas desde o terceiro, quinto ou sétimo dia de confronto. Semelhante a essas linhagens, *Escovopsis* sp. LESF 314 também inibiu significativamente ambos os mutualistas. O crescimento micelial dos mutualistas em confronto com esse isolado diferiu significativamente do crescimento micelial das

réplicas controle a partir do quinto (*Leucocoprinus* sp. AR02) e sétimo (*Leucocoprinus* sp. AR01) dia de bioensaio. Finalmente, o isolado LESF 313 foi o único que não inibiu significativamente os fungos mutualistas de *M. morschi* em nenhum bioensaio.

Com relação à *E. weberi* (LESF 315), obtido de colônia de formiga cortadeira (uma atínea derivada), este inibiu ambos os fungos mutualistas de *M. morschi*. Entretanto, apesar de ter apresentado potencial antagônico, o isolado não foi capaz de impedir o crescimento dos fungos mutualistas, apenas os deixou mais lento. Mesmo na presença deste parasita, os fungos mutualistas continuaram crescendo até o décimo quarto dia (Tabelas 2 e 3), fato não observado nos demais bioensaios com *Escovopsis* sp. de atíneas basais utilizados neste estudo (com exceção de LESF 313).

Em relação ao crescimento micelial dos isolados de *Escovopsis* sp., observamos efeitos diversos quando na presença dos fungos mutualistas (Tabelas 4 e 5). Os isolados mais estimulados na presença dos fungos mutualistas foram aqueles pertencentes à *E. kreiselii* (Figura 3). A partir do terceiro dia de bioensaio, a área de crescimento micelial desses isolados foi significativamente maior na presença do mutualista, quando na ausência deste (controle). O micélio de *E. kreiselii* recobriu toda a placa de Petri no décimo dia de confronto com o fungo mutualista, enquanto que no controle, mesmo no décimo quarto dia o crescimento micelial não recobriu toda a extensão da placa. Semelhantemente, o isolado LESF 314 também teve seu crescimento estimulado pela presença dos fungos mutualistas, apresentando uma diferença significativa entre as réplicas confronto e controle, a partir do terceiro dia (Tabelas 4 e 5).

**Tabela 2** - Área de crescimento micelial (em cm<sup>2</sup>) do fungo mutualista (*Leucocoprinus* sp. AR01), na ausência e presença do parasita *Escovopsis* sp. (média ± erro padrão). Os valores destacados em negrito apresentaram diferenças significativa ( $p < 0,05$ ) segundo o teste de Wilcox.

Identificação	Linhagem	Tratamento	Dias							
			0	1	3	5	7	10	14	
<i>E. kreiselii</i>	LESF 053	C	9,97 ± 0,09	11,22 ± 0,18	13,28 ± 0,24	16,06 ± 0,19	18,71 ± 0,19	<b>22,51 ± 0,25</b>	<b>27,73 ± 0,29</b>	
		E	10,11 ± 0,15	11,39 ± 0,15	13,59 ± 0,21	16,33 ± 0,21	18,20 ± 0,29	<b>19,13 ± 0,36</b>	<b>17,60 ± 0,56</b>	
	LESF 303	C	10,19 ± 0,17	11,37 ± 0,25	13,86 ± 0,25	<b>16,56 ± 0,33</b>	<b>18,96 ± 0,43</b>	<b>22,47 ± 0,40</b>	<b>27,45 ± 0,47</b>	
		E	9,69 ± 0,15	11,05 ± 0,23	13,23 ± 0,29	<b>15,42 ± 0,24</b>	<b>17,21 ± 0,27</b>	<b>17,26 ± 0,17</b>	<b>17,24 ± 0,16</b>	
	LESF 305	C	10,19 ± 0,17	11,37 ± 0,25	13,86 ± 0,25	16,56 ± 0,33	<b>18,96 ± 0,43</b>	<b>22,47 ± 0,40</b>	<b>27,45 ± 0,47</b>	
		E	10,15 ± 0,17	11,51 ± 0,16	13,89 ± 0,19	16,23 ± 0,17	<b>17,02 ± 0,25</b>	<b>17,27 ± 0,25</b>	<b>17,08 ± 0,29</b>	
	LESF 309	C	10,00 ± 0,29	10,82 ± 0,33	14,32 ± 0,46	15,60 ± 0,52	<b>19,55 ± 0,44</b>	<b>22,56 ± 0,46</b>	<b>27,78 ± 0,29</b>	
		E	10,00 ± 0,19	10,92 ± 0,25	14,67 ± 0,35	15,61 ± 0,40	<b>17,33 ± 0,53</b>	<b>17,22 ± 0,44</b>	<b>16,48 ± 0,38</b>	
	<i>E. trichodermoides</i>	LESF 310	C	9,97 ± 0,09	11,22 ± 0,18	13,28 ± 0,24	16,06 ± 0,19	<b>18,71 ± 0,19</b>	<b>22,51 ± 0,25</b>	<b>27,73 ± 0,29</b>
			E	10,37 ± 0,19	11,48 ± 0,22	13,71 ± 0,33	15,85 ± 0,32	<b>15,98 ± 0,30</b>	<b>15,69 ± 0,24</b>	<b>13,92 ± 0,67</b>
		LESF 311	C	9,97 ± 0,09	11,22 ± 0,18	13,28 ± 0,24	16,06 ± 0,19	<b>18,71 ± 0,19</b>	<b>22,51 ± 0,25</b>	<b>27,73 ± 0,29</b>
			E	9,84 ± 0,17	10,98 ± 0,18	13,44 ± 0,30	15,87 ± 0,65	<b>16,61 ± 0,62</b>	<b>15,83 ± 0,59</b>	<b>14,52 ± 0,59</b>
LESF 312	C	10,00 ± 0,29	10,82 ± 0,33	<b>14,32 ± 0,46</b>	<b>15,60 ± 0,52</b>	<b>19,55 ± 0,44</b>	<b>22,56 ± 0,46</b>	<b>27,78 ± 0,29</b>		
	E	10,13 ± 0,20	10,87 ± 0,29	<b>13,26 ± 0,47</b>	<b>13,56 ± 0,42</b>	<b>13,65 ± 0,36</b>	<b>13,49 ± 0,35</b>	<b>13,16 ± 0,35</b>		
<i>Escovopsis</i> sp.	LESF 313	C	10,00 ± 0,29	10,82 ± 0,33	14,32 ± 0,46	15,60 ± 0,52	19,55 ± 0,44	22,56 ± 0,46	27,78 ± 0,29	
		E	10,28 ± 0,19	11,06 ± 0,25	14,31 ± 0,23	15,95 ± 0,23	19,26 ± 0,26	21,96 ± 0,38	27,28 ± 0,28	
<i>E. weberi</i>	LESF 314	C	10,00 ± 0,29	10,82 ± 0,33	14,32 ± 0,46	15,60 ± 0,52	<b>19,55 ± 0,44</b>	<b>22,56 ± 0,46</b>	<b>27,78 ± 0,29</b>	
		E	9,79 ± 0,29	10,74 ± 0,31	14,12 ± 0,29	15,47 ± 0,39	<b>15,97 ± 0,26</b>	<b>15,55 ± 0,39</b>	<b>14,01 ± 0,98</b>	
<i>E. weberi</i>	LESF 315	C	10,19 ± 0,17	11,37 ± 0,25	13,86 ± 0,25	16,56 ± 0,33	<b>18,96 ± 0,43</b>	<b>22,47 ± 0,40</b>	<b>27,45 ± 0,47</b>	
		E	10,89 ± 0,22	12,17 ± 0,20	13,69 ± 0,21	15,27 ± 0,38	<b>16,01 ± 0,46</b>	<b>17,54 ± 0,50</b>	<b>21,37 ± 0,69</b>	

C – Controle (fungo mutualista na ausência do parasita); E – Experimento (fungo mutualista na presença do parasita).

**Tabela 3** - Área de crescimento micelial em (cm<sup>2</sup>) do fungo mutualista (*Leucocoprinus* sp. AR02), na ausência e presença do parasita *Escovopsis* sp. (média ± erro padrão). Os valores destacados em negrito apresentaram diferenças significativa ( $p < 0,05$ ) segundo o teste de Wilcox.

Identificação	Linhagem	Tratamento	Dias							
			0	1	3	5	7	10	14	
<i>E. kreiselii</i>	LESF 053	C	7,03 ± 0,05	7,79 ± 0,07	9,71 ± 0,12	11,45 ± 0,16	<b>14,48 ± 0,14</b>	<b>17,30 ± 0,16</b>	<b>21,84 ± 0,32</b>	
		E	6,96 ± 0,10	7,58 ± 0,10	9,43 ± 0,13	11,04 ± 0,24	<b>12,32 ± 0,48</b>	<b>12,69 ± 0,51</b>	<b>12,82 ± 0,45</b>	
	LESF 303	C	7,35 ± 0,14	8,27 ± 0,13	10,49 ± 0,17	12,34 ± 0,20	<b>14,67 ± 0,25</b>	<b>18,28 ± 0,36</b>	<b>22,22 ± 0,40</b>	
		E	7,63 ± 0,10	8,34 ± 0,14	10,75 ± 0,22	12,48 ± 0,22	<b>13,90 ± 0,30</b>	<b>14,51 ± 0,39</b>	<b>14,36 ± 0,50</b>	
	LESF 305	C	7,83 ± 0,23	8,60 ± 0,23	10,52 ± 0,30	14,15 ± 0,39	15,45 ± 0,44	<b>18,55 ± 0,36</b>	<b>23,00 ± 0,41</b>	
		E	7,91 ± 0,18	8,80 ± 0,25	10,74 ± 0,29	13,63 ± 0,20	15,01 ± 0,26	<b>15,79 ± 0,40</b>	<b>16,03 ± 0,52</b>	
	LESF 309	C	7,03 ± 0,05	8,19 ± 0,12	10,06 ± 0,17	12,12 ± 0,14	14,67 ± 0,12	<b>18,05 ± 0,15</b>	<b>21,99 ± 0,23</b>	
		E	6,96 ± 0,10	8,55 ± 0,17	10,47 ± 0,24	12,27 ± 0,24	14,74 ± 0,30	<b>14,82 ± 0,31</b>	<b>15,61 ± 0,28</b>	
	<i>E. trichodermoides</i>	LESF 310	C	7,03 ± 0,05	7,79 ± 0,07	9,71 ± 0,12	<b>11,45 ± 0,16</b>	<b>14,48 ± 0,14</b>	<b>17,30 ± 0,16</b>	<b>21,84 ± 0,32</b>
			E	7,34 ± 0,10	7,89 ± 0,13	9,17 ± 0,09	<b>9,14 ± 0,11</b>	<b>9,00 ± 0,20</b>	<b>8,64 ± 0,25</b>	<b>8,63 ± 0,23</b>
LESF 311		C	6,96 ± 0,08	7,72 ± 0,07	9,45 ± 0,12	11,24 ± 0,14	<b>13,21 ± 0,27</b>	<b>16,86 ± 0,21</b>	<b>21,59 ± 0,25</b>	
		E	7,11 ± 0,12	8,00 ± 0,10	9,46 ± 0,19	10,42 ± 0,36	<b>10,78 ± 0,45</b>	<b>10,34 ± 0,53</b>	<b>9,90 ± 0,58</b>	
LESF 312		C	7,03 ± 0,05	8,19 ± 0,12	10,06 ± 0,17	12,12 ± 0,14	<b>14,67 ± 0,12</b>	<b>18,05 ± 0,15</b>	<b>21,99 ± 0,23</b>	
		E	6,96 ± 0,10	8,97 ± 0,18	10,47 ± 0,31	11,43 ± 0,39	<b>11,36 ± 0,23</b>	<b>10,28 ± 0,19</b>	<b>9,53 ± 0,24</b>	
<i>Escovopsis</i> sp.	LESF 313	C	7,03 ± 0,05	8,19 ± 0,12	10,06 ± 0,17	12,12 ± 0,14	14,67 ± 0,12	18,05 ± 0,15	21,99 ± 0,23	
		E	6,96 ± 0,10	8,91 ± 0,21	10,87 ± 0,25	12,77 ± 0,26	15,06 ± 0,31	17,97 ± 0,25	21,47 ± 0,26	
	LESF 314	C	7,83 ± 0,23	8,60 ± 0,23	10,52 ± 0,30	<b>14,15 ± 0,39</b>	<b>15,45 ± 0,44</b>	<b>18,55 ± 0,36</b>	<b>23,00 ± 0,41</b>	
		E	7,55 ± 0,28	8,09 ± 0,22	9,87 ± 0,20	<b>10,73 ± 0,41</b>	<b>10,56 ± 0,61</b>	<b>9,93 ± 0,35</b>	<b>9,80 ± 0,54</b>	
<i>E. weberi</i>	LESF 315	C	7,35 ± 0,14	8,27 ± 0,13	<b>10,49 ± 0,17</b>	<b>12,34 ± 0,20</b>	<b>14,67 ± 0,25</b>	<b>18,28 ± 0,36</b>	<b>22,22 ± 0,40</b>	
		E	7,42 ± 0,19	8,27 ± 0,18	<b>9,15 ± 0,20</b>	<b>10,36 ± 0,35</b>	<b>11,96 ± 0,37</b>	<b>13,23 ± 0,59</b>	<b>14,25 ± 0,72</b>	

C – Controle (fungo mutualista na ausência do parasita); E – Experimento (fungo mutualista na presença do parasita).

**Tabela 4** - Área de crescimento micelial em (cm<sup>2</sup>) dos isolados de *Escovopsis* sp. (média ± erro padrão), na ausência e presença do fungo mutualista (*Leucocoprinus* sp. AR01). Os valores destacados em negrito apresentaram diferença significativa (p< 0,05) segundo o teste de Wilcox.

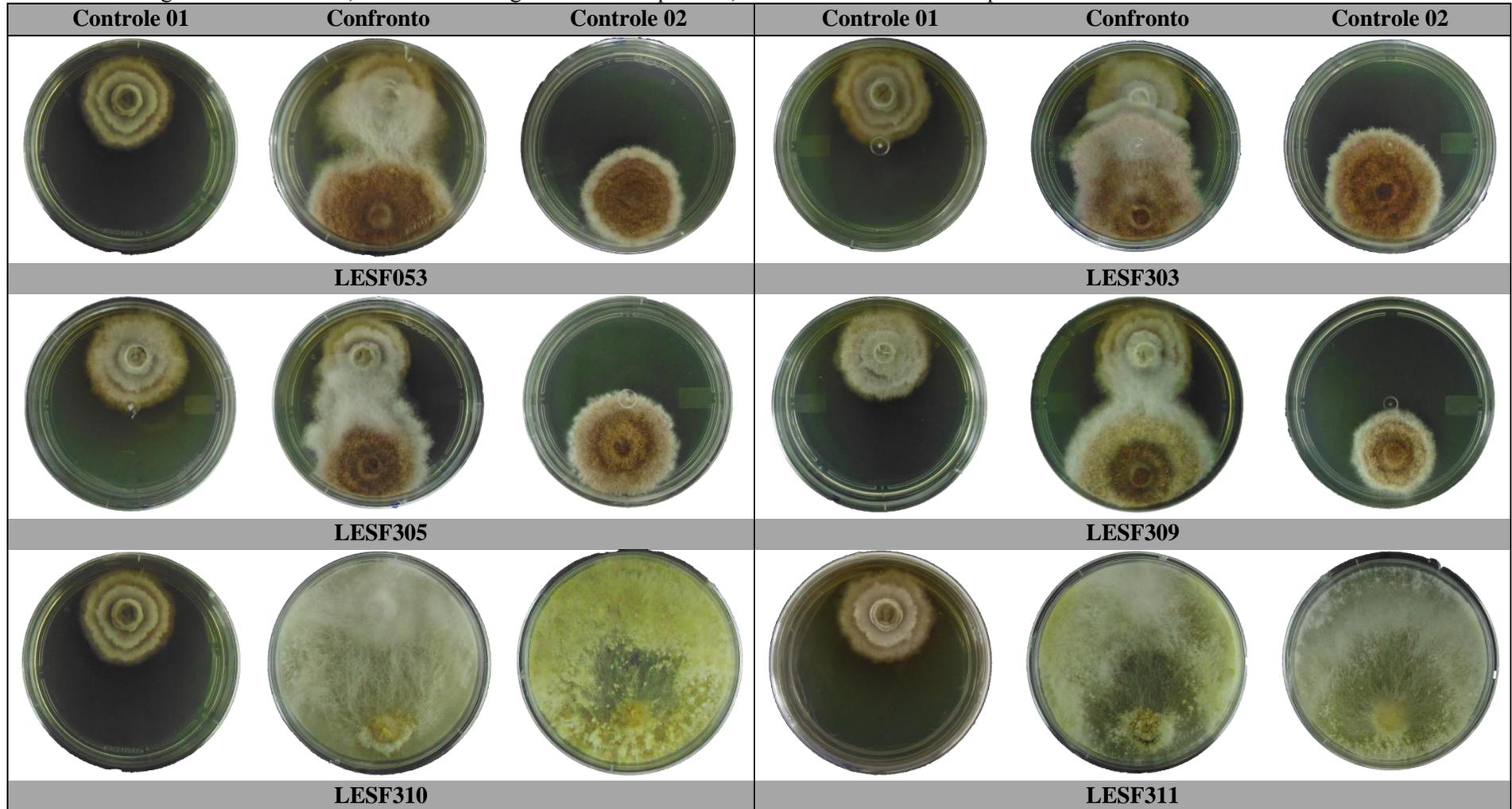
Identificação	Linhagem	Tratamento	Dias					
			1	3	5	7	10	14
<i>E. kreiselii</i>	LESF 053	C	1,20 ± 0,08	<b>3,08 ± 0,22</b>	<b>9,81 ± 0,39</b>	<b>15,36 ± 0,34</b>	<b>26,09 ± 0,67</b>	<b>39,90 ± 1,21</b>
		E	1,35 ± 0,16	<b>6,37 ± 0,25</b>	<b>16,98 ± 0,51</b>	<b>28,10 ± 0,74</b>	<b>52,45 ± 1,56</b>	<b>56,43 ± 0,00</b>
	LESF 303	C	1,05 ± 0,07	<b>3,79 ± 0,13</b>	<b>12,59 ± 0,45</b>	<b>15,96 ± 0,54</b>	<b>25,36 ± 0,86</b>	<b>39,44 ± 0,82</b>
		E	1,26 ± 0,08	<b>6,38 ± 0,60</b>	<b>16,00 ± 1,15</b>	<b>27,46 ± 1,40</b>	<b>51,05 ± 1,46</b>	<b>56,43 ± 0,00</b>
	LESF 305	C	1,02 ± 0,02	<b>3,23 ± 0,13</b>	<b>12,21 ± 0,58</b>	<b>15,67 ± 0,63</b>	<b>24,23 ± 0,88</b>	<b>38,63 ± 1,14</b>
		E	1,42 ± 0,12	<b>9,94 ± 0,53</b>	<b>22,92 ± 1,51</b>	<b>42,36 ± 2,75</b>	<b>53,42 ± 1,11</b>	<b>56,43 ± 0,00</b>
	LESF 309	C	1,00 ± 0,06	<b>6,44 ± 0,18</b>	<b>9,00 ± 0,23</b>	<b>17,72 ± 0,47</b>	<b>24,45 ± 0,38</b>	<b>30,24 ± 0,60</b>
		E	1,04 ± 0,05	<b>10,38 ± 0,50</b>	<b>19,30 ± 3,30</b>	<b>44,14 ± 3,96</b>	<b>53,24 ± 1,46</b>	<b>56,43 ± 0,00</b>
<i>E. trichodermoides</i>	LESF 310	C	4,34 ± 0,33	<b>36,27 ± 1,38</b>	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00
		E	4,00 ± 0,21	<b>27,92 ± 2,96</b>	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00
	LESF 311	C	2,90 ± 0,28	<b>26,76 ± 2,40</b>	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00
		E	3,07 ± 0,23	<b>19,55 ± 0,84</b>	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00
	LESF 312	C	3,00 ± 0,30	<b>52,64 ± 1,52</b>	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00
		E	2,43 ± 0,10	<b>50,16 ± 2,88</b>	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00
<i>Escovopsis</i> sp.	LESF 313	C	1,13 ± 0,04	<b>9,09 ± 0,39</b>	<b>13,57 ± 0,45</b>	<b>25,24 ± 0,77</b>	<b>33,97 ± 1,09</b>	<b>40,84 ± 1,31</b>
		E	1,10 ± 0,04	<b>6,88 ± 0,32</b>	<b>9,25 ± 0,40</b>	<b>15,78 ± 0,99</b>	<b>22,05 ± 1,16</b>	<b>26,68 ± 1,39</b>
	LESF 314	C	1,44 ± 0,12	<b>12,56 ± 0,64</b>	<b>18,36 ± 0,90</b>	<b>34,32 ± 0,96</b>	<b>44,76 ± 1,12</b>	<b>52,81 ± 1,43</b>
		E	1,69 ± 0,26	<b>17,97 ± 1,50</b>	<b>26,22 ± 1,76</b>	<b>53,08 ± 1,06</b>	<b>56,43 ± 0,00</b>	<b>56,43 ± 0,00</b>
<i>E. weberi</i>	LESF 315	C	11,74 ± 1,19	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00
		E	10,79 ± 0,44	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00

**Tabela 5** - Área de crescimento micelial em (cm<sup>2</sup>) dos isolados de *Escovopsis* sp. (média ± erro padrão), na ausência e presença do fungo mutualista (*Leucocoprinus* sp. AR02). Os valores destacados em negrito apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) segundo o teste de Wilcoxon.

Identificação	Linhagem	Tratamento	Dias					
			1	3	5	7	10	14
<i>E. kreiselii</i>	LESF 053	C	0,99 ± 0,02	<b>4,23 ± 0,17</b>	<b>7,97 ± 0,24</b>	<b>14,54 ± 0,30</b>	<b>23,63 ± 0,38</b>	<b>35,05 ± 0,66</b>
		E	1,32 ± 0,10	<b>9,23 ± 0,30</b>	<b>15,36 ± 0,66</b>	<b>25,38 ± 1,69</b>	<b>46,32 ± 3,9</b>	<b>56,43 ± 0,00</b>
	LESF 303	C	1,06 ± 0,07	<b>3,75 ± 0,14</b>	<b>12,37 ± 0,40</b>	<b>15,82 ± 0,53</b>	<b>24,91 ± 0,86</b>	<b>39,30 ± 0,84</b>
		E	1,31 ± 0,09	<b>11,45 ± 0,89</b>	<b>27,54 ± 2,15</b>	<b>33,45 ± 2,71</b>	<b>52,15 ± 2,01</b>	<b>56,43 ± 0,00</b>
	LESF 305	C	1,02 ± 0,02	<b>3,23 ± 0,13</b>	<b>12,21 ± 0,58</b>	<b>15,67 ± 0,63</b>	<b>24,23 ± 0,88</b>	<b>38,63 ± 1,14</b>
		E	1,11 ± 0,03	<b>5,76 ± 0,05</b>	<b>18,61 ± 0,50</b>	<b>24,50 ± 0,61</b>	<b>46,65 ± 1,96</b>	<b>56,43 ± 0,00</b>
	LESF 309	C	0,71 ± 0,01	<b>2,62 ± 0,10</b>	<b>6,02 ± 0,20</b>	<b>12,04 ± 0,40</b>	<b>19,90 ± 0,55</b>	<b>32,53 ± 0,74</b>
		E	0,79 ± 0,02	<b>4,87 ± 0,18</b>	<b>11,57 ± 0,41</b>	<b>21,56 ± 1,22</b>	<b>46,01 ± 3,76</b>	<b>56,43 ± 0,00</b>
<i>E. trichodermoides</i>	LESF 310	C	3,72 ± 0,12	<b>52,54 ± 1,91</b>	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00
		E	3,23 ± 0,14	<b>49,60 ± 1,92</b>	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00
	LESF 311	C	2,83 ± 0,28	<b>26,71 ± 2,36</b>	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00
		E	3,08 ± 0,25	<b>19,53 ± 0,89</b>	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00
	LESF 312	C	1,04 ± 0,04	<b>36,86 ± 1,10</b>	<b>53,97 ± 1,13</b>	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00
		E	0,82 ± 0,03	<b>30,89 ± 1,26</b>	<b>50,69 ± 1,75</b>	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00
<i>Escovopsis</i> sp.	LESF 313	C	0,78 ± 0,01	2,44 ± 0,09	6,56 ± 0,13	<b>13,99 ± 0,22</b>	<b>24,39 ± 0,56</b>	<b>38,80 ± 1,26</b>
		E	0,83 ± 0,04	2,68 ± 0,17	6,26 ± 0,25	<b>11,56 ± 0,19</b>	<b>19,81 ± 0,30</b>	<b>29,06 ± 0,67</b>
	LESF 314	C	3,79 ± 0,35	<b>28,03 ± 1,79</b>	<b>45,91 ± 1,18</b>	<b>49,79 ± 1,29</b>	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00
		E	3,33 ± 0,25	<b>23,92 ± 1,29</b>	<b>52,76 ± 1,11</b>	<b>54,84 ± 0,97</b>	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00
<i>E. weberi</i>	LESF 315	C	10,89 ± 0,55	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00
		E	10,98 ± 0,52	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00	56,43 ± 0,00

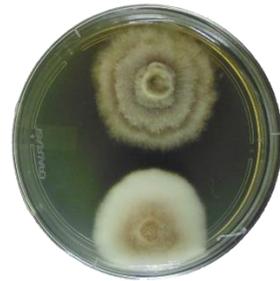
C – Controle (*Escovopsis* sp. na ausência do fungo mutualista); E – Experimento (*Escovopsis* sp. na presença do fungo mutualista).

**Figura 3** - Crescimento micelial dos isolados de *Escovopsis* sp. e do fungo mutualista *Leucocoprinus* sp. AR02 no sétimo dia de bioensaio. Controle 01 – controle do fungo mutualista AR02, Confronto – fungo mutualista e parasita; Controle 02 – controle do parasita.





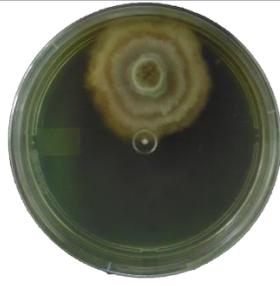
**LESF312**



**LESF313**



**LESF314**



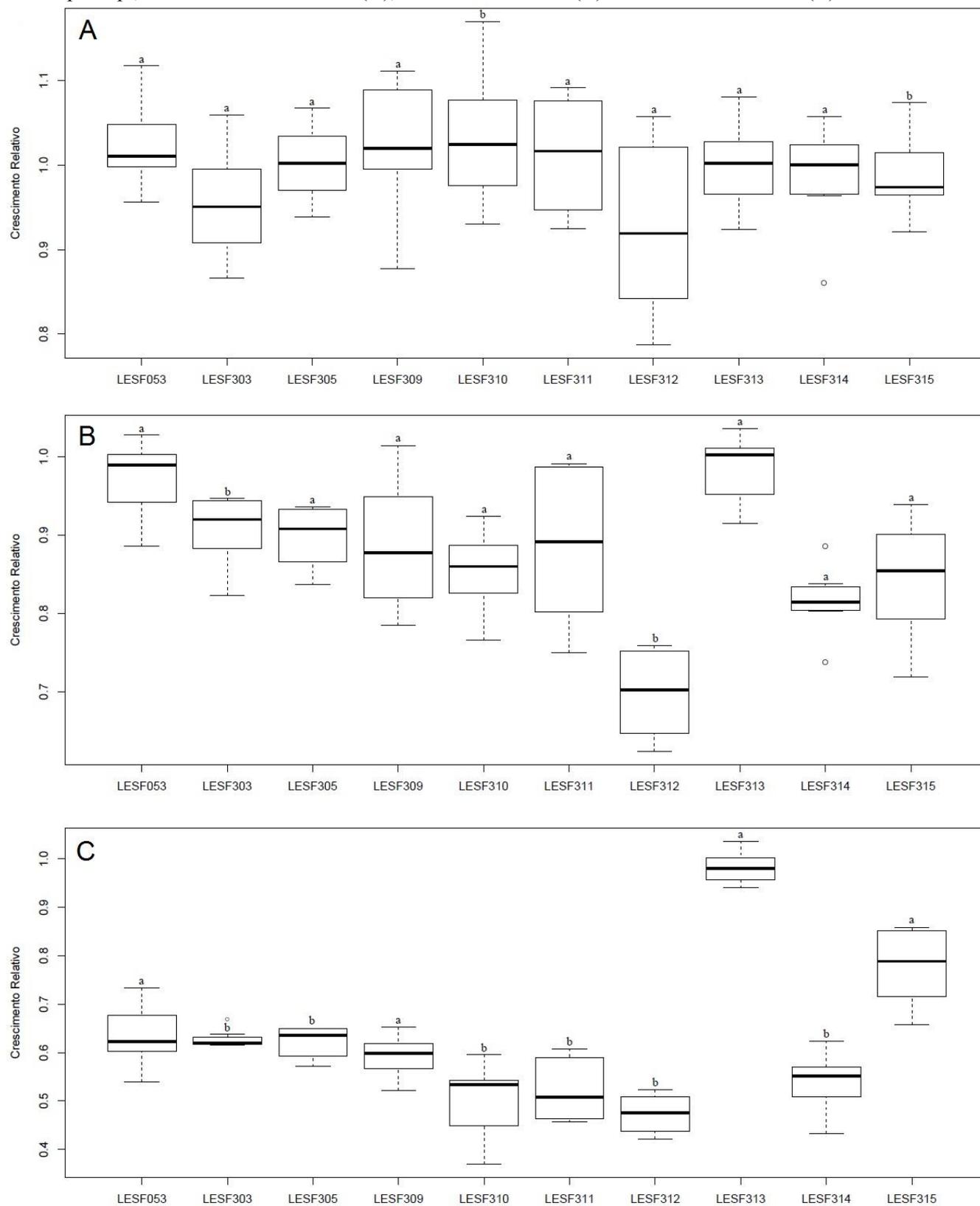
**LESF315**

Ao contrário do observado até então, as três linhagens de *E. trichodermoides* apresentaram um crescimento micelial maior nas réplicas controle do que nas réplicas com a presença do mutualista. Ainda assim, estes apresentaram alto potencial antagonista, com as maiores inibições encontradas no estudo. Já, o crescimento micelial da linhagem LESF 313 foi menor nas réplicas com confronto, do que nas réplicas controle, apresentando uma diferença significativa desde o terceiro dia de bioensaio (Figura 3).

O segundo teste realizado (Kruskal Wallis) mostrou que houve diferenças significativas de inibição do fungo mutualista entre as linhagens de *Escovopsis* sp., considerando os dois fungos mutualistas ( $p = 9.7 \times 10^{-8}$  para os bioensaios realizados com o fungo mutualista AR01 e  $p < 2.2 \times 10^{-16}$  para os bioensaios realizados com o fungo mutualista AR02).

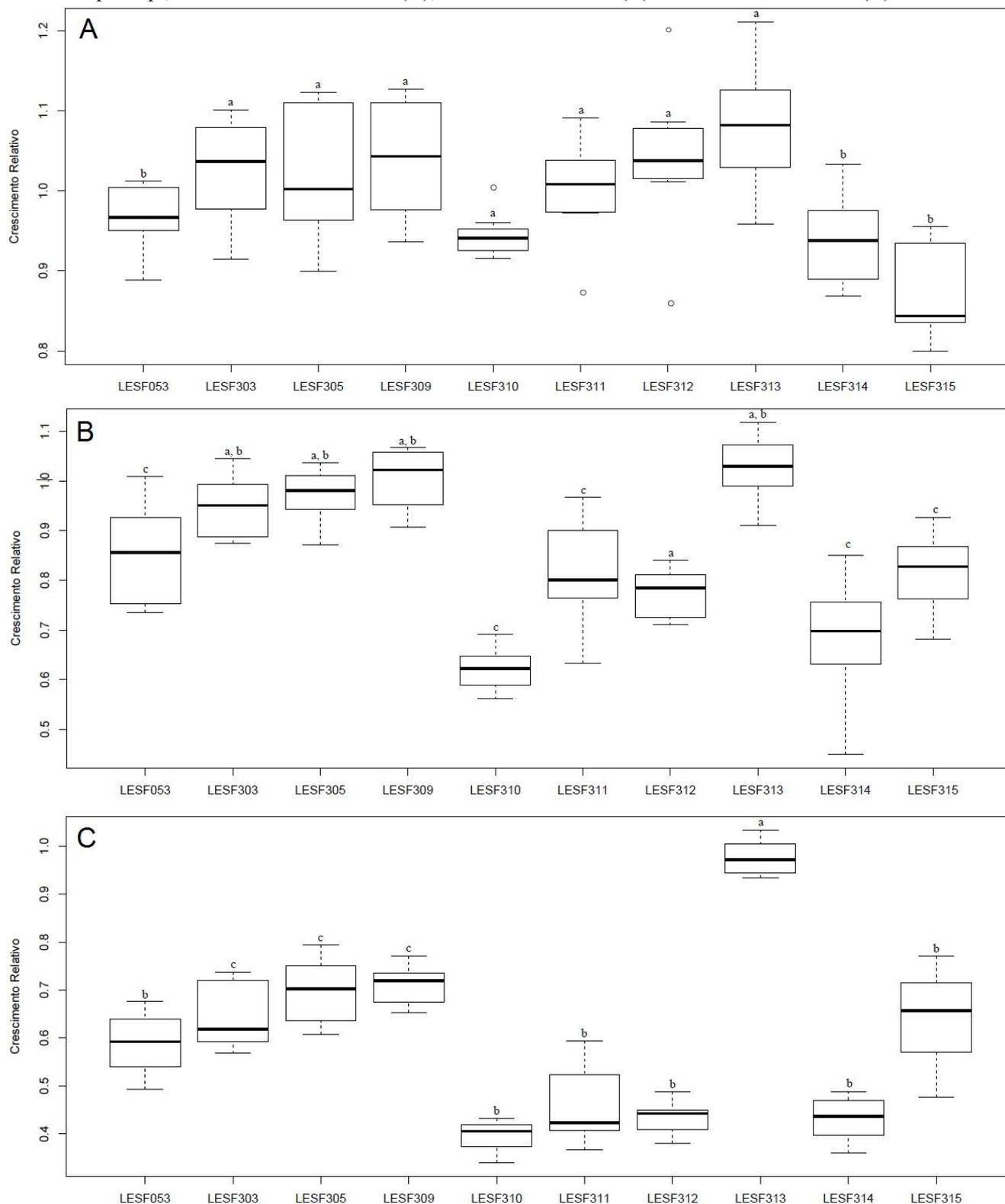
Os resultados obtidos mostram que a variação na inibição entre os dez isolados de *Escovopsis* sp. foi maior frente ao fungo mutualista AR02 (Figuras 4 e 5).

**Figura 4** - Crescimento micelial relativo do fungo mutualista *Leucocoprinus* sp. AR01 frente a cada isolado de *Escovopsis* sp., com 3 dias de confronto (A), 7 dias de confronto (B) e 14 dias de confronto (C).



Os códigos do eixo X (LESF) são os diferentes isolados de *Escovopsis* sp. (ver Tabela 1). A linhagem *E. weberi* LESF 315 foi isolada de colônia de formigas cortadeiras. Os círculos representam os *outliers* da análise.

**Figura 5** - Crescimento micelial relativo do fungo mutualista *Leucocoprinus* sp. AR02 frente a cada isolado de *Escovopsis* sp., com 3 dias de confronto (A), 7 dias de confronto (B) e 14 dias de confronto (C).



Os códigos do eixo X (LESF) são os diferentes isolados de *Escovopsis* sp. (ver Tabela 1). A linhagem *E. weberi* LESF 315 foi isolada de colônia de formigas cortadeiras. Os círculos representam os *outliers* da análise.

### 5.3 Bioensaio com chance de escolha

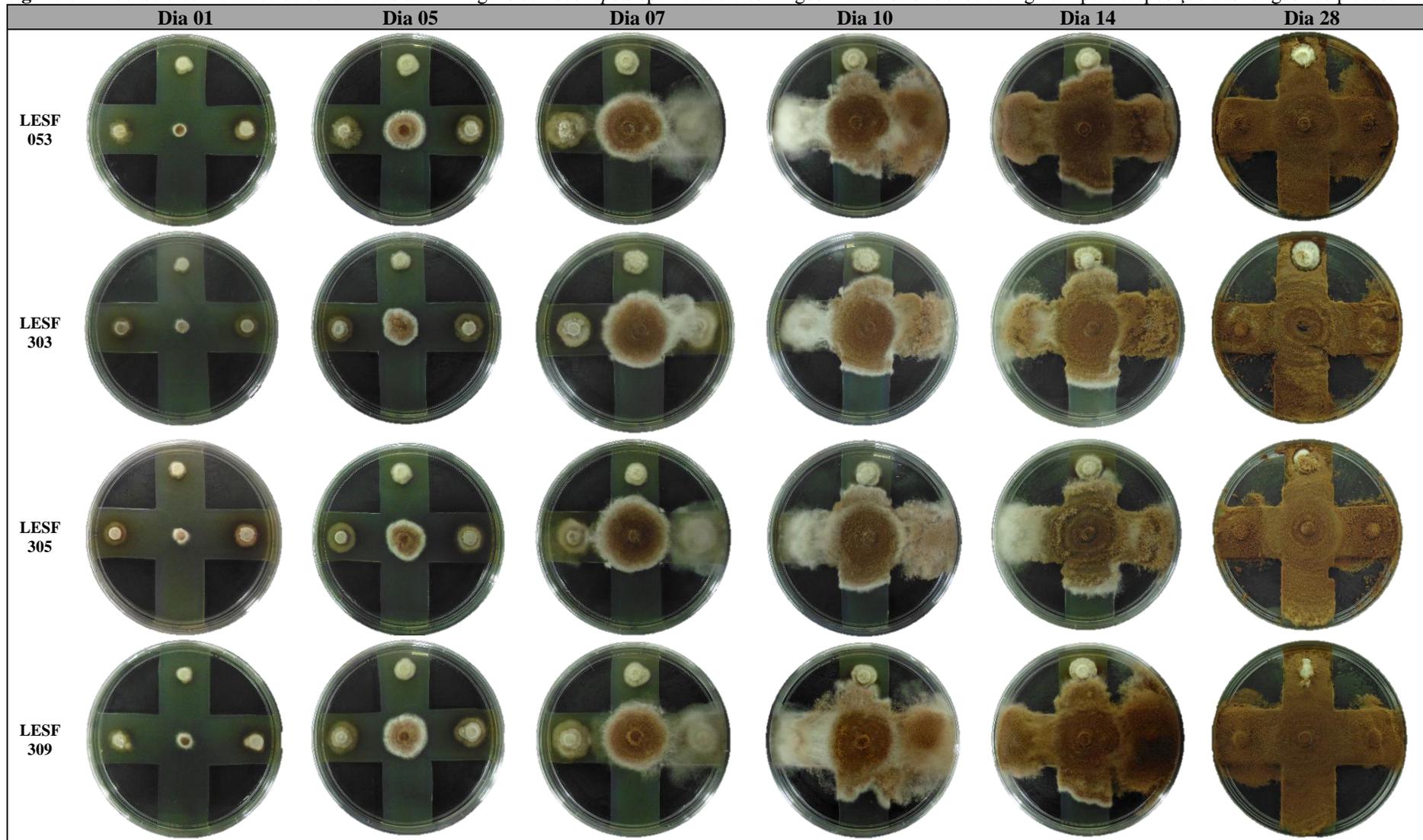
Foi possível separar os dez *Escovopsis* sp. em cinco grupos, cada um com comportamento distinto frente aos três fungos mutualistas. No primeiro grupo, encontram-se as quatro linhagens de *E. kreiselii*, que a partir do sétimo dia de bioensaio foi possível observar diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre as duas extremidades com fungos mutualistas de *M. morschi*, em comparação com as demais (Tabela 6 e Figura 6). Claramente houve um crescimento direcional do parasita aos cultivares de *M. morschi*, seus hospedeiros naturais (Figura 6). Além disso, não houve diferença significativa entre a extremidade controle e a com o cultivar das formigas cortadeiras.

No segundo grupo encontram-se as três linhagens de *E. trichodermoides*, que apresentaram um comportamento “generalista”, onde não houve crescimento direcional para nenhuma extremidade das placas (Figura 6). Assim, não houve diferenças significativas na análise estatística do presente bioensaio para as três linhagens desta espécie (Tabela 6).

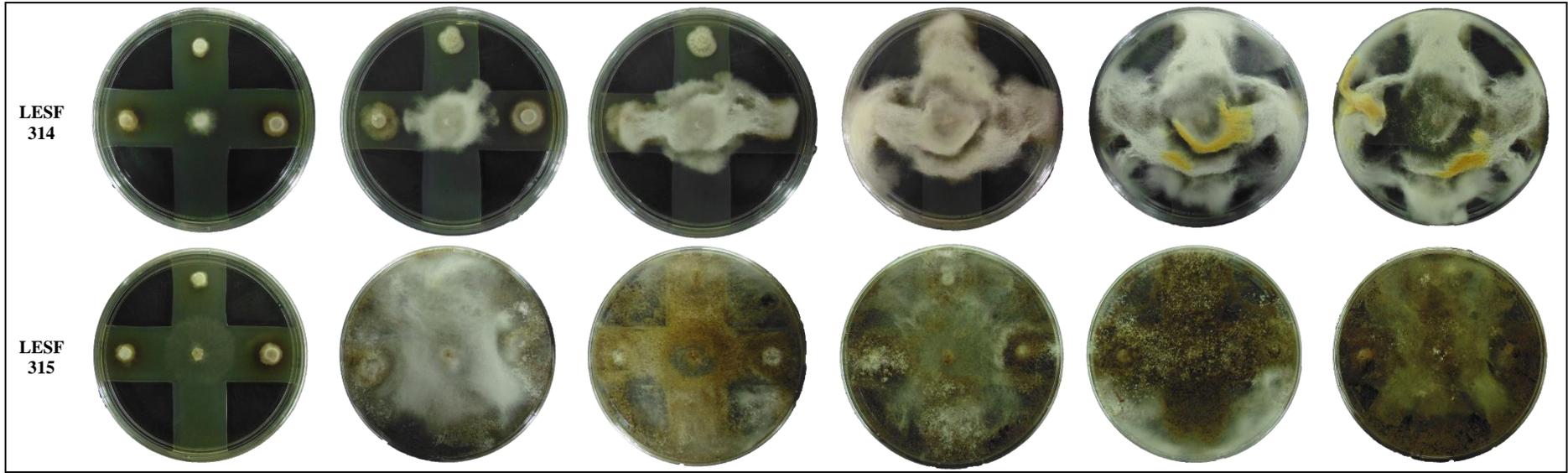
O terceiro grupo compreende o isolado LESF 313, que apresentou um comportamento diferenciado dos demais *Escovopsis* sp. No quinto dia de bioensaio, o crescimento micelial desse isolado na extremidade com o fungo mutualista das formigas cortadeiras foi maior do que nas outras extremidades, apresentando diferenças significativas na análise (Tabela 6). Já no sétimo dia, o crescimento micelial na extremidade citada não foi tão distinto das demais, apresentando diferença significativa apenas quando comparado com o crescimento na extremidade de um dos fungos mutualistas de *M. morschi* (AR01). No entanto, a partir do décimo dia, o crescimento micelial deste parasita tornou-se semelhante nas placas, não apresentando mais diferenças significativas entre nenhuma extremidade (Tabela 6 e Figura 6).

O quarto grupo compreende o isolado LESF 314. No sétimo dia de bioensaio foi possível observar diferenças significativas entre a extremidade controle e as duas extremidades com os fungos mutualistas de *M. morschi*, isto é, o crescimento foi significativamente maior em direção a ambos os seus hospedeiros naturais, em relação a extremidade com ausência de fungo mutualista (Figura 6). A partir do décimo segundo dia, o crescimento do parasita foi maior na extremidade com o fungo mutualista das formigas cortadeiras, em comparação com o controle, portanto, a partir de tal dia, a extremidade controle diferiu significativamente de todas as outras extremidades (Tabela 6 e Figura 6).

**Figura 6** - Bioensaio com chance de escolha das dez linhagens de *Escovopsis* sp. frente a três fungos mutualistas. Consulte Figura 1 para disposição dos fungos nas placas.







**Tabela 6** - Distância (em cm) entre o micélio de *Escovopsis* sp. e o final das quatro extremidades da placa de Petri (média ± erro padrão). Os valores destacados em negrito representam os dias em que houve diferenças significativas (p0,05 – Kruskal Wallis) entre as extremidades, sendo que as letras distintas nas colunas representam essas diferenças.

<i>Escovopsis</i>	Tratamento	Dias							
		0	1	2	3	5	7	10	28
LESF053	<b>FF2006</b>	6,72 ± 0,03	6,48 ± 0,02	6,20 ± 0,04	5,73 ± 0,03	5,31 ± 0,03	<b>3,63 ± 0,13 a</b>	<b>2,26 ± 0,14 a</b>	0,00 ± 0,00
	<b>AR01</b>	6,82 ± 0,06	6,53 ± 0,06	6,26 ± 0,07	5,65 ± 0,08	5,22 ± 0,09	<b>2,07 ± 0,34 b</b>	<b>0,25 ± 0,13 b</b>	0,00 ± 0,00
	<b>AR02</b>	6,83 ± 0,05	6,62 ± 0,05	6,28 ± 0,06	5,79 ± 0,08	5,37 ± 0,07	<b>2,33 ± 0,49 b</b>	<b>0,43 ± 0,24 b</b>	0,00 ± 0,00
	<b>Controle</b>	6,76 ± 0,03	6,55 ± 0,02	6,24 ± 0,05	5,76 ± 0,05	5,40 ± 0,04	<b>3,53 ± 0,13 a</b>	<b>2,34 ± 0,16 a</b>	0,00 ± 0,00
LESF 303	<b>FF2006</b>	6,78 ± 0,05	6,62 ± 0,03	6,16 ± 0,04	5,75 ± 0,04	4,41 ± 0,07	<b>3,93 ± 0,09 ac</b>	<b>2,90 ± 0,10 a</b>	0,00 ± 0,00
	<b>AR01</b>	6,81 ± 0,07	6,72 ± 0,08	6,22 ± 0,10	5,82 ± 0,09	4,34 ± 0,16	<b>3,01 ± 0,51 ab</b>	<b>1,14 ± 0,46 b</b>	0,00 ± 0,00
	<b>AR02</b>	6,83 ± 0,07	6,72 ± 0,08	6,15 ± 0,06	5,71 ± 0,06	3,96 ± 0,17	<b>2,66 ± 0,43 b</b>	<b>0,07 ± 0,04 b</b>	0,00 ± 0,00
	<b>Controle</b>	6,69 ± 0,04	6,62 ± 0,03	6,18 ± 0,03	5,78 ± 0,03	4,53 ± 0,06	<b>4,19 ± 0,05 c</b>	<b>3,23 ± 0,08 a</b>	0,00 ± 0,00
LESF 305	<b>FF2006</b>	6,91 ± 0,04	6,48 ± 0,07	6,01 ± 0,07	5,72 ± 0,05	4,96 ± 0,17	<b>4,00 ± 0,08 a</b>	<b>2,80 ± 0,09 a</b>	0,00 ± 0,00
	<b>AR01</b>	6,80 ± 0,06	6,45 ± 0,09	5,92 ± 0,11	5,62 ± 0,10	4,78 ± 0,21	<b>2,43 ± 0,49 b</b>	<b>0,53 ± 0,41 b</b>	0,00 ± 0,00
	<b>AR02</b>	6,91 ± 0,04	6,49 ± 0,05	6,04 ± 0,07	5,83 ± 0,08	4,93 ± 0,26	<b>2,72 ± 0,50 ab</b>	<b>0,45 ± 0,25 b</b>	0,00 ± 0,00
	<b>Controle</b>	6,81 ± 0,05	6,43 ± 0,08	5,99 ± 0,05	5,76 ± 0,03	5,08 ± 0,14	<b>3,86 ± 0,16 a</b>	<b>2,89 ± 0,16 a</b>	0,00 ± 0,00
LESF 309	<b>FF2006</b>	6,83 ± 0,04	6,46 ± 0,05	6,14 ± 0,06	5,72 ± 0,03	4,89 ± 0,16	<b>3,55 ± 0,13 ab</b>	<b>2,30 ± 0,16 a</b>	0,00 ± 0,00
	<b>AR01</b>	6,84 ± 0,06	6,45 ± 0,10	6,11 ± 0,07	5,70 ± 0,09	4,84 ± 0,18	<b>2,08 ± 0,47 a</b>	<b>0,43 ± 0,20 b</b>	0,00 ± 0,00
	<b>AR02</b>	6,91 ± 0,06	6,62 ± 0,05	6,34 ± 0,07	5,69 ± 0,06	4,66 ± 0,28	<b>2,20 ± 0,47 a</b>	<b>0,15 ± 0,12 b</b>	0,00 ± 0,00
	<b>Controle</b>	6,83 ± 0,03	6,50 ± 0,04	6,23 ± 0,04	5,74 ± 0,05	4,99 ± 0,15	<b>3,76 ± 0,14 b</b>	<b>2,57 ± 0,20 a</b>	0,00 ± 0,00
LESF 310	<b>FF2006</b>	6,73 ± 0,05	6,15 ± 0,04	4,62 ± 0,06	2,90 ± 0,10	1,16 ± 0,10	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	<b>AR01</b>	6,80 ± 0,05	6,14 ± 0,06	4,60 ± 0,11	3,05 ± 0,13	1,08 ± 0,08	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	<b>AR02</b>	6,81 ± 0,04	6,18 ± 0,07	4,70 ± 0,08	3,25 ± 0,11	3,25 ± 0,11	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	<b>Controle</b>	6,72 ± 0,05	6,17 ± 0,04	4,43 ± 0,10	2,72 ± 0,09	1,12 ± 0,08	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
LESF 311	<b>FF2006</b>	6,85 ± 0,04	6,25 ± 0,04	5,91 ± 0,07	4,13 ± 0,10	2,29 ± 0,26	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	<b>AR01</b>	6,88 ± 0,05	6,19 ± 0,06	5,90 ± 0,06	4,27 ± 0,12	2,38 ± 0,25	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	<b>AR02</b>	6,85 ± 0,05	6,09 ± 0,06	5,80 ± 0,10	4,20 ± 0,12	2,18 ± 0,30	0,05 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	<b>Controle</b>	6,78 ± 0,05	5,94 ± 0,03	5,62 ± 0,04	3,87 ± 0,09	2,08 ± 0,18	0,06 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
LESF 312	<b>FF2006</b>	6,81 ± 0,02	5,86 ± 0,05	4,75 ± 0,21	3,43 ± 0,20	1,74 ± 0,34	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

LESF 313	<b>AR01</b>	6,78 ± 0,05	5,68 ± 0,09	4,66 ± 0,21	3,42 ± 0,16	1,72 ± 0,35	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	<b>AR02</b>	6,89 ± 0,02	5,86 ± 0,06	4,61 ± 0,21	3,63 ± 0,15	1,77 ± 0,34	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	<b>Controle</b>	6,79 ± 0,06	5,63 ± 0,09	4,48 ± 0,21	3,08 ± 0,15	1,59 ± 0,26	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	<b>FF2006</b>	6,80 ± 0,05	6,56 ± 0,04	5,99 ± 0,06	5,54 ± 0,07	<b>4,80 ± 0,05 a</b>	<b>4,29 ± 0,06 a</b>	3,64 ± 0,08	0,24 ± 0,23
	<b>AR01</b>	6,85 ± 0,04	6,66 ± 0,05	6,17 ± 0,07	5,77 ± 0,06	<b>5,09 ± 0,05 b</b>	<b>4,56 ± 0,05 b</b>	3,80 ± 0,05	0,32 ± 0,18
	<b>AR02</b>	6,80 ± 0,05	6,52 ± 0,03	6,17 ± 0,04	5,69 ± 0,06	<b>5,00 ± 0,05 ab</b>	<b>4,30 ± 0,07 ab</b>	3,61 ± 0,07	0,24 ± 0,23
	<b>Controle</b>	6,76 ± 0,01	6,62 ± 0,02	6,19 ± 0,03	5,74 ± 0,05	<b>5,00 ± 0,05 b</b>	<b>4,44 ± 0,08 ab</b>	3,74 ± 0,10	0,00 ± 0,00
	<b>FF2006</b>	6,72 ± 0,05	6,13 ± 0,10	5,78 ± 0,12	5,42 ± 0,08	4,36 ± 0,08	<b>2,87 ± 0,19 ab</b>	<b>0,24 ± 0,08 a</b>	0,00 ± 0,00
	<b>AR01</b>	6,82 ± 0,05	6,07 ± 0,07	5,83 ± 0,08	5,40 ± 0,06	4,36 ± 0,13	<b>2,25 ± 0,43 a</b>	<b>0,06 ± 0,06 a</b>	0,00 ± 0,00
LESF 314	<b>AR02</b>	6,81 ± 0,05	6,05 ± 0,09	5,73 ± 0,08	5,34 ± 0,11	4,04 ± 0,18	<b>1,78 ± 0,28 a</b>	<b>0,16 ± 0,12 a</b>	0,00 ± 0,00
	<b>Controle</b>	6,78 ± 0,05	5,91 ± 0,03	5,70 ± 0,08	5,20 ± 0,10	4,58 ± 0,11	<b>3,54 ± 0,13 b</b>	<b>1,71 ± 0,27 b</b>	0,00 ± 0,00
	<b>FF2006</b>	6,84 ± 0,04	<b>4,21 ± 0,05 a</b>	<b>2,03 ± 0,06 a</b>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
LESF 315	<b>AR01</b>	6,83 ± 0,04	<b>4,16 ± 0,07 a</b>	<b>2,22 ± 0,10 b</b>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	<b>AR02</b>	6,90 ± 0,02	<b>4,57 ± 0,08 b</b>	<b>2,83 ± 0,03 b</b>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	<b>Controle</b>	6,79 ± 0,04	<b>4,82 ± 0,05 b</b>	<b>4,02 ± 0,06 b</b>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	<b>FF2006</b>	6,84 ± 0,04	<b>4,21 ± 0,05 a</b>	<b>2,03 ± 0,06 a</b>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

FF2006 – Extremidade com o fungo mutualista cultivado por *A. sexdens rubropilosa*; AR02 – Extremidade com o fungo mutualista AR02, cultivado por *M. morschi*; AR01 – Extremidade com o fungo mutualista AR01, cultivado por *M. morschi*; Controle – Extremidade com ausência de fungo.

Por fim, *E. weberi* LESF 315, apresentou o crescimento mais rápido dentre todos os parasitas utilizados no bioensaio com chance de escolha. Foi possível observar que no primeiro dia, o parasita apresentou crescimento radial, mas já no segundo dia houve crescimento direcionado ao seu hospedeiro natural (o fungo mutualista das formigas cortadeiras), apresentando, portanto, diferença significativa desta extremidade frente as outras três (Tabela 6, Figura 6). Já no terceiro dia de bioensaio, devido ao crescimento micelial rápido desta linhagem, o parasita tomou todas as placas, não havendo mais dados para análise comparativa (Figura 6).

Observamos para *E. kreiselii* que, mesmo após 45 dias de bioensaio, na maioria das réplicas experimentais, os parasitas apresentaram crescimento micelial ao redor do fungo mutualista de *A. sexdens rubropilosa* (que não é o hospedeiro natural), não sendo capaz de crescer sob o mesmo. Em todas as réplicas em que *E. kreiselii* não foi capaz de crescer sob o fungo mutualista das formigas cortadeiras, foram produzidos metabólitos por parte deste, evidenciado pelo escurecimento do meio de cultivo (Figura 7), os quais acredita-se que foram capazes de inibir o crescimento do parasita. Observamos que, nas réplicas em que o parasita foi capaz de crescer sobre o fungo mutualista, o meio de cultivo permaneceu com a cor original, enquanto nas réplicas em que o fungo mutualista inibiu esse crescimento do parasita, o meio de cultivo se tornou escuro ao redor do mutualista (Figura 7). Estudos já estão em andamento em nosso grupo de pesquisa para identificar quais compostos químicos são produzidos pelo fungo mutualista de *A. sexdens rubropilosa* na presença de linhagens do parasita *Escovopsis* sp.

**Figura 7** - Crescimento micelial de *Escovopsis kreiselii* LESF 053 no 23º dia de bioensaio (duas réplicas experimentais, réplicas 2 e 7, respectivamente). Frente e reverso das placas, evidenciando os metabólitos produzidos pelo fungo mutualista FF2006 (extremidade superior) potencialmente responsáveis pela inibição do micélio do parasita (coloração escura).



## 6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho evidenciam grandes diferenças na interação entre os isolados de *Escovopsis* sp. e os fungos mutualistas das atíneas basais. Nos bioensaios de antagonismo, encontramos diferenças significativas entre o crescimento micelial dos fungos mutualistas na presença e na ausência do parasita *Escovopsis*. É importante ressaltar que essa diferença significativa foi observada a partir do dia em que os micélios de ambos os fungos apresentaram contato físico. Isso evidencia, portanto, que a inibição do crescimento micelial do fungo mutualista pelos *Escovopsis* sp. ocorreu apenas quando houve contato físico entre as hifas desses fungos.

Foram encontrados quatro grupos com comportamentos distintos nos bioensaios de antagonismo: o primeiro, com o isolado LESF 313 que não apresentou atividade antagônica frente a ambos os fungos mutualistas utilizados no estudo. É possível que a falta de inibição desse isolado seja devida a uma pressão de seleção para isolados mais competitivos (e provavelmente mais adaptados) à inibirem o hospedeiro (fungo mutualista) durante a evolução. A falta de inibição também pode ser explicada pela possibilidade deste isolado não pertencer naturalmente à colônia de *M. morschi* do qual foi obtido, ou seja, esse isolado pertencia à uma colônia de uma outra formiga atínea (diferente de *M. morschi*) e estaria somente presente como um esporo dormente no momento em que realizamos o isolamento. Além disso, tal isolado teve seu crescimento micelial inibido por ambos os fungos mutualistas. Esse resultado é uma evidência que os fungos mutualistas produzem compostos inibitórios (defesas) frente a algumas linhagens de *Escovopsis* sp.

O segundo grupo encontrado é composto pelas quatro linhagens de *E. kreiselii*, bem como o isolado LESF 314, que apresentaram um crescimento micelial significativamente maior nas réplicas de confronto do que nas réplicas controle, o que sugere que os compostos produzidos pelo fungo mutualista estimulem seu crescimento. Em ambos os casos, os resultados são semelhantes a aqueles observados por Folgarait et al. (2011a) em confrontos de isolados de *E. weberi* (morfotipo marrom) com o fungo mutualista das formigas cortadeiras (*L. gongylophorus*). Nesse estudo, os autores observaram que o desenvolvimento de *E. weberi* foi mais rápido na presença do fungo mutualista, quando comparado com o controle. Segundo os autores, esse estímulo no crescimento micelial do parasita independe do contato físico entre os micélios de ambos os fungos. Portanto, é provável que esse estímulo ocorra por enzimas ou outro tipo de

metabólito bioativo produzidos pelo fungo mutualista, liberados e difundidos no meio de cultivo. Portanto, o mesmo pode ter ocorrido nos bioensaios realizados com as linhagens de *E. kreiselii* e com *Escovopsis* sp. LESF 314.

O terceiro grupo conta com os isolados de *E. trichodermoides* (LESF 310, LESF 311 e LESF 312), que apresentaram as maiores inibições do crescimento micelial dos fungos mutualistas. Entretanto, o seu crescimento micelial não foi estimulado pela presença do mutualista, mesmo com o contato físico entre ambos os micélios. Além disso, observamos ainda que tais isolados foram capazes de apresentar crescimento micelial sob toda a placa de Petri mais rapidamente na ausência dos fungos mutualistas. Esse fato pode indicar que os compostos enzimáticos produzidos pelos fungos mutualistas não exercem influência nessas linhagens de *Escovopsis* sp. e devido à competição de nutrientes, o crescimento tornou-se menor nas réplicas de confronto.

Por fim, o último grupo com comportamento distinto encontrado no primeiro bioensaio (i.e. de antagonismo) abriga a linhagem *E. weberi* LESF 315, que apesar de ter apresentado potencial antagônico frente aos dois fungos mutualistas cultivados pela atínea basal *M. morschi*, apenas tornou o crescimento de ambos mais lentos, pois os mutualistas continuaram crescendo até o último dia de bioensaio, mesmo na presença de *Escovopsis* sp. É importante ressaltar que em estudos anteriores (FOLGARAIT et al., 2011b; MARFETÁN et al., 2015) realizados com *Escovopsis* sp. de colônias de formigas cortadeiras (morfotipo marrom), os parasitas apresentaram uma inibição mais expressiva, quando comparada com aquela apresentada por LESF 315. Tal fato reforça a especificidade desse isolado para com o fungo mutualista de formigas cortadeiras.

Apesar de pequenas variações entre os dois bioensaios de antagonismo (i.e. com a utilização dos mutualistas *Leucocoprinus* sp. AR01 e AR02), os isolados de *Escovopsis* sp. apresentaram padrões semelhantes de inibição frente a esses mutualistas. Isto se deve, provavelmente, aos dois mutualistas utilizados serem cultivados pela mesma espécie de atínea basal, o que sugere que os dois fungos podem ser semelhantes geneticamente (i.e. a mesma espécie).

Os bioensaios com chance de escolha foram importantes para avaliar se houve preferência dos isolados frente aos três fungos mutualistas: os fungos AR01 e AR02 (cultivados por *M. morschi*) e um fungo cultivado por formigas cortadeiras (FF2006, *L. gongylophorus*). Os dados gerados nesse experimento complementaram os dados obtidos no primeiro bioensaio realizado, trazendo informações inéditas sobre a interação desses *Escovopsis* sp. com os cultivares de atíneas basais.

Era esperado que o crescimento micelial do parasita chegasse primeiramente ao fim da extremidade de seu hospedeiro natural, ou seja, que fosse estimulado pelo mesmo. Era esperado também que a última extremidade a ser colonizada pelo micélio do parasita fosse a extremidade controle, já que contava com a ausência de qualquer fungo mutualista, portanto, não haveria estímulos químicos para este crescer naquela direção. Entretanto, foi possível observar comportamentos diversos, com grandes diferenças do esperado (Tabela 6 e Figura 6).

É importante ressaltar que a análise estatística foi realizada a partir das medições considerando a porção de micélio do parasita mais próxima do final das extremidades do meio de cultivo. Portanto, foi considerado que o parasita alcançou o fim da extremidade mesmo que apenas uma pequena porção de micélio tenha sido capaz de alcançá-lo. Sendo assim, a análise estatística não contempla se o parasita foi capaz ou não de crescer sob o micélio do fungo mutualista de cada extremidade, apenas considera se houve uma porção do micélio do parasita capaz de tocar o fim da mesma.

Estudos limitados a um único gênero de formiga atínea demonstraram que isolados de *Escovopsis* sp. são mais atraídos e rapidamente crescem frente aos seus hospedeiros naturais ou hospedeiros relacionados filogeneticamente dos mesmos, enquanto que isolados de *Escovopsis* sp. são inibidos por fungos mutualistas distantemente relacionados a seus hospedeiros naturais (BIRNBAUM; GERARDO, 2016). Observamos o mesmo padrão de comportamento em nossos resultados, com os quatro isolados de *E. kreiselii*, assim como o isolado LESF 314, que foram estimulados pela presença de seus hospedeiros naturais (AR01 e AR02, cultivados por *M. morschi*). A diferença entre LESF 314 e *E. kreiselii* encontra-se na interação com o fungo mutualista das formigas cortadeiras: *E. kreiselii* não apenas não foi estimulado pelo mesmo, como ainda foi inibido, não sendo capaz de apresentar crescimento micelial sob o micélio do mutualista em até 45 dias de bioensaio (Figura 7). Já o parasita LESF 314 foi capaz de reconhecer os compostos produzidos por *L. gongylophorus* e foi estimulado pelos mesmos. Concluímos que *Escovopsis* sp. LESF 314 foi atraído pelos três fungos mutualistas, porém, com uma preferência pelos seus hospedeiros naturais.

As três linhagens de *E. trichodermoides* (LESF 310, LESF 311 e LESF 312) novamente apresentaram um comportamento generalista, não sendo estimulados nem inibidos por nenhum fungo mutualista utilizado no bioensaio. É possível que essa espécie não viva naturalmente em associação com *M. morschi*, e sim com outra espécie de atínea, e por isso não tenha apresentado especificidade por nenhum fungo mutualista.

Ainda assim, os três mutualistas não foram capazes de exercer nenhum tipo de inibição do crescimento micelial nesses *Escovopsis* sp., o que evidencia que não há reconhecimento de compostos químicos entre esses fungos.

Isolados de *Escovopsis* sp. de esporulação marrom, provenientes de colônias de atíneas derivadas, são conhecidos na literatura por apresentarem uma alta virulência e infectividade. Marfetan e colaboradores (2015) correlacionaram tal virulência a estruturas presentes nas hifas desses fungos, mencionando que seriam adaptações para o parasitismo. Ainda assim, observamos no bioensaio de antagonismo que *E. weberi* LESF 315, a única linhagem proveniente de colônia de atíneas derivadas utilizada no estudo, apresentou inibição mediana dos fungos mutualistas de *M. morschi*, os quais foram capazes de apresentar aumento no crescimento micelial até o 14º dia de confronto, enquanto frente aos outros isolados do parasita, os mutualistas não foram capazes de apresentar aumento do crescimento micelial a partir de um certo momento do confronto. Sendo assim, a virulência do parasita não deve ser relacionada unicamente a caracteres genéticos, pois é intimamente relacionada à suscetibilidade do hospedeiro que confronta.

Wallace e colaboradores (2014) correlacionaram a virulência de diferentes isolados de *Escovopsis* sp. de colônias de atíneas derivadas com a filogenia do gênero, encontrando clados bem definidos dos parasitas mais virulentos. Consequentemente, dentro da filogenia do grupo, estes encontram-se distantes filogeneticamente dos menos virulentos. Embora não fosse o objetivo central de nosso trabalho, não foi possível encontrar uma correlação entre virulência e filogenia, entretanto, não podemos afirmar que a mesma não exista, devido ao número restrito de linhagens avaliadas.

É importante ressaltar que os resultados encontrados no presente estudo evidenciam que a inibição dos fungos mutualistas pelos parasitas do gênero *Escovopsis* tem início apenas quando há contato físico entre as hifas dos mesmos, enquanto a estimulação do crescimento dos parasitas frente aos seus hospedeiros naturais ocorre mesmo sem contato micelial entre ambos, provavelmente devido a compostos bioativos produzidos pelos fungos mutualistas que se difundem no meio de cultivo. Portanto, *Escovopsis* reconhece a presença de seus hospedeiros através de reconhecimento de metabólitos, mas a inibição inicia-se somente quando há o contato físico entre os mesmos. Os compostos metabólicos produzidos pelos fungos mutualistas são de extrema importância na interação com os parasitas, visto que em alguns casos no

presente trabalho, os hospedeiros foram capazes de inibir o crescimento micelial do parasita durante os 45 dias de confronto.

As linhagens LESF 313 e LESF 314, apesar de apresentarem tantas diferenças em suas interações com os fungos mutualistas, pertencem a mesma espécie, ainda não descrita para a ciência. É importante ressaltar que ambas as linhagens foram isoladas na mesma coleta e a partir da mesma colônia de *M. morschi* (Tabela 1). Diferenças claras no crescimento desses isolados foram observadas frente aos fungos mutualistas, o que indica que possivelmente uma mutação ocorreu no genoma, afetando a capacidade de infectividade e de reconhecimento dos fungos mutualistas. Tal mutação também afetou a capacidade de crescimento desses isolados, pois foi observado em placas controle (i.e. ambas as linhagens crescendo isoladas em placas de Petri com meio BDA) que LESF 314 apresenta um crescimento micelial consideravelmente mais rápido que LESF 313. A questão que permanece incerta é se a mutação responsável pela diferenciação dessas duas linhagens, ainda pertencentes a mesma espécie, ocorreu durante o período em que estavam estocadas no laboratório, ou na natureza. Para resolver tal incerteza, serão necessárias novas coletas para encontrar isolados adicionais para avaliação.

Os resultados obtidos evidenciam a longa história evolutiva de fungos parasitas do gênero *Escovopsis* e os fungos cultivados pelas formigas atíneas. Foram observadas grandes diferenças nas interações avaliadas nos dois bioensaios realizados no presente estudo: tanto em relação à virulência do parasita, quanto à vulnerabilidade do hospedeiro. Tendo em vista os resultados inéditos obtidos neste estudo e as implicações na ecologia e taxonomia de *Escovopsis* sp., pretendemos organizar os dados para serem submetidos para publicação.

## 7 CONSIDERAÇÕES

- O presente estudo forneceu evidências de que *Escovopsis* sp. associados à colônias de atíneas basais são parasitas dos fungos mutualistas cultivados pelas mesmas, à semelhança dos *Escovopsis* sp. encontrados em colônias de formigas cortadeiras. Com exceção de um isolado examinado, os demais apresentaram atividade antagônica frente a dois fungos mutualistas cultivados pela atínea basal *M. morschei*.
- Com bioensaios *in vitro*, observamos que *Escovopsis* sp. apresentam uma maior atração frente a seus hospedeiros naturais, quando comparado com sua atividade frente a fungos mutualistas filogeneticamente distantes dos mesmos. Esse resultado reforça a antiga relação de *Escovopsis* sp. de atíneas basais com seus fungos mutualistas.
- Por fim, nossos resultados indicam que duas linhagens de *Escovopsis* sp. utilizadas neste trabalho potencialmente representam uma espécie filogenética ainda não descrita.

## 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.
- AUGUSTIN, J. O.; GROENEWALD, J. Z.; NASCIMENTO, R. J.; MIZUBUTI, E. S.; BARRETO, R. W.; ELLIOT, S. L.; EVANS, H. C. Yet more “weeds” in the garden: fungal novelties from nests of leaf-cutting ants. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 12, e82265, 2013.
- 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. 000-000, 2016.
- BRANDÃO, C. R. F.; MAYHE-NUNES, A. J.; SANHUDO, C. E. D. Taxonomia e filogenia das formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. **Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo**. Viçosa: Editora UFV, 2011. p. 27-48.
- CARLOS, A. A.; RODRIGUES, A.; FORTI, L. C.; PASSADOR, M. M.; SIERRA, J. F. Filamentous fungi found in *Atta sexdens rubropilosa* colonies after treatment with different toxic bait formulations. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v.135, p.326-331, 2011.
- 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. A community of ants, fungi, and bacteria: a multilateral approach to studying symbiosis. **Annual Reviews in Microbiology**, Palo Alto, v. 55, n. 1, p. 357-380, 2001.
- CURRIE, C. R.; WONG, B.; STUART, A. E.; SCHULTZ, T. R.; REHNER, S. A.; MUELLER, U. G.; STRAUS, N. A. Ancient tripartite coevolution in the attine ant-microbe symbiosis. **Science**, Washington, v. 299, n. 5605, p. 386–388, 2003.
- DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, New York, v. 9, n. 8, p. 772-772, 2012.
- 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**, Oxford, v. 40, n. 2, p. 342-349, 2011a.
- FOLGARAIT, P. J.; GOROSITO, N.; POULSEN, M.; CURRIE, C. R. Preliminary in vitro insights into the use of natural fungal pathogens of leaf-cutting ants as biocontrol agents. **Current Microbiology**, New York, v. 63, n. 3, p. 250-258, 2011b.
- GERARDO, N. M.; MUELLER, U. G.; PRICE, S. L.; CURRIE, C. R. Exploiting a mutualism: parasite specialization on cultivars within the fungus-growing ant symbiosis. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, London, v. 271, n. 1550, p. 1791-1798, 2004.
- GERARDO, N. M.; JACOBS, S. R.; CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G. Ancient host-pathogen associations maintained by specificity of chemotaxis and antibiosis. **PLoS Biology**, San Francisco, v. 4, n. 8, p. e235, 2006.

- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 41, [s.n.], p. 95-98, 1999.
- KATO, K.; STANDLEY, D. M. Mafft Multiple Sequence Alingment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.30, n.4. p.772-780, 2013.
- 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, p. 52-61, 2015.
- MASIULIONIS, V. E.; CABELLO, M. N.; SEIFERT, K. A.; RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F. C. *Escovopsis trichodermoides* sp. nov., isolated from a nest of the lower attine ant *Mycocepurus goeldii*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 107, n. 3, p. 731-740, 2015.
- MEHDIABADI, N. J.; SHULTZ, T.R. Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants. **Myrmecological News**, Vienna, v. 13, p. 37-55, 2010.
- MEIRELLES, L. A.; MONTOYA, Q. V.; SOLOMON, S. E.; RODRIGUES, A. New light on the systematics of fungi associated with attine ant gardens and the description of *Escovopsis kreiselii* sp. nov. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 1, 2015a.
- 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, 150257, 2015b.
- MIKHEYEV, A. S.; MUELLER, U. G.; ABBOT, P. Cryptic sex and many-to-one coevolution in the fungus-growing ant symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 103, n. 28, p. 10702-10706, 2006.
- MOIA, I. C. Natureza do antagonismo entre fungos oportunistas e o fungo cultivado pelas formigas cortadeiras. Rio Claro, 2014. 44-f. **Trabalho de Conclusão de Curso**, Universidade Julio de Mesquita Filho – UNESP, 2014.
- PAGNOCCA, F. C.; BACCI JUNIOR, M. ; FUNGARO, M. H. P. ; BUENO, O. C. ; HEBLING, M. J. A. ; SANTÀNNA, A. ; CAPELARI, M. . RAPD analysis of the sexual state and sterile mycelium of the fungus cultivated by the leaf-cutting ant *Acromyrmex hispidus fallax*. **Mycological Research**, United Kingdom, v. 105, n.2, p. 173-176, 2001.
- 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.
- RODRIGUES, A.; BACCI Jr, M.; MUELLER, U. G.; ORTIZ, A.; PAGNOCCA, F. C. Microfungal “weeds” in the leafcutter ant symbiosis. **Microbial Ecology**, Cambridge, v. 56, n. 4, p. 604-614, 2008.
- RODRIGUES, A.; MUELLER, U. G.; ISHAK, H. D.; BACCI, M. Jr.; PAGNOCCA, F. C. Ecology of microfungal communities in gardens of fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae): a year-long survey of three species of attine ants in Central Texas. **FEMS Microbiology Ecology**, Hoboken, p. 244-255, 2011.

RODRIGUES, A.; PASSARINI, M. R.; FERRO, M.; NAGAMOTO, N. S.; FORTI, L. C.; BACCI, M.; PAGNOCCA, F. C. Fungal communities in the garden chamber soils of leaf-cutting ants. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 54, n. 11, p. 1186-1196, 2014.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, Oxford, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.

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.

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

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

SOSA-CALVO, J.; SHULTZ, T. R.; BRANDÃO, C. R. F.; KLINGENBERG, C.; FEITOSA, R. M.; RABELING, C.; BACCI, M. Jr.; LOPES, C. T.; VASCONCELOS, H. L. *Cyatta abscondita*: taxonomy, evolution, and natural history of a new fungus-farming ant genus from Brazil. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 11, p. 1-20, 2013.

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

TAERUM, S. J.; CAFARO, M. J.; CURRIE, C. R. Presence of multiparasite infections within individual colonies of leaf-cutter ants. **Environmental Entomology**, College Park, v. 39, n. 1, p. 105-113, 2010.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

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

Rio Claro, 12 de dezembro de 2016

---

Bruna Cristina Custodio  
- Discente -

---

Prof. Dr. André Rodrigues  
- Orientador -