

**LEVANTAMENTO DE ASCOMICETOS E ESTUDO DA DINÂMICA DE  
INFECÇÃO DE *Escovopsis* EM DIFERENTES REGIÕES DOS JARDINS DE  
FORMIGAS CORTADEIRAS**

**THALLES CARDOSO MATTOSO**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ**

**ABRIL - 2016**

**LEVANTAMENTO DE ASCOMICETOS E ESTUDO DA DINÂMICA DE  
INFECÇÃO DE *Escovopsis* EM DIFERENTES REGIÕES DOS JARDINS DE  
FORMIGAS CORTADEIRAS**

**THALLES CARDOSO MATTOSO**

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal”

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Ph.D. Richard Ian Samuels

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

ABRIL - 2016

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCT / UENF

172/2016

Mattoso, Thalles Cardoso

Levantamento de ascomicetos e estudo da dinâmica de infecção de *Escovopsis* em diferentes regiões dos jardins de formigas cortadeiras / Thalles Cardoso Mattoso. – Campos dos Goytacazes, 2016.

x, 73 f. : il.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) -- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Laboratório de Entomologia e Fitopatologia. Campos dos Goytacazes, 2016.

Orientador: Richard Ian Samuels.

Área de concentração: Fitossanidade.

Bibliografia: f. 65-73.

1.FORMIGAS CORTADEIRAS 2. FUNGO SIMBIONTE 3. PARASITA  
4. ASCOMICETOS 5. *Escovopsis* I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Laboratório de Entomologia e Fitopatologia II. Título

CDD

595

**LEVANTAMENTO DE ASCOMICETOS E ESTUDO DA DINÂMICA DE  
INFECÇÃO DE *Escovopsis* EM DIFERENTES REGIÕES DOS JARDINS DE  
FORMIGAS CORTADEIRAS**

**THALLES CARDOSO MATTOSO**

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Doutor em Produção Vegetal”

Comissão examinadora:

---

Dr<sup>a</sup>. Denise Dolores Oliveira Moreira (D.Sc. Produção Vegetal) – CCTA - UENF

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Silvaldo Felipe da Silveira (D.Sc. Fitopatologia) – UENF

---

Prof<sup>o</sup>. Milton Erthal Jr. (D.Sc. Produção Vegetal) - IFF

---

Prof<sup>o</sup>. Richard Ian Samuels (Ph.D. Patologia de Insetos) – UENF (Orientador)

“Ao meu pai, Edmar Gouvêa Mattoso (*in memoriam*), DEDICO este trabalho por sempre me incentivar a trilhar meu próprio caminho.”

**Saudades eternas...**

## AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre me mostrar o melhor caminho a seguir.

Aos meus pais Lidia Maria Dornellas Cardoso Mattoso e Edmar Gouvêa Mattoso (*in memorium*) que sempre me ajudaram e me apoiaram em minhas conquistas.

À minha esposa Amanda, que me atura nas horas mais estressantes.

À avó Teresinha que sempre se preocupou com minha alimentação, bem como aos demais avós Edy, Edmilson e Ney que sempre me acompanharão onde estiver.

À minha irmã Nathalia que sempre me anima nas horas tristes.

Ao meu tio Dom Edney pela formação religiosa.

À minha mentora e segunda mãe, Denise que me introduziu no mundo da mirmecologia.

Ao professor Richard pela oportunidade e pela ajuda nos momentos de dificuldade.

A Verônica que me ajudou muito neste trabalho.

À minha amiga Arli pelos momentos divertidos.

A Maria de Fátima, Abílio e Guilherme pelos bons momentos.

Aos amigos de laboratório Aline, Adriano, Cátia, Gustavo, Laerciana, Simone, Leila e Jonathan.

Ao professor Daniel Henk da Bath University pela colaboração, ensinamentos e por permitir o desenvolvimento de parte do trabalho em seu laboratório

Ao aluno de Ph.D. Tristan pelos ensinamentos de técnicas moleculares, bem como de bioinformática.

À professora Stephanie Diezmann por permitir o uso de equipamentos em seu laboratório.

Aos Pós-doutorandos Lina, Stephen e Kangzheng, a aluna de Ph.D. Naomi e à técnica Carolyn pelos momentos divertidos no office.

Ao professor Tariq da University of Swansea pelas ideias.

Ao CNPq e a CAPES que me concederam recursos para estudo no país e no exterior.  
E a tantos outros amigos que não caberiam nesta página.

## SUMÁRIO

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. As formigas cortadeiras .....	4
2.2. Fungos Ascomicetos associados às formigas cortadeiras.....	6
2.3. Defesas de formigas cortadeiras contra patógenos.....	10
TRABALHO I	
COMUNIDADE DE FUNGOS ASCOMICETOS EM JARDINS DE TRÊS ESPÉCIES DE <i>Acromyrmex</i> .....	12
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
2.1. Coleta e preparo de amostras de jardins de formigas cortadeiras do gênero <i>Acromyrmex</i> .....	19
2.2. Extração de DNA metagenômico das amostras de jardim.....	20
2.3. Amplificação de DNA de Ascomicetos.....	21
2.4. Clonagem e sequenciamento de Ascomicetos.....	21
2.5. Isolamento de fungos filamentosos e leveduras.....	22
2.6. Teste de antibiose em meio de cultivo.....	22
2.7. Análises estatísticas e gráficos.....	23
3. RESULTADOS.....	23
3.1. Prevalência de fungos do filo Ascomycota nos jardins de formigas cortadeiras.	23
3.2. Espécies de leveduras encontradas nos jardins de formigas cortadeiras.....	27
3.3. Espécies de fungos filamentosos presentes nos jardins de formigas cortadeiras .....	28
3.4. Leveduras isoladas a partir de colônias de formigas cortadeiras.....	31
3.5. Atividade antifúngica de leveduras isoladas a partir de jardins de formigas cortadeiras.....	32
4. DISCUSSÃO.....	34
5. CONCLUSÕES.....	40
TRABALHO II	
DINÂMICA DE INFECÇÃO DE <i>Escovopsis</i> EM JARDINS DE FORMIGAS CORTADEIRAS.....	42
RESUMO.....	43
ABSTRACT.....	44
1. INTRODUÇÃO .....	45

2. MATERIAL E MÉTODOS.....	48
2.1 Coleta e manutenção de colônias de formigas cortadeiras.....	48
2.2 Montagem de minicolônias.....	48
2.3. Estresse de miniformigueiros, coleta de material dos jardins e avaliação da presença do parasita <i>Escovopsis</i> .....	49
2.4. Desenho de primer ITS para detecção específica do gênero <i>Escovopsis</i> sp.....	51
2.5. Isolamento de <i>Escovopsis</i> sp. a partir de amostras de jardins de outras espécies de formigas.....	52
2.6. Extração de DNA de culturas axênicas e de amostras de jardim.....	52
2.7. Condições para PCR e eletroforese em gel.....	53
2.8. Análise filogenética das sequências de <i>Escovopsis</i> sp.....	53
2.9. Análises estatísticas.....	54
3. RESULTADOS.....	54
3.1. Identificação molecular de <i>Escovopsis</i> em amostras de jardins.....	54
3.2. Padrão de infecção de miniformigueiro por <i>Escovopsis</i> sp. após estresse por sulfluramida.....	55
3.3. Detecção de <i>Escovopsis</i> sp. a partir de amostras de jardins de colônias estressadas com iscas granuladas.....	57
3.4. Filogenia de <i>Escovopsis</i> sp. proveniente de diferentes colônias.....	58
4. DISCUSSÃO.....	62
5. CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

## RESUMO

MATTOSO, T. C.; D.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Abril de 2016. Levantamento de Ascomicetos e estudo da dinâmica de infecção de *Escovopsis* em diferentes regiões dos jardins de formigas cortadeiras. Professor Orientador: Richard Ian Samuels.

As formigas cortadeiras são bastante conhecidas pelas relações de simbiose com alguns microrganismos, servindo de modelo para o estudo de dinâmica de comunidades microbianas e também de processos de coevolução simbiótica. O microrganismo primordial a sobrevivência dessas espécies de formigas é o fungo simbiote do gênero *Leucoagaricus*, cultivado para servir como alimento ao formigueiro. No entanto, assim como na agricultura humana, os jardins de fungo simbiote são atacados por patógenos como o fungo *Escovopsis* sp. que podem suprimir suas colônias em casos extremos. Contudo, as formigas cortadeiras também apresentam diversas ferramentas que contornam as infecções em seus jardins, dentre elas, a associação com microrganismos simbiontes, como a bactéria do gênero *Pseudonocardia* sp. presente em seu tegumento, que secreta antibióticos contra o fungo parasita. Estudos apontam que estes organismos coevoluíram ao longo de milhões de anos, tornando-se interdependentes. Em contrapartida, outros microrganismos são relatados colonizando os jardins de formigas cortadeiras, dentre eles os fungos do filo Ascomycota. O primeiro capítulo deste trabalho investiga a comunidade de ascomicetos presentes em duas regiões distintas dos jardins de espécies de formigas cortadeiras com diferentes comportamentos de corte de plantas (monocotiledôneas e dicotiledôneas). Para tanto, efetuou-se estudo metagenômico de regiões distintas dos jardins das formigas *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, *Acromyrmex coronatus* e *Acromyrmex balzani*. A espécie cortadeira de monocotiledôneas apresentou uma população de

leveduras estatisticamente maior comparado com a população de leveduras de jardins de espécies que cortam dicotiledôneas. Uma espécie de levedura do gênero *Metschnikowia* sp. foi comum a todas as colônias estudadas. Esta levedura apresentou atividade antagonística a *Escovopsis* e pode apresentar alguma função nos jardins de formigas cortadeiras. O segundo capítulo estuda a dinâmica de infecção do parasita *Escovopsis* em três regiões dos jardins de *Atta sexdens rubropilosa* através do desenvolvimento de marcadores moleculares específicos e de técnicas de isolamento em meio de cultivo. O fungo *Escovopsis* iniciou sua infecção na região intermediária dos jardins, desenvolvendo-se em direção às regiões superior e inferior, sugerindo-se que a região mais antiga dos jardins (inferior) não seja apropriada ao crescimento inicial deste parasita. O primer Esco\_1R desenvolvido neste trabalho é específico ao gênero *Escovopsis* e útil na detecção deste parasita em amostras de jardins de formigas cortadeiras. Portanto, esta tese trata do estudo de ascomicetos e suas relações com as regiões dos jardins de formigas cortadeiras utilizando-se metodologia molecular e convencional.

## ABSTRACT

MATTOSO, Thalles Cardoso, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, April 2016. Screening of Ascomycetes and study of *Escovopsis* infection dynamics in different regions of leaf cutting ant gardens. Supervisor: Richard Ian Samuels.

The leaf cutting ants are well known to have symbiotic relationships with certain microorganisms serving as a dynamic model for the study of microbial communities and also coevolution processes with microorganisms. The primary microorganism vital for the survival of these species of ants is the symbiont fungus *Leucoagaricus* that are cultivated on foliar substrate collected by workers in their colonies and used as a primary source of nutrients. However, as in human agriculture, the symbiont fungus gardens cultivated by leaf-cutting ants are affected by pathogens such as the parasitic fungus *Escovopsis* sp. that can suppress their colonies in extreme cases. However, leaf-cutting ants also have several tools that circumvent infections in their gardens, among them the association with symbiotic microorganisms, such as bacteria of the genus *Pseudonocardia* present on the integument of some workers, which produce toxins that combat parasitic fungus. Studies indicate that these organisms co-evolved over millions of years, becoming interdependent. In contrast, other microorganisms are reported colonizing the gardens of leaf-cutting ants, among them fungi of the phylum Ascomycota. The first chapter of this study investigated the community of Ascomycetes present in two distinct regions of the gardens of 3 species ants with different leaf cutting habits (monocots and dicots). A metagenomic study was carried out for different regions of the gardens of *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, *Acromyrmex coronatus* and *Acromyrmex balzani*. The ants which cut only monocots (*A. balzani*) had a yeast population of

statistically higher compared to the population of yeast species in gardens of ant species that cut dicots (*A. subterraneus subterraneus*, *A. coronatus*). A yeast species of the genus *Metschnikowia* was common to all the colonies studied. This yeast showed antagonistic activity against *Escovopsis* and may have a role in protecting the gardens of leaf-cutting ants. The second chapter studied the dynamics of *Escovopsis* infection in three regions of *Atta sexdens* gardens through the development of specific molecular markers and isolation techniques in culture medium. The *Escovopsis* fungus initiated infection in the intermediate region of the gardens, developing towards the upper and lower regions, suggesting that the oldest area of the gardens (lower) is not suitable for the initial growth of this parasite. The primer Esco\_1R developed in this work is specific to *Escovopsis* and is useful in the detection of the parasite in samples of gardens of leaf-cutting ants. Therefore, this thesis deals with the study of ascomycetes and their interactions with the different regions of the gardens and different leaf-cutting habits of ants using molecular and conventional methodology.

## 1. INTRODUÇÃO

As formigas cortadeiras são consideradas pragas de grande importância na América Latina devido aos prejuízos causados em sistemas de produção agrícola, pecuária e florestal. Apesar da preferência por determinadas espécies de plantas, a maioria das culturas é atacada e danificada pelas formigas, que cortam folhas e ramos tenros, podendo levar a destruição completa das plantas (Della Lucia, 2003).

As formigas cortadeiras são classificadas em dois gêneros: *Atta* (saúvas) e *Acromyrmex* (quenquéns) (Myrmicinae, Attini), com 15 e 24 espécies descritas, respectivamente. As “quenquéns” se caracterizam por cortar folhas de hortaliças, algumas frutíferas como videiras, laranjeiras, pessegueiros (Della Lucia *et al.*, 1993), além de *Eucalyptus* spp., *Pinus* spp. e diversas espécies de plantas ornamentais. As folhas são processadas e utilizadas como substrato ao fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* (Basidiomycota), que serve de alimento às formigas cortadeiras.

O controle químico de formigas cortadeiras pelo uso de iscas granuladas a base de sulfluramida (Mirex-S<sup>®</sup>) e diflubenzuron (Formilin<sup>®</sup>) é um método eficiente, econômico e prático, porém seu uso apresenta restrições como: danos a espécies não-alvo, amuamento e rejeição (Della Lucia *et al.* 2013).

O controle biológico de insetos apresenta algumas vantagens como a especificidade, o baixo custo e a inocuidade aos ecossistemas. O controle microbiano, utilizando fungos entomopatogênicos parece ser promissor no controle de formigas cortadeiras, devido à capacidade dos fungos de infectar em diferentes

estágios de desenvolvimento do hospedeiro (Alves *et al.*, 1998). Os fungos são capazes de infectar o hospedeiro através do tegumento, apresentam mais de um mecanismo de infecção, além de não haver relatos de resistência contra esses microrganismos (Tabashnik, 1994; Diehl-Fleig, 1995; Charnley, 1997). Contudo, no caso das formigas cortadeiras, estes fungos patogênicos devem ser capazes de superar ou romper a organização social e as defesas existentes nas colônias (Della Lucia, 2003).

As formigas cortadeiras apresentam defesas comportamentais, como a limpeza do tegumento (“grooming”), higienização do ninho, mudanças na atividade, dispersão, além do abandono da própria colônia. Além disso, estes insetos possuem defesas morfológicas, estruturais e fisiológicas, como a presença de pelos que dificultam o processo de infecção de alguns organismos (Diehl-Fleig, 1995), a secreção de antibióticos, e a associação com bactérias simbiotes presentes nos tegumentos das formigas (Currie *et al.*, 1999). Contudo, os mecanismos de defesa junto às associações com diferentes microrganismos dificultam os métodos de controle biológico desses insetos, que mostram-se eficientes em laboratório, mas são falhos no campo (Della Lucia *et al.*, 2013). Apesar dos mecanismos de supressão de microrganismos invasores nas colônias de formigas cortadeiras, muitos microrganismos ainda são encontrados nos jardins, tais como: bactérias, fungos filamentosos e leveduras (Currie *et al.*, 1999; Rodrigues *et al.*, 2011). Portanto, para contornar as defesas naturais em colônias de formigas cortadeiras, deve-se focar no estudo das comunidades de microrganismos dos jardins, e não apenas em “organismos-chave”, já conhecidos por suas associações com estes insetos.

Outras espécies de microfungos presentes dentro das colônias foram estudados na intenção de avaliar suas possíveis funções dentro das colônias. Contudo, a maioria não apresenta relevância as colônias de formigas, por se tratar de espécies oportunistas e não serem específicas às *Attini* (Rodrigues *et al.*, 2011). Entretanto, a maioria destes trabalhos utiliza-se de técnicas dependentes de cultivo para o isolamento dos microrganismos, o que pode comprometer os resultados destes trabalhos, selecionando-se todo o contingente possível de microrganismos associados às colônias de formigas cortadeiras, podendo comprometer a avaliação da comunidade de microrganismos presentes na amostra de jardim.

Além do fungo do gênero *Leucoagaricus*, cultivado pelas formigas da tribo Attini, outro fungo bastante estudado é o seu parasita especializado *Escovopsis* sp. (Hypocreaceae, Hypocreales). Este fungo pode afetar o desenvolvimento do jardim de fungo simbiote, limitando o seu crescimento ou até mesmo tomando conta de todo o jardim provocando a sua morte (Currie e Stuart, 2001). Acredita-se que a relação de *Escovopsis* sp. com estes formigueiros seja muito antiga, indicando uma relação de coevolução com o fungo simbiote. A associação de *Escovopsis* sp. com as colônias de formigas Attini é tão íntima que não existem espécies que tenham sido encontradas fora de colônias de formigas (Currie *et al.*, 2003a). Apesar dos estudos direcionados a este parasita em particular, poucos aspectos referentes à sua biologia são conhecidos, bem como da forma de infecção dos formigueiros (Pagnocca *et al.*, 2012).

Este trabalho propõe pela primeira vez o uso de ferramentas moleculares para o estudo das populações de microfungos do filo Ascomycota (dentre eles o parasita *Escovopsis* sp.) em colônias de formigas cortadeiras. Através deste estudo pode-se determinar a população dos Ascomicetos presentes nos jardins, além de permitir a realização de análises da diversidade de suas populações.

Outra vertente deste trabalho é a busca pelo entendimento da dinâmica de infecção do parasita *Escovopsis* sp. nos jardins de formigas cortadeiras, visando uma possível estratégia de controle biológico através deste patógeno.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. As formigas cortadeiras

As formigas são insetos eussociais que constituem colônias que estabelecem divisão de trabalho entre diferentes castas, sejam reprodutivas ou estéreis. Além disto, se caracterizam pelo cuidado cooperativo com a prole e sobreposição de gerações em um mesmo ninho. Estes insetos são pertencentes à ordem Hymenoptera e se agrupam em apenas uma família, Formicidae (Wilson e Hölldobler, 1990). As formigas são abundantes na maior parte dos ecossistemas terrestres (Wilson, 1971). No entanto, a tribo Attini, que compreende os gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, conhecidas como formigas cortadeiras, é exclusiva da região neotropical. Estas formigas cortam e utilizam vegetais frescos como substrato de seus fungos simbiotes, sendo capazes de explorar a maioria das espécies cultivadas, ocupando lugar de destaque entre pragas de diversas culturas agrícolas no Neotrópico (Della Lucia, 2003). Suas associações simbióticas com fungos *Leucocoprineae* e *Pterulaceae*, que lhes servem de alimento, tiveram início há cerca de 45 a 50 milhões de anos (Schultz; Brady, 2008).

Dentro da tribo Attini existem gêneros basais que também cultivam fungo, mas que não adquiriram a habilidade de cortar e processar material vegetal fresco, utilizando folhas e frutos secos, além de carcaças de diversos artrópodes como substrato para o fungo. Os gêneros são: *Apterostigma*, *Cyphomyrmex*, *Mycetophylax*, *Mycocrepurus*, *Myrmicocrypta*, *Mycetosoritis*, *Mycetarotes*,

*Sericomyrmex*, *Trachymyrmex*, e *Mycetagroicus* (Della Lucia, 2003; Schultz e Brady, 2008).

No Brasil, ocorrem 20 espécies e nove subespécies taxonômicas aceitas de *Acromyrmex* (Brandão *et al.*, 2011). Este gênero é encontrado em praticamente todo o tipo de nicho ou bioma como: florestas subtropicais, tropicais e equatoriais úmidas ou secas, cerrados, pampas, desertos, caatingas e restingas, compreendido entre as latitudes 34°N e 41°S da região Neotropical. Portanto, sua ocorrência abrange desde a Califórnia até a Patagônia, incluindo Cuba e Trinidad. Porém, na América do Sul, só não ocorrem no Chile (Delabie *et al.*, 2011).

A espécie *Acromyrmex subterraneus subterraneus* é frequentemente encontrada nos estados de São Paulo, Amazonas, Ceará, Rio Grande do Norte, Minas Gerais, Espírito Santo, Mato Grosso, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro (Mayhé-Nunes, 1991). Seus ninhos são subterrâneos ou parcialmente subterrâneos, na maioria das vezes próximos aos sistemas radiculares de plantas, o que muitas vezes dificulta a sua coleta. O monte de terra solta pode atingir até dois metros de diâmetro, independente da idade da colônia, onde sob este se encontram duas ou três câmaras de formato irregular com diâmetros iguais ou superiores a 80 cm, quase sempre largas e achatadas. Os ninhos podem alcançar de 3,96 m<sup>2</sup> até 20 m<sup>2</sup>, chegando a uma profundidade de até 90 cm em relação ao nível do solo. Além disso, as colônias de *Acromyrmex* podem ser compostas por uma ou mais rainhas (Moreira e Della Lucia, 1993; Pereira e Della Lucia, 1998; Andrade, 2002).

Há uma grande variação na arquitetura dos ninhos, provavelmente, em função do clima e da época do ano. Em ninhos jovens, o fungo fica a mais ou menos 10 cm da superfície do solo, e aderido a raízes. Geralmente, os ninhos jovens apresentam somente uma câmara contendo o fungo, rainha(s) e prole (Forti *et al.*, 2011).

Em diferentes ecossistemas neotropicais as formigas cortadeiras participam ativamente na ciclagem de nutrientes do solo, seja por meio das câmaras subterrâneas de suas colônias ou pelas pilhas externas com matérias depositadas pelas formigas. Estes processos são responsáveis pela melhoria das propriedades físico-químicas do solo como a modificação das estruturas, da permeabilidade e a disponibilidade de nutrientes em suas câmaras de lixo e do fungo simbiote. Além disso, as formigas cortadeiras podem desempenhar um

papel importante na dispersão de sementes, dependendo, portanto de seus comportamentos frente aos diásporos, o local de deposição das sementes, a taxa de herbivoria de plântulas de sementes germinadas perto do ninho e o tipo de ecossistema onde elas ocorrem (Souto e Sternberg, 2011).

Apesar de suas funções benéficas nos ecossistemas neotropicais, estudos revelam que as formigas cortadeiras são favorecidas em áreas modificadas pela ação antrópica. A modificação do ambiente pode reduzir a população de predadores e parasitas dessas formigas, além de promover a proliferação de vegetais primários que são palatáveis e mais fáceis de serem alcançados, reduzindo custo energético na aquisição de folhas. Um exemplo deste benefício é o aumento da população de formigas cortadeiras em florestas convertidas a pastos e plantações (Forti *et al.*, 2011).

Os registros dos danos causados pelas formigas cortadeiras datam desde o descobrimento do Brasil, sendo pragas de diversas culturas do setor agrícola, pecuário e florestal. No último caso, destaca-se principalmente através dos prejuízos a cultura do eucalipto. Em florestas tropicais, estimou-se que somente o gênero *Atta* seja responsável pela desfolha de 12 a 17% da produção neste ecossistema (Cherrett, 1976). Costa *et al.* (2008) estimaram que cerca de 17% da vegetação do cerrado brasileiro é cortado pelas saúvas. Este índice representa duas a três vezes os danos causados por todos os outros herbívoros do cerrado somados. Portanto, as formigas cortadeiras são consideradas pragas importantes e a manutenção de suas populações abaixo dos níveis de danos econômicos é desejável nas áreas de suas ocorrências.

## **2.2. Fungos Ascomicetos associados às formigas cortadeiras**

O filo Ascomycota apresenta aproximadamente 64000 espécies conhecidas, sendo o maior e mais diversificado dos filos dos eucariotos. Suas espécies dominam diversos nichos nos ecossistemas aquáticos e terrestres, atuando como saprófitos de material orgânico, mutualistas, parasitas e patógenos de animais, de plantas e de outros fungos (Schoch *et al.*, 2009). Supõe-se que este ambiente criado para o cultivo subterrâneo do fungo simbiote seja igualmente próprio ao desenvolvimento de ascomicetos hipógenos.

O estudo dos fungos associados às formigas cortadeiras começou com o descobrimento do fungo simbiote do filo basidiomicota que elas cultivam. Mas, frequentemente, contaminações por outras espécies de fungos são observadas e relatadas (Moller, 1893; Pagnocca *et al.*, 2012). Ao longo dos anos, com o avanço da Microscopia Óptica no meio científico, diversas espécies de ascomicetos foram identificadas associadas, desde aos jardins de fungo simbiote, até com as próprias formigas cortadeiras (Rodrigues *et al.*, 2008a, 2011).

Dentre os ascomicetos estudados em jardins de formigas cortadeiras destaca-se o parasita *Escovopsis*. Este gênero ganhou importância por ser relatado como um parasita específico dos jardins de formigas da tribo Attini, e também por evidências que sugerem uma relação de coevolução com o fungo simbiote cultivado pelas formigas dessa tribo (Currie *et al.*, 1999; Currie *et al.*, 2003a). Todavia, além de *Escovopsis* sp., outros ascomicetos são comumente isolados de colônias de Attini. Trabalhos envolvendo colônias intóxicas com iscas a base de sulfluramida, conduzem a infecções pelo fungo *Escovopsis* sp. (Carlos *et al.* 2011). Contudo, outras espécies de fungos também foram observadas colonizando os jardins (Figura 1).

Exemplos de ascomicetos dos gêneros *Cunninghamella*, *Fusarium*, e *Trichoderma* são frequentemente encontrados em ninhos de *Atta* e *Acromyrmex* (Rodrigues *et al.*, 2005, 2008a). Recentemente, três novas espécies como *Trichoderma attinorum*, *T. texanum* e *T. longifialidicum* foram descritas em colônias de Attinis, sugerindo-se que a ocorrência de novas espécies associadas a essas formigas pode estar relacionada à dinâmica de comportamento de forrageamento (Montoya *et al.*, 2016).



Figura 1. Fungo oportunista (*Aspergillus* sp.) crescendo sobre o jardim de *Atta sexdens rubropilosa* tratada com inseticida. Observações realizadas em ensaios preliminares.

Alguns trabalhos sugerem que a maioria dos fungos filamentosos provenientes dos jardins das Attini tem origem endofítica, podendo ser encontrados também no material vegetal coletado pelas operárias (Guedes *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2008a, 2011). Guedes *et al.* (2012) ao estudar fungos associados ao tegumento de *Atta laevigata*, isolaram alguns fungos associados a plantas como: *Alternaria arborescens*, *Bipolaris sorokiniana*, *Bipolaris eleusines*, *Bipolaris zeae*, *Curvularia trifolii* e *Paraphaeosphaeria michotii*.

Espécies de ascomicetos na forma de leveduras também são comumente encontradas nos jardins de formigas cortadeiras. Um dos primeiros relatos de leveduras em jardins de formigas cortadeiras foi realizado em amostras de jardim de *Atta cephalotes* e *Acromyrmex octospinosus*. Através de microscopia eletrônica de varredura pôde-se observar a presença de leveduras associadas aos jardins (Craven *et al.*, 1970).

Espécies novas de leveduras foram relatadas em jardins de formigas da tribo Attini, como *Blastobotrys attinorum* (Carreiro *et al.*, 2004) e *Starmerella acetii* (Melo *et al.*, 2014). Little e Currie (2008) identificaram a presença de leveduras do

gênero *Phialophora* na parte ventral do abdômen de formigas do gênero *Apterostigma* sp. Este trabalho demonstra que a levedura *Phialophora* apresenta efeito antibiótico sobre as bactérias simbiotes associadas ao tegumento de formigas Attini, *Pseudonocardia*, tornando as colônias mais susceptíveis ao fungo parasita *Escovopsis*.

Rodrigues *et al.*, (2009) encontraram associadas aos jardins de formigas cortadeiras *Atta texana*, espécies de leveduras capazes de inibir o crescimento micelial dos fungos *Escovopsis*, *Syncephalastrum racemosum* e *Beauveria bassiana*, indicando que as leveduras desempenham funções antagônicas aos inimigos naturais das formigas cortadeiras juntamente com as actinobactérias *Pseudonocardia*.

No caso de fungos associados às formigas, houve relatos de infecções incomuns em rainhas de *Acromyrmex octospinosus* e *Atta colombica* provocadas pelo fungo entomopatogênico *Ophiocordyceps*, teliomorfo de *Hirsutella* (Hughes *et al.*, 2009). Os autores mostraram também a habilidade de *Ophiocordyceps* alternar entre hospedeiros de diferentes subfamílias e gêneros de Attini *Atta*, *Acromyrmex*, *Sericomyrmex* e *Apterostigma* (Myrmicinae, Attini) e o gênero *Camponotus* (Formicinae). Isto pode indicar uma recente relação entre parasita e hospedeiro na evolução.

Em regiões temperadas, os entomopatógenos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* são comumente encontrados no solo, podendo estar associados principalmente aos hospedeiros terrestres, de forma que os insetos que vivem no solo estão mais susceptíveis à contaminação (Bidochka *et al.*, 1998). Existem poucos relatos dos gêneros *Beauveria* e *Metarhizium* infectando insetos sociais. Para insetos sociais hipógenos, os dados ainda são escassos (Schmid-Hempel, 1998), havendo relatos mostrando sua ocorrência natural em formigas cortadeiras. Diehl-Fleig *et al.* (1992), por exemplo, isolaram *B. bassiana* de operárias da espécie *Atta sexdens piriventris*. Alves (1998) obteve isolados de *M. anisopliae* var. *anisopliae* a partir de rainhas de *A. sexdens rubropilosa*, enquanto Rodrigues *et al.*, (2005) conseguiram isolar o mesmo entomopatógeno a partir do fungo simbiote de ninhos de *A. sexdens rubropilosa*. Ribeiro *et al.* (2012) verificaram a presença dos fungos *Aspergillus ochraceus*, e *Beauveria bassiana* associados a operárias de *Atta bisphaerica*, relatando-os como possíveis agentes de controle biológico.

O fato de haver poucos relatos de patógenos atacando colônias de formigas cortadeiras indica a presença de sistemas defensivos bem desenvolvidos e complexos por parte das formigas cortadeiras, muitos dos quais são objetos de estudos.

### 2.3. Defesas de formigas cortadeiras contra patógenos

A organização social das formigas cortadeiras é considerada uma estratégia eficiente de defesa contra invasores de suas colônias, pois estes insetos constituem um superorganismo. Cada componente tem comportamento destinado ao bem de todos os demais, quer seja através de cuidados e cooperação, divisão de tarefas entre castas e sobreposição de gerações (Wilson, 1971).

Hughes *et al.* (2002), em trabalho com a espécie *Acromyrmex echinator*, verificaram que, quando as formigas são expostas aos esporos de *M. anisopliae*, a taxa de transmissão da doença é inversamente proporcional à densidade das populações destes insetos. Ou seja, quando juntas, estas formigas apresentaram uma melhora substancial na taxa de sobrevivência frente ao entomopatógeno. Currie e Stuart (2001) observaram o comportamento de limpeza das operárias de *Atta colombica* frente à contaminação de seus ninhos pelos patógenos *Trichoderma viride* e *Escovopsis* sp., onde dois tipos de atividades foram observados: (grooming) limpeza dos esporos de patógenos e (weeding) remoção de substratos infectados. Além disso, verificaram-se os processos de higiene como: autolimpeza do tegumento (“self-grooming”), limpeza do fungo simbiote (“fungus-grooming”) e remoção de partes contaminadas do jardim. Estes procedimentos ocorreram logo após a introdução dos patógenos, indicando que esses são os artifícios primários dentro de uma colônia infectada. A limpeza envolve basicamente a lambadura das superfícies a serem limpas e o armazenando das partículas indesejadas na cavidade infrabucal, típica das formigas (Wilson e Hölldobler, 1990). Os resíduos da cavidade infrabucal são transportados até as câmaras de lixo, onde são regurgitados como “pellets” (Pagnocca *et al.* 2011).

A divisão do ninho em compartimentos com áreas dedicadas à deposição dos materiais indesejados é considerada uma estratégia profilática adotada pelas formigas, pois o lixo fica isolado do fungo que lhes serve de alimento (Currie e Stuart, 2001; Hart e Ratnieks, 2002). Ballari *et al.* (2007) notaram a existência de

diferenças comportamentais entre operárias que realizavam diferentes tarefas, como a remoção e a deposição do lixo, o manejo e a manutenção do fungo simbiote e o corte e a condução de folhas frescas em colônias de *Acromyrmex lobicornis*. As formigas destinadas a uma atividade não desempenhavam funções diferentes. Além disso, operárias responsáveis pelo manejo do lixo não tinham acesso à câmara do fungo, sendo as mesmas impedidas de transitar pela mesma trilha das formigas que cortavam e transportavam folhas (Hart e Ratnieks, 2002; Ballari *et al.*, 2007). Os comportamentos de higiene, limpeza e manejo do lixo, portanto, aperfeiçoam as condições de crescimento e proteção dos jardins de fungo contra parasitas e competidores (Currie e Stuart, 2001; Bot *et al.*, 2001).

As formigas cortadeiras também apresentam mecanismos fisiológicos como meio de defesa de suas colônias, através de secreções de substâncias pelas glândulas mandibulares, que podem minimizar a ação de compostos tóxicos como o tanino e terpenoides, além de reduzir a germinação de conídios de fitopatógenos, como exemplo: *Botrytis cinerea* (Marsaro *et al.*, 2001) e eventuais fungos parasíticos, saprófitos ou endófitos, presentes na forragem. Contudo, suas secreções não foram capazes de interferir na germinação de *Escovopsis weberi* e *Metarhizium anisopliae* (Rodrigues *et al.*, 2008b). Outra glândula comumente encontrada em formigas cortadeiras foi reportada como sendo capaz de atuar contra o entomopatógeno *M. anisopliae*. Trata-se da glândula metapleurais que, de acordo com o trabalho de Poulsen *et al.* (2002), é capaz de produzir compostos antifúngicos em operárias de *Acromyrmex octospinosus*. Neste trabalho, operárias que tiveram suas glândulas metapleurais tampadas com uma película de esmalte foram mais susceptíveis à infecção por *M. anisopliae* do que operárias com suas glândulas tampadas. Os compostos secretados pelas glândulas metapleurais podem ser lambidos e espalhados no tegumento no momento da autolimpeza. Esta atividade foi observada em formigas dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, com significativo aumento deste comportamento na presença de agentes infecciosos, dentre eles *E. weberi* e *M. anisopliae* (Fernández-Marín *et al.*, 2006).

Em formigas do gênero *Atta*, a glândula metapleurais parece desempenhar um papel mais importante contra patógenos, tendo em vista o seu maior volume e a ausência de bactérias simbiotes visíveis nos seus tegumentos se comparada com formigas do gênero *Acromyrmex* (Currie *et al.*, 2006; Sen *et al.*, 2009; Fernández-Marín *et al.*, 2009; Lacerda *et al.*, 2010).

## TRABALHO I

### COMUNIDADE DE FUNGOS ASCOMICETOS EM JARDINS DE TRÊS ESPÉCIES DE *Acromyrmex*

## RESUMO

As formigas cortadeiras são comumente conhecidas por suas organizações sociais, que lhes conferem uma forte defesa contra organismos invasores em suas colônias. Além desse atributo, estes insetos apresentam características morfológicas, estruturais e fisiológicas que reforçam ainda mais a guarda em seus ninhos contra microrganismos invasores. Todavia, além do fungo simbiote cultivado em suas colônias e do seu fungo parasita *Escovopsis*, pouco se conhece a respeito da microbiota fúngica associada aos seus jardins. Os trabalhos já conduzidos no sentido de estudar a comunidade de fungos associados aos jardins foram conduzidos utilizando-se metodologia padrão de isolamento e desenvolvimento desses microrganismos em meio de cultivo. Com o advento dos avanços em metodologias moleculares no estudo de populações de microrganismos, houve melhorias significativas nos estudos de comunidades. O presente estudo investiga, através de marcadores moleculares e clonagem, fungos do filo Ascomycota presentes em amostras de duas regiões dos jardins de três espécies de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex*: *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e *Acromyrmex coronatus*, ambas cortadeiras de plantas dicotiledôneas, e *Acromyrmex balzani*, cortadeira de gramíneas. Os fungos identificados a partir de amostras de jardim corresponderam ao total de 21 gêneros

e 40 espécies. A presença de ascomicetos leveduriformes foi maior em jardins de formigas cortadeiras de gramíneas (*A. balzani*) (57,5%) comparado a jardins de cortadeiras de dicotiledôneas (*A. subterraneus subterraneus* e *A. coronatus*) 12,5% e 15%. Leveduras do gênero *Metschnikowia* isoladas a partir dos jardins foram capazes de inibir o crescimento micelial do fungo *Escovopsis* sp. e do oportunista *Penicillium* sp., colocando em questão suas funções dentro das colônias. Este é o primeiro relato da presença de leveduras do gênero *Metchnikowia* em jardins de formigas cortadeiras.

## ABSTRACT

Leaf-cutting ants are commonly known for their social organizations, which provide them with a strong defense against invading organisms in their colonies. In addition to this attribute, these insects present morphological, physiological and structural features that further reinforce the defense of their nests against invading microorganisms. However, apart from the symbiotic fungus cultivated in its colonies and its parasitic fungus *Escovopsis*, little is known about the fungal microbiota associated with leaf-cutting ant gardens. The work conducted to study the fungal community associated with the gardens were conducted using standard methods of isolation and development of these microorganisms in culture media. With the advent of advances in molecular methodologies for the study of populations of microorganisms, there has been significant improvements in studies of microbial communities. The present study investigates, through molecular markers and cloning, Ascomycota present in samples from two regions of the gardens of three species of leaf-cutting ants of the genus *Acromyrmex*: *Acromyrmex subterraneus subterraneus* and *Acromyrmex coronatus*, both of which cut dicotyledonous plants, and *Acromyrmex balzani*, which is a grass cutting species. The fungi identified from garden samples corresponded to a total of 21 genera and 40 species. The presence of ascomycete yeast was higher in gardens of the leaf-cutting ant *A. balzani* (57.5%)

compared to *A. subterraneus subterraneus* and *A. coronatus* (12.5% and 15% respectively). *Metschnikowia* yeasts isolated from the gardens were able to inhibit the mycelial growth of the fungus *Escovopsis* sp. and opportunistic *Penicillium* calling into question their functions within the colonies. This is the first report of the presence of *Metschnikowia* yeasts in gardens of leaf-cutting ants.

## 1. INTRODUÇÃO

O estudo dos microrganismos associados às colônias de formigas da tribo Attini e sua coevolução teve seu início junto ao estudo do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*, que as formigas cultivam para alimentar-se em suas colônias (Chapela *et al.* 1994). Desde então, novos microrganismos associados às formigas Attini foram descritos como a bactéria simbiote *Pseudonocardia* sp., presentes em estruturas especializadas no tegumento de operárias, que apresenta atividade antagonista ao fungo parasita específico dos jardins, *Escovopsis* sp. (Currie *et al.*, 1999, 2003b). Outros microrganismos considerados como secundários, por não estarem intimamente relacionados às formigas Attinis, foram encontrados dentro de suas colônias, como exemplo a bactéria *Burkholderia* sp., responsável pela produção de compostos que inibem a germinação de esporos de *Escovopsis* sp., os fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* e o hiperparasita *Lecanicillium lecanii* (Santos *et al.* 2004). Também a bactéria *Streptomyces* sp. é comumente isolada a partir de formigas cortadeiras e produz metabolitos inibitórios contra *Escovopsis* sp. (Sen *et al.* 2009), além de bactérias e leveduras decompositoras de celulose (Bacci *et al.*, 1995; Carreiro *et al.*, 1997). Assim, deduz-se que o ambiente criado pelas formigas é propício ao desenvolvimento do fungo simbiote e de fungos invasores (Pagnocca *et al.* 2012). Portanto, a comunidade de microrganismos dentro dos ninhos das Attini é complexa, tendo em vista a ocorrência de organismos provenientes do solo e de endofíticos que acompanham o material vegetal introduzido pelas formigas aos jardins.

À procura pelo estudo de possíveis agentes antagônicos existentes na cultura do fungo simbiote, Rodrigues *et al.* (2008a) isolaram diversos fungos provenientes dos jardins de dez espécies distintas de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex*, revelando um total de 85 estirpes de fungos presentes em seus jardins, sendo os fungos *Fusarium oxysporum* e *Escovopsis* os mais predominantes. Estudando a comunidade de fungos nos jardins de formigas de três espécies da tribo Attini: *Cyphomyrmex wheeleri*, *Trachymyrmex septentrionalis* e *Atta texana*, Rodrigues *et al.* (2011), ao longo de um ano, isolaram um total de 1435

amostras de fungos, e sugeriram através de análise de correspondência e UNIFRAC do gene 5.8S-rRNA uma estruturação da comunidade de fungos de acordo com a espécie de formiga hospedeira. Questiona-se, portanto, o papel de fungos secundários existentes nos jardins das Attinis, tendo em vista que estes microrganismos podem ser transitórios, não desempenhando nenhuma função em seus ninhos (Currie *et al.* 2006; Rodrigues *et al.* 2011). Outros, por sua vez, podem desempenhar funções importantes para a integridade dos processos metabólicos dentro das colônias (Rodrigues *et al.* 2008a, 2009; Mendes *et al.* 2012; Pagnocca *et al.* 2012). Um exemplo disso são os fungos endofíticos que são controlados constantemente pelas operárias, principalmente as espécies de crescimento rápido (Van Bael *et al.*, 2009). Algumas estirpes de crescimento lento podem permanecer no material vegetal e competir com o fungo simbionte pelo próprio substrato futuramente. Rodrigues *et al.* (2005) reportaram uma maior ocorrência dos fungos *Fusarium oxysporum* e *Trichoderma harzianum* comparados ao parasita *Escovopsis* sp.. Outros exemplos são os fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae*, *Purpureocillium lilacinum* e *Beauveria bassiana*, encontrados normalmente infectando formigas cortadeiras e que também são endofíticos em folhas, ramos e raízes de plantas (Van Bael *et al.*, 2012; Sasan; Bidochka, 2012; Lopez; Sword, 2015).

Além dos fungos filamentosos, diversas espécies de leveduras já foram isoladas a partir dos jardins das Attini. Dentre as espécies isoladas, três espécies novas foram descritas como: *Sympodiomyces attinorum*, *Cryptococcus haglerorum* e *Trichosporon chiarellii* (Carreiro *et al.* 2004; Middelhoven *et al.* 2010; Pagnocca *et al.* 2010). Carreiro *et al.* (2002) verificaram a produção de micotoxinas (ou toxinas “killer”) em 99 estirpes de leveduras isoladas a partir dos jardins e das câmaras de lixo de colônias de *Atta sexdens*, a maioria das estirpes (78%) foi capaz de matar ou de inibir o crescimento de outras estirpes comuns nos mesmos ninhos. Além disso, Rodrigues *et al.* (2009) propuseram que leveduras podem ter um papel protetor contra fungos filamentosos, encontrados na cultura do fungo mutualista. Estudando o perfil enzimático de degradação de polissacarídeos, Mendes *et al.* (2012) observaram que a maioria dentre 82 estirpes de leveduras isoladas de jardins de fungo de diferentes espécies de formigas cortadeiras, foi capaz de metabolizar polissacarídeos vegetais, sugerindo que esses microrganismos podem estar envolvidos no processamento do material vegetal presente no jardim,

disponibilizando nutrientes que auxiliariam no crescimento do fungo mutualista. Além disso, algumas leveduras poderiam auxiliar na eliminação de toxinas, como o ácido galacturônico, o qual não é assimilado pelo fungo mutualista e é prejudicial às formigas (Silva *et al.* 2003).

Contudo, a maioria dos trabalhos de diversidade de interação microbiana em jardins de formigas cortadeiras utiliza técnicas dependentes de cultivo para o isolamento das espécies, selecionando espécies de microfungos de rápido crescimento, o que pode mascarar a real comunidade presente nas amostras. Este trabalho propõe, pela primeira vez, o uso de ferramentas moleculares para o estudo das populações de microfungos do filo Ascomycota, em jardins de fungo de colônias de campo de três espécies de *Acromyrmex*. Na busca pelo entendimento da composição da comunidade e também por possíveis Ascomicetos nocivos aos jardins, foram estudadas duas regiões distintas nos jardins de fungo: superior, onde encontra o material vegetal recém-introduzido pelas formigas, e inferior, região com material vegetal já degradado.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Coleta e preparo de amostras de jardins de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex*

Para realização deste trabalho foi necessária coleta de amostras de jardins de formigueiros de três espécies do gênero *Acromyrmex* (Tabela 1). As amostras foram coletadas a partir de colônias de campo que foram escavadas de forma mecânica, com escavadeira manual. As colônias foram encontradas no subsolo a profundidades em torno de 60 cm. Das panelas dos jardins foram amostradas duas regiões distintas; superior e inferior. As amostras foram coletadas com espátula estéril; e acondicionadas em tubos Falcon estéreis, de 100 mL; etiquetadas de acordo com a localização e a espécie de formiga. Os tubos foram mantidos em gelo durante o trajeto do campo até o laboratório, e no laboratório mantidos em freezer a -4°C. As amostras compreenderam a mistura de fungo simbiote com substrato

foliar e algumas operárias. As operárias presentes nas amostras foram removidas posteriormente em uma câmara de fluxo, com auxílio de pinças esterilizadas, sob lupa binocular. Após a remoção das operárias, as amostras foram colocadas em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL (Eppendorf®) estéreis e liofilizadas por 24 h. Depois de liofilizados, os tubos com as amostras foram vedados e armazenados em caixas plásticas vedadas, contendo sílica gel, para evitar umidade e contaminações secundárias.

Tabela 1. Localização das colônias amostradas de três espécies de *Acromyrmex*, utilizadas neste trabalho para caracterização da microbiota associado a jardins de fungo mutualista

<b>Espécies</b>	<b>Localização</b>
<i>Acromyrmex balzani</i>	Campus da Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ
<i>Acromyrmex subterraneus subterraneus</i>	Barra Alegre, Bom Jardim, RJ
<i>Acromyrmex coronatus</i>	Barra Alegre, Bom Jardim, RJ

As amostras liofilizadas foram colocadas em caixas estéreis contendo sílica gel, lacradas e enviadas para o laboratório do Professor Daniel Henk no Department of Biology & Biochemistry da University of Bath na cidade de Bath, Reino Unido, onde todos os trabalhos envolvendo técnicas moleculares foram desenvolvidos.

## 2.2. Extração de DNA metagenômico das amostras de jardim

O DNA metagenômico foi extraído a partir de 0,1 g da amostra de jardim liofilizada, utilizando-se o kit de extração ZR Soil Microbe DNA MiniPrep™ (Zymo Research®). A metodologia de extração foi a mesma recomendada pelo fornecedor do kit (em: <https://www.zymoresearch.com>). A agitação das amostras na fase de lise das células foi realizada usando a máquina Precellys® Evolution, com 5 ciclos de 30 s intercalados por 15 s de descanso.

### 2.3. Amplificação do DNA de Ascomicetos

Na intenção de excluir o fungo *L. gongylophorus* (Filo: Basidiomycota) que compõe mais de 90% do material fúngico nas amostras, utilizou-se o primer específico para o gene da região Internal Transcribed Space (ITS) de Ascomycota ITS4-Asco (antisenso) (Nikolcheva e Bärlocher, 2004), juntamente com o primer ITS1F (senso) (Gardes e Bruns, 1993). As condições para amplificação (PCR Touchdown) foram de 95°C, por 15 min., para desnaturação inicial; em gradiente (-1 a cada ciclo) 25 ciclos de 95°C, por 30 s, para desnaturação; 55°C por 1 min., para emparelhamento; 72°C, por 2 min., para alongamento. Os reagentes utilizados foram REDTaq<sup>®</sup> ReadyMix<sup>™</sup> (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) 22,5µl, 1µl de cada primer e 1µl do DNA extraído da amostra ([www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)).

Os produtos do PCR foram analisados em gel de agarose (1.5%). O padrão (1kb DNA Ladder da Promega<sup>®</sup>) de 1000pb a 100pb foi usado em todos os géis de eletroforese.

O DNA amplificado foi preparado para sequenciamento, adicionando-se nos tubos 1µl do amplicon, 1µl do primer ITS1F e 15µl de água Milli-Q estéril. O sequenciamento foi realizado pelo método Sanger, da empresa Eurofins UK.

### 2.4. Clonagem e sequenciamento das amplicons

Para realização da separação dos fragmentos amplificados, utilizou-se o kit de clonagem Life Technologies<sup>™</sup> (TOPO<sup>®</sup>-TA Cloning), juntamente com células competentes Transform One Shot<sup>®</sup> (Match1<sup>™</sup>-T1<sup>®</sup>) ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)). As células competentes transformadas foram espalhadas em meio LB-ágar contendo Kanamicina (1mL/L de meio) e 40µl de Xgal, em placas, incubando a 37 °C. Os transformantes crescidos foram transferidos com auxílio de ponteiras estéreis para tubos de PCR, contendo 14µl de Taq (Dream GreenTaq) e 0,4µl de cada primer M13F e M13R para amplificação dos vetores. Os produtos do PCR foram analisados através de eletroforese em gel e as amostras que apresentaram bandas foram enviadas para sequenciamento pela empresa Eurofins. Foram sequenciados 20 clones presentes em cada amostra das regiões superior e inferior dos jardins de

cada espécie de formiga, totalizando, ao final, 40 amplicons por espécie, em um total de 120 amplicons para as três espécies de formigas estudadas.

## 2.5. Isolamento de fungos filamentosos e leveduras

Amostras de jardins de colônias das formigas cortadeiras *A. subterraneus subterraneus* e *A. sexdens rubropilosa*, mantidas em condições controladas na Unidade de Mirmecologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, foram coletadas conforme descrito. As operárias presentes nas amostras foram removidas com pinças estéreis e cerca de 500 mg de cada material foi inserido em tubo Falcon, de 50 ml contendo 10 ml de solução de Tween 80 estéril (0,05%) e agitado sob vórtex por 1 min. Da suspensão obtida, 200 µl foram espalhados com alça de drigalski sobre meio Sabouraud Dextrose Ágar (SDA), e contendo antibiótico cloranfenicol (100 mg/L), em placas de Petri. Após 15 dias, em uma câmara de germinação a 28°C ±1°C, as unidades formadoras de colônia foram reisoladas em meio SDA, em placas. As culturas de leveduras obtidas foram identificadas com o kit API 20 C AUX (Biomérieux®) e as cepas de *Metschnikowia* sp. foram reservadas para os testes de antibiose a seguir. Algumas estirpes de fungos filamentosos de *Escovopsis* sp. e *Penicillium* sp. obtidas nestes isolamentos foram identificadas sob microscopia óptica e mantidas em placas com meio SDA a 28°C ±1°C para os testes de antibiose, a seguir.

## 2.6. Teste de antibiose em meio de cultivo

Os testes de antibiose foram realizados em meio SDA em placas de 9 cm de diâmetro. Cepas de *Metschnikowia* sp. foram repicadas para o centro da placa de Petri com auxílio de alça de platina estéril, e incubadas por 15 dias a 28°C ±1°C. Foram preparadas suspensões de 1x10<sup>7</sup> conídios por ml em Tween (Tween 80, 0,05%) dos fungos *Escovopsis* sp., *Penicillium* sp., e *Metarhizium anisopliae* (ESALQ 818). Foram pipetados 100 µl de cada suspensão nas placas, ao redor do isolado de *Metschnikowia* sp., onde as suspensões foram espalhadas através de uma alça de Drigalski, evitando-se a região com a levedura. Após 15 dias de incubação a 28°C, avaliou-se a presença ou não de halos de inibição.

## 2.7. Análises estatísticas e gráficos

Os ascomicetos identificados a partir das amostras da região superior e inferior de jardins de *A. subterraneus subterraneus*, *A. coronatus* e *A. balzani* foram contabilizados e classificados quanto à forma micelial ou leveduriforme. Testes de  $X^2$ , considerando 5% de nível de significância, foram realizados para comparação das populações de ascomicetos entre espécies de formigas e entre as regiões dos jardins amostradas. Análises e gráficos foram realizados por meio do software R v3.2.4.

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Prevalência de fungos do filo Ascomycota nos jardins de formigas cortadeiras

A identificação molecular das regiões ITS permitiu a distinção de 21 gêneros e 40 espécies, e mais 12 sequências de fungos ainda não identificados (Tabela 2). A maioria das sequências não identificadas, apresentou similaridade com sequências de ascomicetos filamentosos pela ferramenta BLAST. As sequências da Tabela 2 estão depositadas no Genbank com os códigos LE211001 a LE211120.

Tabela 2. Espécies de Ascomicetos identificados por análise BLASTn de sequências ITS obtidos por clonagem do DNA metagenômico extraído de amostras das regiões superior e inferior de jardins de 3 espécies de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* e informações sobre a origem das sequências homólogas extraídas do genbank.

Sequencias mais próximas			<i>Acromyrmex</i> spp.						Total	%	Origem ou fonte da coleta:
Espécies de fungos	Acesso	% Identidade	<i>subterraneus</i>		<i>coronatus</i>		<i>balzani</i>				
			Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior			
<i>Acremonium</i> sp.	EF577238	99%	0	0	0	1	0	0	1	0,83	Solo
<i>Acremonium psammosporum</i>	GU566287	99%	1	0	0	0	0	0	1	0,83	Endofítico
<i>Ascomycota</i> sp.	HQ608060	90-91%	0	0	0	0	10	0	10	8,33	Colônia de formigas
<i>Candida</i> sp.	AB285025	94%	0	3	0	0	0	0	3	2,50	Endofítico
<i>Candida fructus</i>	FM178309	95-96%	0	0	4	0	0	0	4	3,33	Endofítico
<i>Chaetothyriales</i> sp.	KT268417	88%	0	0	0	1	0	0	1	0,83	Endofítico
<i>Cladophialophora</i> sp.	AB986426	96%	2	0	0	0	0	0	2	1,67	Solo florestal
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	AJ300331	99%	0	0	0	2	0	0	2	1,67	Endofítico
<i>Colletotrichum aotearoa</i>	KU498255	99%	1	1	0	0	0	0	2	1,67	Endofítico
<i>Escovopsis weberi</i>	KF293285	100%	0	0	0	1	0	0	1	0,83	Colônia de formigas
<i>Fusarium</i> sp1.	HQ630965	99-100%	2	1	0	0	0	0	3	2,50	Endofítico
<i>Fusarium oxysporum</i>	KP942940	99-100%	0	0	3	0	3	0	6	5,00	Endofítico
<i>Fusarium delphinoides</i>	KJ690090	99%	0	0	1	0	0	0	1	0,83	Endofítico
<i>Fusarium</i> sp2.	HQ631005	99%	0	0	0	1	0	0	1	0,83	Endofítico
<i>Helicoma olivaceum</i>	DQ351725	99%	1	0	0	0	0	0	1	0,83	n.d.
<i>Hypocreales</i> sp.	JQ649340	100%	0	0	0	1	0	0	1	0,83	Esponja marinha
<i>Metarhizium anisopliae</i>	KF624795	90%	0	0	0	1	0	0	1	0,83	Formiga <i>Solenopsis</i>
<i>Metschnikowia bicuspidata</i>	KP132407	97-98%	2	1	1	0	1	11	16	13,33	n.d.
<i>Metschnikowia</i> sp1.	KM243719	99%	0	0	3	0	1	3	7	5,83	n.d.
<i>Metschnikowia</i> sp2.	KM243735	99%	0	0	0	0	1	1	2	1,67	n.d.
<i>Metschnikowia</i> sp3.	KM243726	97%	0	0	0	0	0	1	1	0,83	n.d.
<i>Metschnikowia</i> sp4.	KM209327	97-98%	0	1	0	1	0	0	2	1,67	n.d.

Sequências mais próximas			<i>Acromyrmex</i> spp.						Total	%	Origem ou fonte da coleta:
Espécies de fungos	Acesso	% Identidade	<i>subterraneus</i>		<i>coronatus</i>		<i>balzani</i>				
			Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior			
<i>Metschnikowia</i> sp5.	KM243729	97-99%	0	0	0	0	0	2	2	1,67	n.d.
<i>Metschnikowia</i> sp6.	KM243742	99%	0	0	0	0	0	1	1	0,83	n.d.
<i>Metschnikowia</i> sp7.	KM243735	99%	0	1	0	0	0	0	1	0,83	n.d.
<i>Metschnikowia</i> sp8.	KM209325	97-98%	0	0	1	0	0	1	2	1,67	n.d.
<i>Ochroconis</i> sp.	KF156017	89%	0	0	0	1	0	0	1	0,83	n.d.
<i>Penicillium</i> sp1.	KF367511	99-100%	0	9	0	0	1	0	10	8,33	Ambiente
<i>Penicillium</i> sp2.	JF439496	98-99%	2	0	0	0	0	0	2	1,67	n.d.
<i>Penicillium nothofagi</i>	JN617712	99%	2	0	0	0	0	0	2	1,67	n.d.
<i>Penicillium</i> sp3.	HQ631040	99%	0	0	0	0	2	0	2	1,67	Endofítico
<i>Penicillium virgatum</i>	JF439503	99%	0	0	0	1	0	0	1	0,83	n.d.
<i>Pichia kluyveri</i> sp1.	KC905052	98%	0	1	0	0	0	0	1	0,83	Endofítico
<i>Pichia kluyveri</i> sp2.	KP132502	98%	0	1	0	0	0	0	1	0,83	n.d.
<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	KP942934	99%	0	0	1	1	0	0	2	1,67	Endofítico
<i>Pleosporales</i> sp.	KT268448	86-87%	2	0	0	0	0	0	2	1,67	Endofítico
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	HQ607867	100%	0	0	1	0	0	0	1	0,83	Colônia de formigas
<i>Sarocladium glaucum</i>	AB540577	99%	0	0	0	1	0	0	1	0,83	Ambiente
<i>Uncultured Ascomycota</i>	HM161962	95%	0	0	0	1	0	0	1	0,83	Endofítico
<i>Uncultured Plectosphaerella</i>	HE977552	98%	1	0	0	0	0	0	1	0,83	Solo
<i>Uncultured fungus</i> sp1.	KF800435	96%	0	1	0	0	0	0	1	0,83	Ambiente
<i>Uncultured fungus</i> sp2.	KT328768	97-98%	1	0	0	1	0	0	2	1,67	Endofítico
<i>Uncultured fungus</i> sp3.	GU078653	99%	0	0	2	0	0	0	2	1,67	Endofítico
<i>Uncultured fungus</i> sp4.	DQ420762	90%	0	0	0	0	1	0	1	0,83	Solo
<i>Uncultured fungus</i> sp5.	FJ213550	99%	0	0	0	1	0	0	1	0,83	Ambiente
<i>Uncultured fungus</i> sp6.	FN397256	98%	0	0	0	1	0	0	1	0,83	Solo
<i>Uncultured fungus</i> sp7.	HM069420	87%	0	0	1	0	0	0	1	0,83	Solo

Sequencias mais próximas			<i>Acromyrmex</i> spp.						Total	%	Origem ou fonte da coleta:
Espécies de fungos	Acesso	% Identidade	<i>subterraneus</i>		<i>coronatus</i>		<i>balzani</i>				
			Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior			
<i>Uncultured fungus</i> sp8.	JX368242	90%	0	0	0	1	0	0	1	0,83	Solo
<i>Uncultured fungus</i> sp9.	GU054046	99%	3	0	0	0	0	0	3	2,50	Ambiente
<i>Uncultured fungus</i> sp10.	JQ666367	99%	0	0	0	1	0	0	1	0,83	Solo florestal
<i>Verticillium</i> sp.	DQ914739	97-99%	0	0	1	1	0	0	2	1,67	n.d.
<i>Wickerhamomyces</i> sp.	JQ901906	94%	0	0	1	0	0	0	1	0,83	n.d.

Dos ascomicetos identificados em nível de espécie destacam-se as leveduras e os fungos filamentosos. As amostras de formigas cortadoras de dicotiledôneas foram as que apresentaram menor porcentagem de leveduras. Na colônia da espécie *A. subterraneus subterraneus*, 25% das amostras foram de leveduras, enquanto os 75% restantes foram de fungos filamentosos. Em colônias de *A. coronatus* os fungos leveduriformes totalizaram 27,5% e os filamentosos 72,5% das amostras. Já para *A. balzani*, específicas no corte de gramíneas, 57,5% das amostras foram de leveduras, enquanto que 42,5% foram de fungos filamentosos.

A diferença na proporção de leveduras entre as espécies que utilizam diferentes substratos vegetais foi significativa segundo o teste de  $X^2$  em nível de significância de 5% ( $p = 0,0282$ ). As colônias cortadeiras de dicotiledôneas (*A. coronatus* e *A. subterraneus subterraneus*), apresentaram proporcionalmente uma menor quantidade de leveduras se comparado com o número de espécies na forma filamentosa segundo teste de  $X^2$  em nível de significância de 5% ( $p = 0,0044$  e  $p = 0,0015$ ). Nas colônias de formigas cortadeiras de monocotiledôneas (*A. balzani*), a quantidade de espécies de fungos filamentosos encontradas nos jardins foi estatisticamente semelhante à de leveduras ( $X^2$  em nível de significância de 5%,  $p = 0,3428$ ).

Não houve diferença significativa na quantidade de leveduras entre as regiões amostradas nos jardins na espécie *A. subterraneus subterraneus* ( $X^2$  em nível de significância de 5%,  $p = 0,0577$ ). Para *A. coronatus*, a quantidade de leveduras na região superior foi significativamente maior (90,9% do total de leveduras) que na região inferior do jardim ( $X^2$  em nível de significância de 5%,  $p = 0,0066$ ). Na colônia de *A. balzani*, houve maior concentração de leveduras na região inferior do jardim (86,9% do total de leveduras) quando comparado com a superior ( $X^2$  em nível de significância de 5%,  $p = 0,0003$ ).

### **3.2. Espécies de leveduras encontradas nos jardins de formigas cortadeiras**

Dentre as leveduras o gênero mais frequente foi *Metschnikowia* sp., presente em todas as colônias estudadas. Este gênero representou 12,5%, 15% e 57,5% das amostras de ascomicetos identificados nos jardins de *A. subterraneus subterraneus*, *A. coronatus* e *A. balzani* respectivamente. Dentre as leveduras o

mesmo gênero representou 50%, 54,5% e 100% das amostras do DNA clonado provenientes das amostras de jardins de *A. subterraneus subterraneus*, *A. coronatus* e *A. balzani* respectivamente.

*Candida fructus* e *Candida* sp. foram espécies de leveduras abundantes em colônias de *A. coronatus* (36,4% das leveduras) e *A. subterraneus subterraneus* (30% das leveduras), respectivamente. As demais leveduras encontradas foram *Pichia* sp. (20%), em jardins de *A. subterraneus subterraneus*, e *Wickerhamomyces* sp. (9,1%) em jardins de *A. coronatus*.

### **3.3. Espécies de fungos filamentosos presentes nos jardins de formigas cortadeiras**

Considerando os fungos filamentosos identificados nos jardins de 3 espécies de *Acromyrmex*, os gêneros mais abundantes foram *Penicillium* sp. (14,17%) e *Fusarium* sp. (9,16%). Na colônia de *A. subterraneus subterraneus*, *Penicillium* sp. correspondeu a 32,5% dos fungos filamentosos. Em colônias de *A. coronatus* e *A. balzani*, o mesmo gênero correspondeu a apenas 2,5% e 7,5% dos fungos filamentosos, respectivamente. O gênero *Fusarium* sp. foi pouco frequente nos jardins de 3 espécies de *Acromyrmex*, representando 5% das amostras de *A. coronatus*, 7,5% de *A. subterraneus subterraneus* e 7,5% de *A. balzani*. Contudo, a maior fração das sequências de fungos filamentosos teve identidades mais próximas a fungos não cultiváveis (“Uncultured fungus” e Ascomycota sp.) e representou 20,83% das amostras das 3 espécies de formigas das quais 12,5% para *A. subterraneus subterraneus*, 22,5% para *A. coronatus* e 27,5% para *A. balzani*.

Dos parasitas dos jardins, *Escovopsis* sp., foi observado em 2,5% das amostras de ascomicetos de *A. coronatus*. Os fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Purpureocillium lilacinum* também foram encontrados em jardins de *A. coronatus*, representando 2,5% dos ascomicetos, respectivamente.

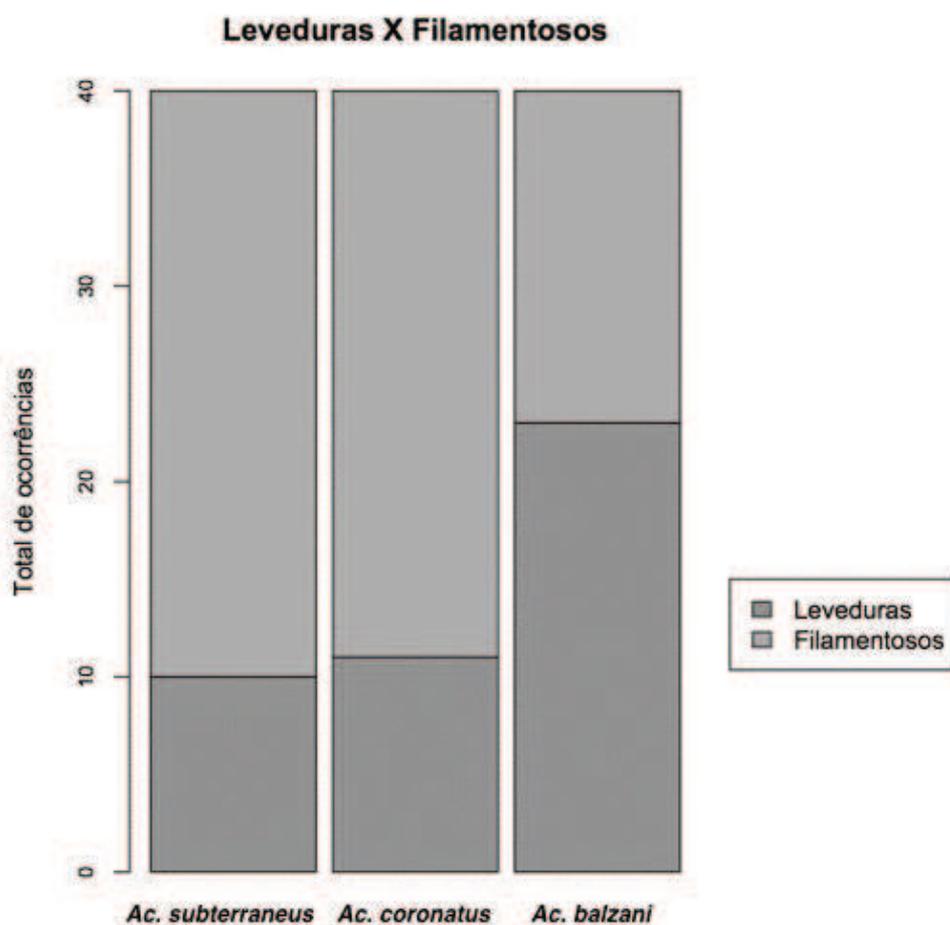


Figura 2. Proporção de leveduras em relação a fungos filamentosos, identificados por análise de Blastn de sequencias clonadas de DNA metagenômico obtido de amostras de jardins de 3 espécies de formigas cortadeiras: *A. subterraneus subterraneus*, *A. coronatus* e *A. balzani*.

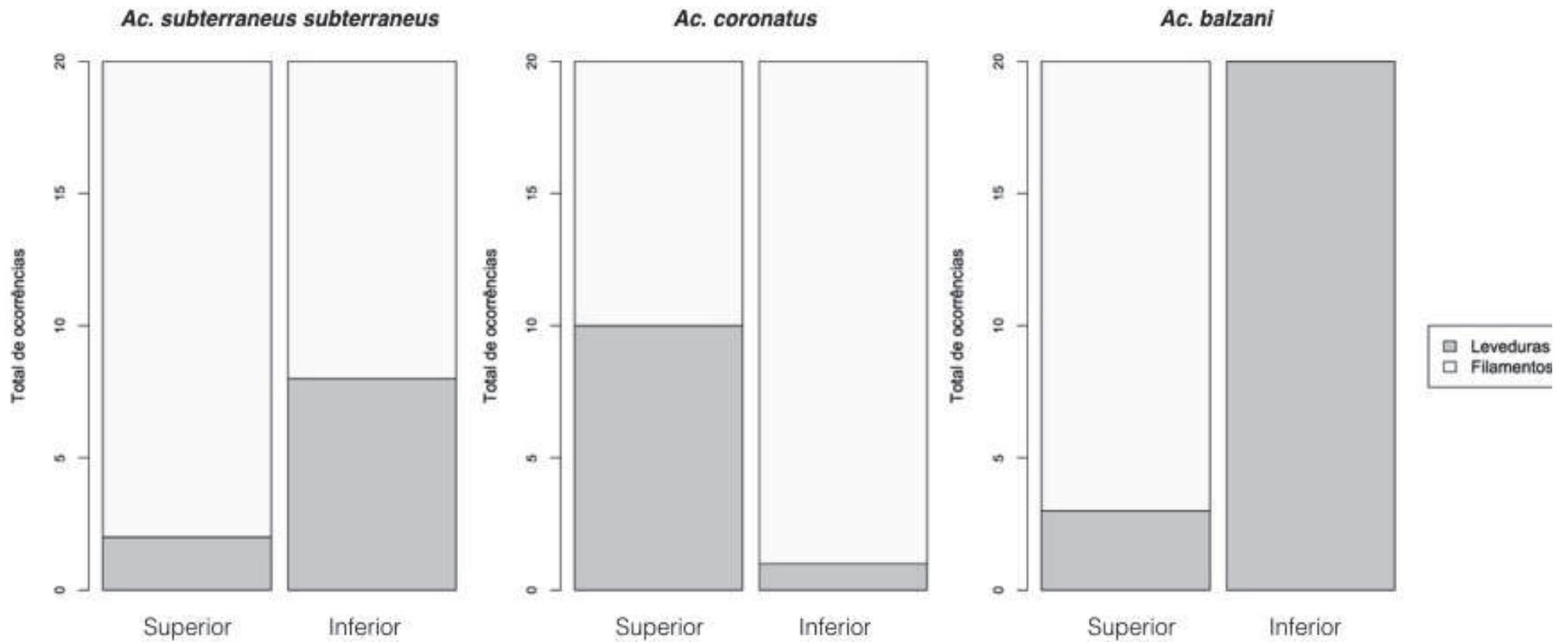


Figura 3. Proporção de leveduras em relação a fungos filamentosos presentes em DNA metagenômico das regiões superior e inferior de amostras de jardins de 3 espécies de formigas cortadeiras: *A. subterraneus subterraneus*, *A. coronatus* e *A. balzani*.

### 3.4. Leveduras isoladas a partir de colônias de formigas cortadeiras

Na tentativa de isolar a espécie de levedura *Metschnikowia* sp. identificada por análise de sequência clonada de metagenoma a partir de amostras de jardins de formigas cortadeiras *A. subterraneus subterraneus*, *A. coronatus* e *A. balzani*, foram feitos isolamentos em meio de cultura. Apenas uma cepa proveniente de uma colônia de *Atta sexdens rubropilosa* foi isolada e identificada como *Metschnikowia pulcherrima* (Figura 4), conforme teste bioquímico usando o kit API 20 C AUX (Biomérieux®). O teste bioquímico para leveduras foi capaz de demonstrar também que a levedura isolada é capaz de metabolizar polissacarídeos como: sorbitol, xilose, sacarose, ribose, N-acetil-glucosamina, celobiose, eritrol, maltose, trealose, melezitose, cálcio 2-ceto-gluconato, Metil- $\alpha$ D-glucopiranosido, manitol, glucose, sorbose, glicogênio e esculina.

API

ID32

- ID 32 C
- ID 32 E
- ID 32 STARH
- rapid ID 32 A
- rapid ID 32 E
- rapid ID 32 STREP

UEBF - Campos dos Goytacazes

apiweb

ID 32 C V4.0 [Impressão](#) [Exportar](#) [Novo teste](#) [Modificação](#)

REFERÊNCIA:

DATA: 26-01-2016

COMENTÁRIO:

BOA IDENTIFICAÇÃO

Galeria: ID 32 CV4.0

Perfil: 5157150317

Nota(s)

Taxa significativos	% ID	T	Teste(s) discordantes
<i>Candida pulcherrima</i>	93.2	0.79	XYL 83% RIB 80%

Taxon seguinte	% ID	T	Teste(s) discordantes
<i>Schwanniomyces etchellsii/Priceomyces carsonii</i>	4.0	0.77	GNT 12%

Figura 4. Resultado da espécie de levedura baseado no metabolismo dos carboidratos em teste de API através do acesso apiweb (Biomérieux®). O resultado foi da identificação foi *Candida pulcherrima* (anamorfo), contudo, o seu teleomorfo *Metschnikowia pulcherrima* não se encontra na base de dados para identificação. Portanto, considera-se neste trabalho que *Candida pulcherrima* e *Metschnikowia pulcherrima* se tratam do mesmo organismo.

### 3.5. Atividade antifúngica de leveduras isoladas a partir de jardins de formigas cortadeiras

A levedura *M. pulcherrima* isolada a partir de uma colônia de *Atta sexdens rubropilosa*, mostrou atividade de antibiose contra *Escovopsis* sp. e *Penicillium* sp., formando halo de inibição (Figuras 5a e 5b). No teste de antibiose entre a levedura *M. pulcherrima* e o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* não se observou halo de inibição (Figura 5c). Uma cepa de *M. pulcherrima* mantida no laboratório de ecologia de fungos no Department of Biology & Biochemistry da University of Bath demonstrou antibiose contra a bactéria simbiote de formigas cortadeiras *Pseudonocardia* sp. (Figura 5d).

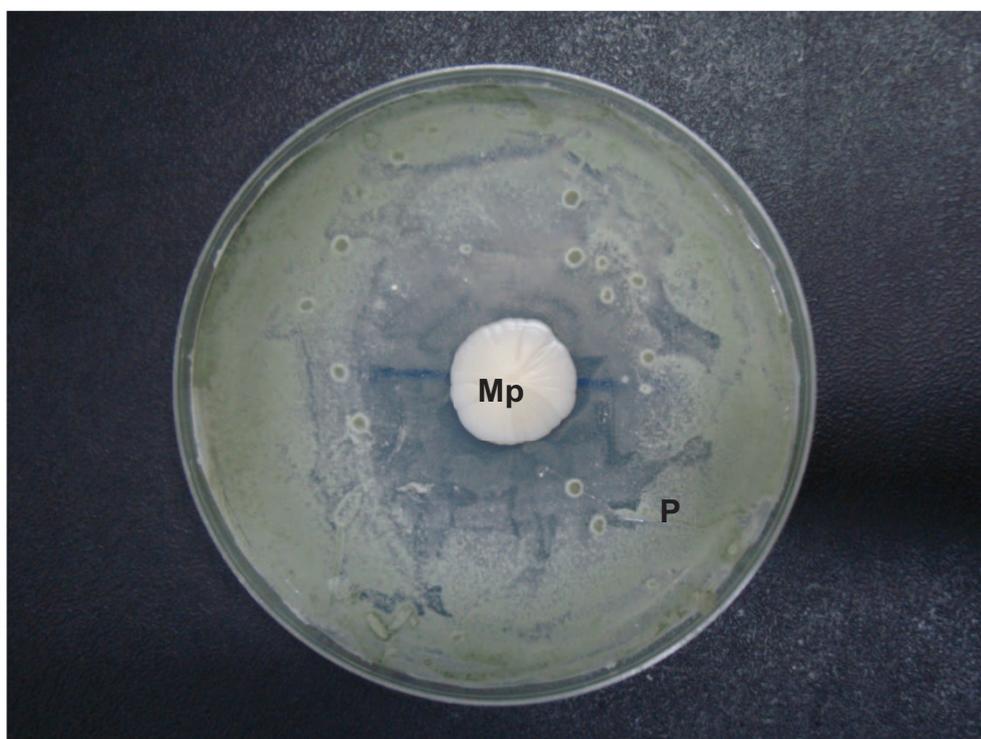


Figura 5a. *Metschnikowia pulcherrima* (Mp) contra *Penicillium* sp. (P)

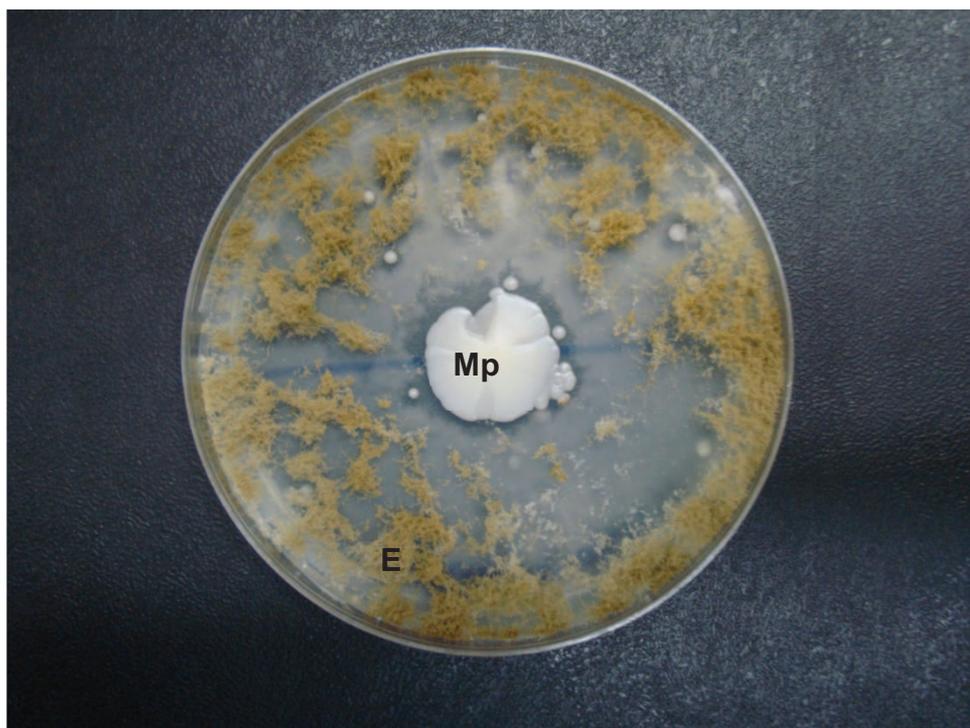


Figura 5b. *Metchnikowia pulcherrima* (Mp) contra *Escovopsis* sp. (E)

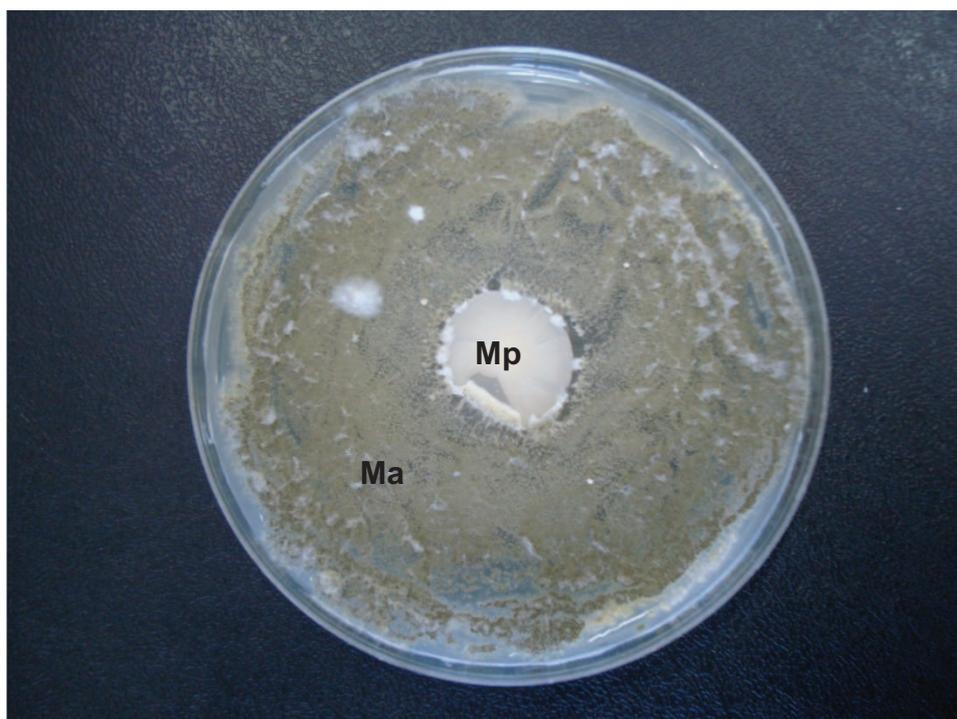


Figura 5c. Crescimento de *Metarhizium anisopliae* (Ma) sobre a levedura *Metschnikowia* sp (Mp).

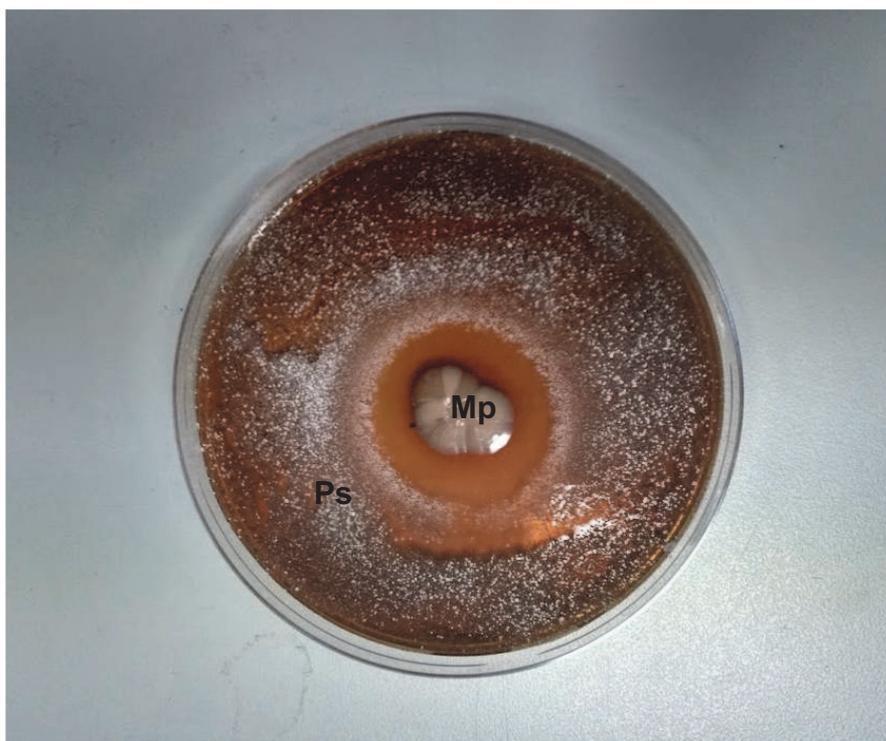


Figura 5d. *Metschnikowia pulcherrima* (Mp) contra a bactéria *Pseudonocardia* sp. (Ps)

#### 4. DISCUSSÃO

Neste trabalho foi realizado um screening molecular de fungos do filo Ascomycota presentes nos jardins de três espécies de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex*: *A. subterraneus subterraneus*, *A. coronatus* (cortadeiras de dicotiledôneas) e *A. balzani* (cortadeiras de gramíneas). As amostras de jardins também foram divididas em duas regiões distintas: superior (região apical onde o material vegetal introduzido pelas operárias é mais fresco) e inferior (região onde o material vegetal é mais antigo e mais desgastado). Com isto, foi possível observar as diferenças entre as comunidades de ascomicetos entre duas regiões dos jardins e também entre jardins cultivados com substratos vegetais diferentes. Apesar da diferença entre os substratos vegetais utilizados entre as espécies de formiga,

foram observadas diferenças sutis entre os gêneros das comunidades de fungos filamentosos presentes nos jardins quanto à diversidade e composição. Este resultado corrobora com Rodrigues *et al.* (2008a), onde foi observada uma ligeira diferença entre as comunidades de fungos filamentosos presentes nos jardins de formigas cortadeiras de dicotiledôneas (*Acromyrmex ambiguus*, *Acromyrmex aspersus*, *Acromyrmex coronatus*, *Acromyrmex crassispinus*, *Acromyrmex disciger*, *Acromyrmex hispidus falax*, *Acromyrmex laticeps* e *Acromyrmex lundí*), e monocotiledôneas (*Acromyrmex heyeri* e *Acromyrmex landolti*). Os resultados apresentados por estes autores levaram em consideração o estudo de espécies de fungos filamentosos isolados em meios de cultivo, desconsiderando-se espécies de leveduras.

Através de técnicas moleculares usadas neste trabalho foi possível determinar regiões de maior incidência de ascomicetos leveduriformes nos jardins comparados com fungos filamentosos. Na espécie *A. balzani*, ficou evidente a diferença da população de leveduras entre a região inferior e superior dos jardins, onde 100% da comunidade dos fungos da região inferior são leveduras. Na colônia de *A. subterraneus subterraneus*, a comunidade de leveduras na região inferior dos jardins foi estatisticamente igual à da superior. Na colônia de *A. coronatus*, a porcentagem de leveduras foi maior na região superior (45% da comunidade). Apesar da notável diferença das populações de leveduras entre as camadas dos jardins, pouco se sabe sobre as suas funções dentro das colônias, tendo em vista que poucos trabalhos têm sido desenvolvidos neste sentido. Carreiro *et al.* (1997) isolaram e identificaram 93 leveduras a partir de colônias de *Atta sexdens rubropilosa* e observaram que elas estão constantemente presentes na região superior dos jardins. Além disto, a metodologia de isolamento de leveduras pode conduzir a erros na estimativa de suas populações. Neste trabalho verificou-se que algumas espécies de leveduras encontradas através de técnicas moleculares nos jardins são difíceis de serem isoladas em meio de cultivo. Isto possivelmente ocorre devido à presença de espécies de crescimento rápido que sobrepõem espécies de crescimento lento, impossibilitando o isolamento de algumas espécies presentes na amostra do jardim.

O gênero de levedura *Metschnikowia* foi o único comum em todas as três colônias de *Acromyrmex* estudadas neste trabalho. Além disso, o gênero *Metschnikowia* representou uma parte considerável das comunidades de

ascomicetos nos jardins das três espécies, indicando que pode apresentar alguma função importante neste ambiente. Espécies de *Metschnikowia* sp. são endofíticas e são comumente encontradas habitando néctar florais, a superfície e região interna de frutos ricos em açúcares e também a superfície de tecidos de órgãos de reserva de algumas espécies de plantas (Isaeva *et al.*, 2010). Contudo, alguns trabalhos mostraram que foi possível isolar a levedura a partir da superfície de folhas de gramíneas como arroz e cana-de-açúcar (Kaewwichian *et al.* 2012; Limtong *et al.* 2014). Isso pode explicar a maior ocorrência deste gênero nos jardins de *A. balzani*, por esta formiga ser uma espécie cortadora de gramíneas. Apesar do gênero *Metschnikowia* ter sido comum entre as colônias de formigas deste trabalho, este é o primeiro relato deste gênero em colônias de formigas cortadeiras. Outros trabalhos envolvendo leveduras em colônias de formigas cortadeiras, relatam outros gêneros de Ascomicetos, contudo, nenhum destes trabalhos utilizou clonagem metagenômica (Carreiro *et al.*, 1997, 2002 e Rodrigues *et al.* 2008a, 2011).

Dentre os possíveis papéis desempenhados por leveduras em colônias de formigas cortadeiras, destaca-se na literatura a função de proteção contra fungos e bactérias nocivos aos jardins. Neste trabalho pode-se observar, através de testes de antibiose, que uma cepa de *Metschnikowia* isolada a partir de *Atta sexdens rubropilosa* apresentou antibiose contra alguns fungos filamentosos comumente encontrados nos jardins como *Penicillium* sp. e *Escovopsis* sp., ambos relatados como oportunistas ou parasitas dos jardins (Pagnocca *et al.* 2011). A função de proteção contra patógenos dos jardins através de leveduras já foi prevista e descrita por alguns trabalhos. Carreiro *et al.* (2002) descreveram gêneros de leveduras como *Aureobasidium*, *Rhadotorula*, *Tremella* e *Trichosporon* que produzem toxinas que matam ou inibem o crescimento de outras leveduras presentes em jardins de *Atta sexdens rubropilosa*. Rodrigues *et al.* (2009) verificaram que algumas leveduras têm ação antagonista a fungos filamentosos como *Escovopsis* sp., o oportunista *Syncephalastrum racemosum* e o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*, podendo desempenhar funções protetoras dentro dos jardins. O gênero *Metschnikowia* é conhecido pela sua capacidade de controlar fungos filamentosos fitopatogênicos problemáticos na pós-colheita, tais como *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* e *Alternaria alternata*, além de outras leveduras e bactérias que incidem sobre frutos armazenados como maçã e uva (Piano *et al.*, 1997;

Sipiczki, 2006; Saravanakumar *et al.*, 2008; Manso e Nunes, 2011). Manso e Nunes, (2011) verificaram que a espécie *Metschnikowia andauensis* controla de forma efetiva *Rhizopus stolonifer*, *P. expansum* e *B. cinerea* em diferentes cultivares de maçãs e também *Penicillium digitatum* e *Penicillium italicum* em laranjas. Recentemente, Türkel *et al.*, (2014) verificaram que *Metschnikowia pulcherrima* é um efetivo agente de controle biológico contra diversas espécies de fungos patógenos na pós-colheita, dentre eles *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Rhizopus*.

No entanto, através dos resultados dos ensaios de antibiose, a levedura *Metschnikowia* parece não proteger as operárias das colônias contra fungos entomopatogênicos, tal como *Metarhizium anisopliae*, o qual cresceu por cima da colônia da levedura. Além disso, verificou-se que uma cepa de *M. pulcherrima* apresenta ação antagonista à bactéria simbiote *Pseudonocardia* sp. que protege operárias de *A. subterraneus subterraneus* contra a infecção por *M. anisopliae* (Mattoso *et al.*, 2012). Portanto, o gênero *Metschnikowia* pode auxiliar na defesa das colônias contra patógenos dos jardins de *L. gongylophorus*, porém, esta levedura pode não ser capaz de auxiliar na proteção das operárias contra os entomopatógenos.

Outro papel que as leveduras podem desempenhar em colônias de formigas cortadeiras seria o de auxiliar na degradação de alguns polissacarídeos. Mendes *et al.*, (2012) investigaram a degradação de polissacarídeos provenientes de materiais vegetais por 82 leveduras isoladas a partir dos jardins de colônias de *Atta* e *Acromyrmex* e observaram atividades de celulases, pectinases, proteases e amilases. Além disso, essas leveduras apresentaram capacidade de assimilar ácido galacturônico, componente pouco assimilável pelo fungo simbiote que apresenta efeito tóxico às formigas em altas concentrações (Silva *et al.*, 2003). Schiøtt *et al.* (2008) verificaram que o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* é capaz de degradar xilana da parede celular das folhas e que a atividade de xilanase é maior na região inferior dos jardins. Contudo, como algumas espécies de leveduras encontradas nos jardins apresentam atividade de xilanase (Mendes *et al.*, 2012), e, em alguns casos, a comunidade de leveduras é maior na região inferior, talvez estas sejam responsáveis pela alta atividade de xilanase e não o fungo simbiote como acreditava-se. Outra possibilidade da reunião da população de leveduras em uma região específica no jardim seria uma maior

atividade de degradação de xilana em xilose promovida pelo fungo simbiote gerando o aumento das populações de leveduras que assimilam xilose, como o gênero *Metschnikowia*.

Os fungos filamentosos comuns aos três ninhos estudados neste trabalho foram *Penicillium* e *Fusarium*. Estes dois gêneros são comumente relatados em jardins de formigas cortadeiras (Moller, 1893; Weber, 1955; Kreisel, 1972; Bass e Cherrett, 1994; Pagnocca *et al.*, 2012). Ortiz *et al.*, (1999) observaram a ocorrência de *Fusarium* em fragmentos de jardins de *Atta cephalotes* na ausência de operárias. Recentemente, Carlos *et al.* (2011) verificaram a presença de *Penicillium* em jardins de *Atta sexdens rubropilosa* tratados com diversos inseticidas. Estudando contaminantes de jardins de colônias em laboratório tratados com inseticida sulfluramida, Rodrigues *et al.* (2005) observaram uma prevalência menor que 20% de *Fusarium solani* contaminando os jardins. Mas, os mesmos autores observaram a espécie *Fusarium oxysporum* contaminando 23% dos jardins de colônias de formigas cortadeiras de campo tratadas com iscas a base de sulfluramida. Apesar dos relatos destas espécies de fungos filamentosos contaminando jardins de formigas cortadeiras, alguns trabalhos sugerem que estes fungos não desempenham papel importante na simbiose entre formiga e o jardim de fungo de *L. gongylophorus*, tendo em vista que são fungos generalistas (Currie e Stuart 2001). Entretanto, considerando que estes fungos estão associados a diversos gêneros de formigas da tribo Attini e apresentam desenvolvimento rápido em jardins de colônias onde as operárias estão ausentes, Pagnocca *et al.* (2012) sugerem que estes fungos possam se comportar como patógenos dos jardins.

Na busca por possíveis patógenos importantes nos jardins, este trabalho observou somente a ocorrência do parasita *Escovopsis* sp. em uma das colônias de *A. coronatus*. Resultados semelhantes foram encontrados por Rodrigues *et al.* (2011), isolando-se microfungos a partir dos jardins de Attinis, dentre eles *Atta texana*, o fungo *Escovopsis* sp. não foi isolado a partir de nenhuma colônia. Os fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Purpureocillium lilacinum* também foram identificados em jardins de *A. coronatus*. Como as colônias coletadas no campo apresentavam aspectos sadios no momento da coleta das amostras, especula-se que, a presença de fungos parasitas e entomopatogênicos nos jardins pode ocorrer na forma latente, mesmo sendo constantemente

controlados pelas operárias através de comportamento de limpeza, “grooming” e “weeding” (Currie e Stuart (2001).

A presença em grande parte de ascomicetos não identificados presentes nos jardins das três colônias de *Acromyrmex* demonstra a importância do estudo do ambiente das colônias de formigas Attini para a identificação de novos microrganismos. O estudo das colônias de formigas Attini já revelou espécies novas de fungos e leveduras (Muchovej e Della Lucia, 1990; Melo *et al.* 2014; Montoya et al. 2016), portanto, é um ambiente promissor à descrição taxonômica de novas espécies.

## 5. CONCLUSÕES

As espécies de formigas cortadeiras de plantas dicotiledôneas (*A. subterraneus subterraneus* e *A. coronatus*) apresentaram populações de leveduras nos jardins proporcionalmente menores comparadas às populações de leveduras encontradas em jardins da espécie cortadeira de monocotiledôneas (*A. Balzani*), indicando que as populações de leveduras podem estar relacionadas ao substrato vegetal utilizado.

As populações de leveduras e de fungos filamentosos podem ser diferentes de acordo com a região do jardim.

A levedura do gênero *Metschnikowia* foi comum a todas as três colônias estudadas.

A levedura *M. pulcherrima* apresentou efeito de antibiose sobre o parasita *Escovopsis* e o oportunista *Penicillium*, sugerindo que estas leveduras podem auxiliar na proteção os jardins de fungo *L. gongylophorus*.

Os testes de antibiose também sugerem que estas leveduras podem não ser vantajosas na proteção das formigas contra entomopatógenos, tendo em vista que a cepa de *M. pulcherrima* não foi capaz de inibir o fungo entomopatogênico *M. anisopliae*, mas foi capaz de inibir a bactéria simbiote *Pseudonocardia*, que protege as operárias contra o entomopatógeno.

Os fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Purpureocillium lilacinum* e o parasita *Escovopsis* sp. podem ser encontrados naturalmente habitando os jardins de formigas.

Já, os gêneros de fungos oportunistas *Penicillium* e *Fusarium*, foram os únicos fungos filamentosos comuns a todas as três colônias estudadas, indicando que estes podem ser tolerados pelas operárias nos jardins.

**TRABALHO II****DINÂMICA DE INFECÇÃO DE *Escovopsis* EM JARDINS DE FORMIGAS  
CORTADEIRAS**

## RESUMO

A infestação dos jardins de formigas cortadeiras pelo fungo parasita *Escovopsis* é comumente relatada em trabalhos envolvendo formigas da tribo Attini. No entanto, em condições normais as formigas mantêm com sucesso essas infestações endêmicas em níveis que não prejudiquem a colônia usando uma variedade de mecanismos de defesa. Já em condições em que as operárias de formigas cortadeiras não cuidem dos jardins, o fungo *Escovopsis* se desenvolve matando a colônia em poucos dias. Apesar de existirem muitos trabalhos relacionados ao parasita *Escovopsis*, pouco se sabe a respeito de seu processo de infecção dos jardins. Neste trabalho, um novo primer “Esco\_1R”, específico ao parasita *Escovopsis* sp. foi desenvolvido para investigar a dinâmica de suas infecções, permitindo a detecção do parasita antes de sua manifestação visível nos jardins. Técnicas convencionais de isolamento foram utilizadas para comparação. O parasita *Escovopsis* sp. foi detectado primeiramente na região intermediária dos jardins em um período de 48 horas após intoxicação das colônias com iscas a base de sulfluramida. Em 72 horas o parasita cresceu em direção às regiões superior e inferior, colonizando todo o jardim. O primer Esco\_1R é uma ferramenta útil para detecção de infecções de *Escovopsis* sp. em colônias de formigas Attini e também apresenta potencial para o estudo taxonômico de *Escovopsis* sp. presentes em amostras de jardins de formigas.

## ABSTRACT

The infestation of the gardens of leaf-cutting ants by parasitic fungus *Escovopsis* is commonly reported in studies involving Attini. However, under normal conditions ants successfully maintain these endemic infestations at levels that do not harm the colony using a variety of defense mechanisms. In conditions in which the workers of leaf-cutting ants do not take care of the gardens, *Escovopsis* fungus develops killing the colony in a few days. Although there are many studies of *Escovopsis*, little is known about the infection process in the gardens. In this work, a new primer “Esco\_1R”, specific for the parasite *Escovopsis* sp. was developed to investigate the dynamics of infections, allowing the detection of the parasite before its visual manifestation in the gardens. Conventional isolation techniques were used for comparison. The parasite *Escovopsis* sp. was first detected in the middle region of the gardens 48 hours after treating the colonies with baits sulfluramide bait. At 72 hours the parasite grew towards the upper and lower regions, colonizing the entire garden. The Esco\_1R primer is a useful tool for detection of *Escovopsis* sp infections. in colonies of Attini ants and also has potential for the taxonomic study *Escovopsis* sp. present in ant gardens samples.

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero do fungo *Escovopsis* (Ascomycota: Hypocreales), relatado anteriormente em alguns trabalhos que descreveram apenas duas espécies *Escovopsis weberi* e *Escovopsis aspergilloides* (Muchovej e Della Lucia, 1990; Seifert *et al.*, 1995), está relacionado a diversas espécies de formigas da tribo Attini, sendo considerado um parasita do fungo simbiote cultivado pelas formigas deste grupo. Esta relação parasita-hospedeiro foi possivelmente originada a 50-60 milhões de anos atrás (Schultz e Brady, 2008). A descoberta da especificidade deste gênero aos jardins de formigas da tribo Attini despertou o interesse de muitos pesquisadores mundo afora (Currie, 2001; Reynolds e Currie, 2004; Schultz e Brady, 2008). Recentemente, novas espécies têm sido descritas como: *Escovopsis lentecrescens*, *Escovopsis microspora*, *Escovopsis moelleri*, *Escovopsis trichodermoides* e até mesmo de um novo gênero *Escovopsioides nivea* (Augustin *et al.*, 2014; Masiulionis *et al.* 2015).

Algumas linhagens filogenéticas de *Escovopsis* foram reportadas associando-se exclusivamente com linhagens específicas de fungo simbiote Leucocoprineae e Pterulaceae (Schultz e Brady, 2008) das Attini basais do grupo das *Apterostigma* (Gerardo *et al.*, 2006) e das espécies *Cyphomyrmex longiscapus*, *Cyphomyrmex muelleri* e *Cyphomyrmex costatus* (Gerardo *et al.*, 2004). Esta especificidade é interpretada como tendo as linhagens de *Escovopsis* uma história coevolutiva comum aos seus jardins hospedeiros, pontuada por trocas apenas ocasionais de hospedeiros (Currie *et al.*, 2003a). Contrariamente ao que foi demonstrado para as Attini basais, análises moleculares recentes revelaram pouca especificidade parasito-hospedeiro dentro do clado derivado das Attini dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* (Taerum *et al.*, 2007). Ou seja, a história evolutiva de *Escovopsis* e do fungo simbiote não acompanhou a história evolutiva das próprias formigas. Além disso, ficou demonstrado que oito linhagens filogeneticamente distantes de *Escovopsis*, divididas em dois clados, foram capazes de infectar todas as sete linhagens do fungo simbiote, indicando que elas não são especializadas em linhagens específicas do fungo simbiote das cortadeiras. Entretanto, a

metodologia de inocular pequenos pedaços de jardim com *Escovopsis* significa que é difícil avaliar diferenças sutis visualmente. Os resultados de Taerum *et al.* (2007) mostram que 67% das colônias de *Atta* e *Acromyrmex* estavam infectadas por múltiplas linhagens do parasita, concordando com os resultados de Gerardo *et al.* (2004), que mostraram a falta de congruência filogenética entre a Attini basal *Cyphomyrmex* e *Escovopsis*. Recentemente, Meirelles *et al.* (2015) testaram a correspondência filogenética, clado a clado, entre *Escovopsis* e Attinis superiores, incluindo formigas cortadeiras e não cortadeiras, distribuídas geograficamente do México ao sul do Brasil, não sendo encontradas evidências de especialização de *Escovopsis*. Portanto, os isolados deste parasito não seriam especializados em linhagens específicas de jardins de fungos e a especificidade de *Escovopsis* não seria mediante as possíveis defesas das cultivares dos fungos na ausência das formigas.

*Escovopsis* sp. pode afetar jardins de formigas cortadeiras de diversas formas, podendo ativar o comportamento de limpeza dos jardins na sua presença (“grooming e weeding”) e, em casos extremos, crescer rapidamente, tomando conta de todo o jardim de fungo simbiote, resultando no colapso das colônias (Currie, 2001; Currie e Stuart, 2001). Com a finalidade de verificar a patogenicidade e a virulência de *Escovopsis*, Currie *et al.* (1999) retiraram as formigas de pequenas porções do jardim simbiote, deixando-os livres de operárias, e inocularam aproximadamente 300–500.000 esporos do microfungo diretamente em porções de 60-75 mL do jardim de *Trachymyrmex*, *Acromyrmex* e *Atta*. Como era de se esperar, todas as porções de jardim de fungo sucumbiram. Já nas colônias onde *Escovopsis* foi endêmico (sem ter sido inoculado experimentalmente) e cujas operárias foram retiradas a fim de se observar o desenvolvimento do jardim de fungo, esperava-se encontrar vários tipos de patógenos, mas foi encontrado somente *Escovopsis*.

Com base nos resultados de Currie *et al.* (1999), tornou-se um dogma que o fungo parasito é altamente virulento às colônias de Attini. Os autores relataram que *Escovopsis* pode dominar os jardins mesmo na presença de formigas, em colônias observadas em campo e laboratório.

Foi verificado que *Escovopsis weberi* atua como parasito necrotrófico de contato, ou seja, primeiramente mata o fungo mutualístico para posteriormente digerir a biomassa morta, não sendo necessária a penetração das hifas para o

parasitismo ocorrer. Este mecanismo diverge do mecanismo biotrófico empregado por outros micoparasitos, os quais se alimentam do hospedeiro ainda vivo (Reynolds e Currie, 2004).

Muitos aspectos relativos à biologia de *Escovopsis* sp. ainda são pouco conhecidos. Pouco se sabe a respeito do seu ciclo de vida, tampouco sobre o seu estado teleomorfo, além da forma de transmissão entre as colônias de formigas Attini. Como a transmissão vertical (da colônia mãe para as colônias filhas) não foi observada, alguns autores sugerem a transmissão através de outros artrópodes que visitam ou habitam as colônias como ácaros (Currie *et al.*, 1999; Pagnocca *et al.*, 2011).

Outro fator pouco conhecido a respeito do fungo *Escovopsis* é a sua dinâmica de infecção dos jardins. Acredita-se que o processo de infecção do fungo *Escovopsis* esteja relacionado às regiões distintas (superior, intermediária e inferior), presentes nos jardins de formigas cortadeiras. A região superior é considerada nova, é nela onde são renovados, constantemente, os materiais vegetais “frescos” pelas operárias para crescimento do fungo simbiote. Já a região inferior é a mais antiga, onde são encontrados o fungo simbiote em processo de senescência, e onde as operárias removem constantemente o material para depósito nas câmaras de lixo. Com relação à região intermediária, esta é uma região de transição entre o fungo simbiote novo e velho. Como o fungo simbiote da região inferior, teoricamente, é mais propício à infecção por *Escovopsis*, acredita-se que seja nesta região onde se inicie este processo. Contudo, os poucos trabalhos que foram realizados no sentido do estudo do processo de infecção por *Escovopsis* nos jardins (Currie, 2001).

Com o desenvolvimento e a viabilidade de técnicas utilizando-se marcadores moleculares, tornou-se possível a detecção de microrganismos específicos em amostras de jardins de formigas cortadeiras. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de marcadores moleculares específicos ao gênero *Escovopsis* para o estudo de sua dinâmica de infecção nas diferentes regiões dos jardins da formiga *Atta sexdens rubropilosa*. Os resultados obtidos pela detecção de *Escovopsis* com marcadores moleculares foram comparados com metodologia de isolamento convencional.

O estudo da dinâmica de infecção do parasita *Escovopsis* poderá auxiliar futuramente na criação de técnicas que tornem possíveis o seu uso como agente de controle biológico de formigas cortadeiras.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Coleta e manutenção de colônias de formigas cortadeiras

Para realização deste trabalho, foi necessário a manutenção de colônias de *Atta sexdens rubropilosa* em laboratório. Para tanto, colônias inteiras foram coletadas no campo, incluindo o fungo simbiote com sua(s) respectiva(s) rainha(s), além das formigas jardineiras e operárias, que foram encontradas no subsolo em profundidades em torno de 60 cm a 1 m. A coleta foi realizada na localidade de Bom Jardim, RJ (22° 09' 07" S e 42° 25' 10" W).

As colônias foram levadas para a Unidade de Mirmecologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, localizada em Campos dos Goytacazes, RJ e acondicionadas em salas com ambiente controlado, com temperatura média de 25°C e umidade relativa de 70 ± 10 % conforme Della Lucia *et al.* (1993).

### 2.2. Montagem de minicolônias

As minicolônias foram obtidas de 3 colônias preexistentes de *Atta sexdens rubropilosa*, mantidas na Unidade de Mirmecologia. As minicolônias foram constituídas por uma bandeja de plástico que serviu como área de forrageamento das operárias e um copo plástico de 500 ml com tampa perfurada, onde foi introduzida uma porção de aproximadamente 400ml do jardim do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*, juntamente com as formigas (Figura 6). Após montagem, as minicolônias passaram por um processo de aclimação de 10 dias, onde foram oferecidas folhas de *Acalypha wilkesiana* e água, diariamente, para manutenção e desenvolvimento do fungo simbiote neste ambiente artificial.

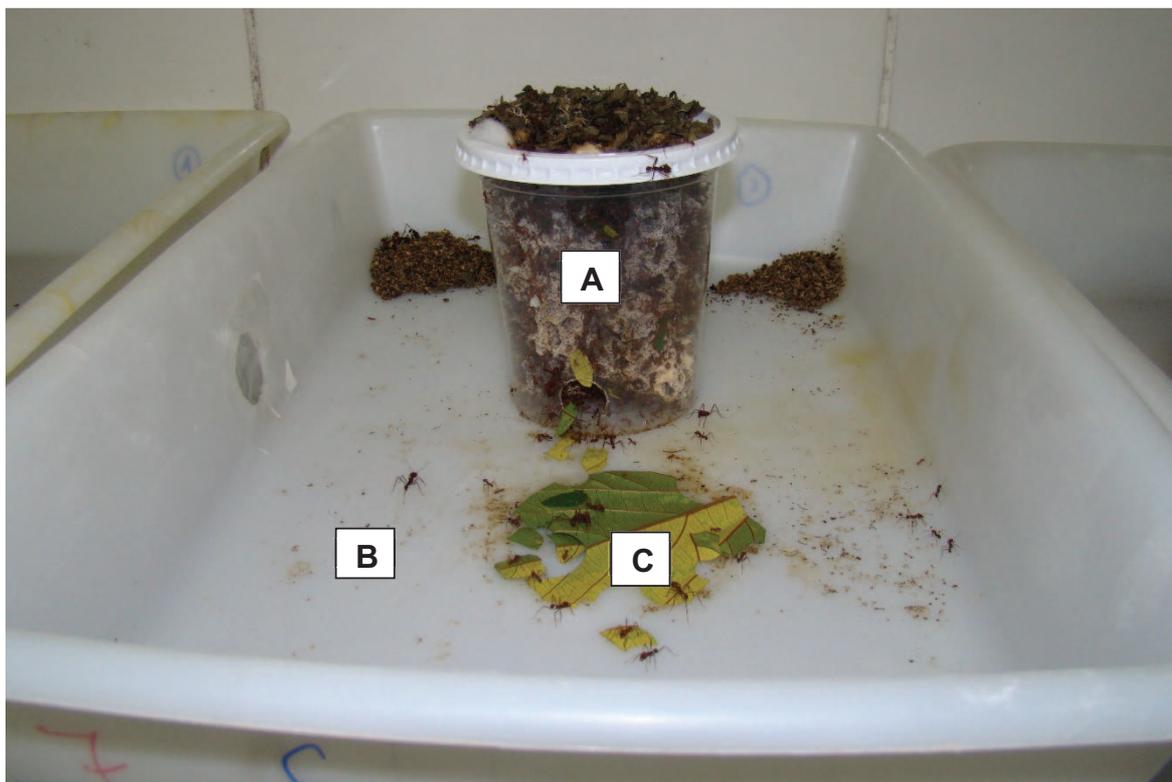


Figura 6. Minicolônia de formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa*: A) câmara de jardim de fungo, B) área de forrageamento, C) folhas de *Acalypha wilkesiana*

### 2.3. Estresse de mini formigueiros, coleta de material dos jardins e avaliação da presença do parasita *Escovopsis*

As minicolônias já estabelecidas e aclimatadas foram separadas aleatoriamente em dois grupos: Tratamento e Controle. O grupo Tratamento recebeu cerca de 5g de isca granulada a base de sulfluramida (Mirex-S®) na intenção de intoxicar as operárias e promover o estresse das colônias, facilitando o crescimento e o desenvolvimento de patógenos tais como *Escovopsis* sp. nos jardins. Para o grupo Controle foram oferecidas folhas de *Acalypha wilkesiana* para a manutenção das colônias saudáveis. As minicolônias ficaram em jejum por um período de 24h antes da oferta das iscas. Após isso, as minicolônias permaneceram em jejum por mais 72h, sem serem alimentadas com folhas.

Para o isolamento de *Escovopsis* em cultura pura, foram utilizadas sete minicolônias tratadas, enquanto que para o grupo Controle (não tratadas) foram

usadas três minicolônias. Após oferta das iscas, foram coletadas amostras dos jardins a 24, 48 e 72h. As amostras de cada período (24, 48 e 72h) foram obtidas a partir de três regiões distintas dos jardins (superior, intermediário e inferior) (Figura 7). Em cada período de coleta as amostras foram pesadas, separando-se alíquotas de cerca de 0,1g. Efetuou-se a remoção de operárias com auxílio de pinças estéreis em condições assépticas em câmara de fluxo. As amostras dos jardins foram transferidas para tubos de Falcon estéreis de 50 mL, contendo 5 mL de Tween 80 (0,05%) estéril. Os tubos foram então agitados em vórtex por cerca de 30s e 200µL da suspensão foi transferida para placas de Petri contendo meio Sabouraud Dextrose Ágar (SDA), com Cloranfenicol (100 mg. L<sup>-1</sup>). As suspensões de jardim das regiões superior, intermediário e inferior foram espalhadas com uma alça de Drigalski, realizando-se três repetições cada. As placas foram acondicionadas em câmara de germinação com temperatura de 26 °C ± 2 °C e avaliadas durante 15 dias, quanto à presença de *Escovopsis* sp.. As estirpes de *Escovopsis* sp. crescidos em cultura pura foram reisoladas em meio SDA.

Para os ensaios de detecção molecular de *Escovopsis* em amostras de jardins, foram utilizadas duas minicolônias do grupo Tratamento e uma colônia do grupo Controle. As amostras coletadas a partir das diferentes regiões dos jardins, durante os períodos de 24, 36, 48 e 72h foram transferidas para tubos eppendorfs estéreis de 1,5 ml, onde foram imediatamente liofilizadas por 24h. Após vedadas e lacradas em recipiente com sílica gel. As amostras foram enviadas para a Universidade de Bath, na Inglaterra, onde os procedimentos moleculares foram realizados.

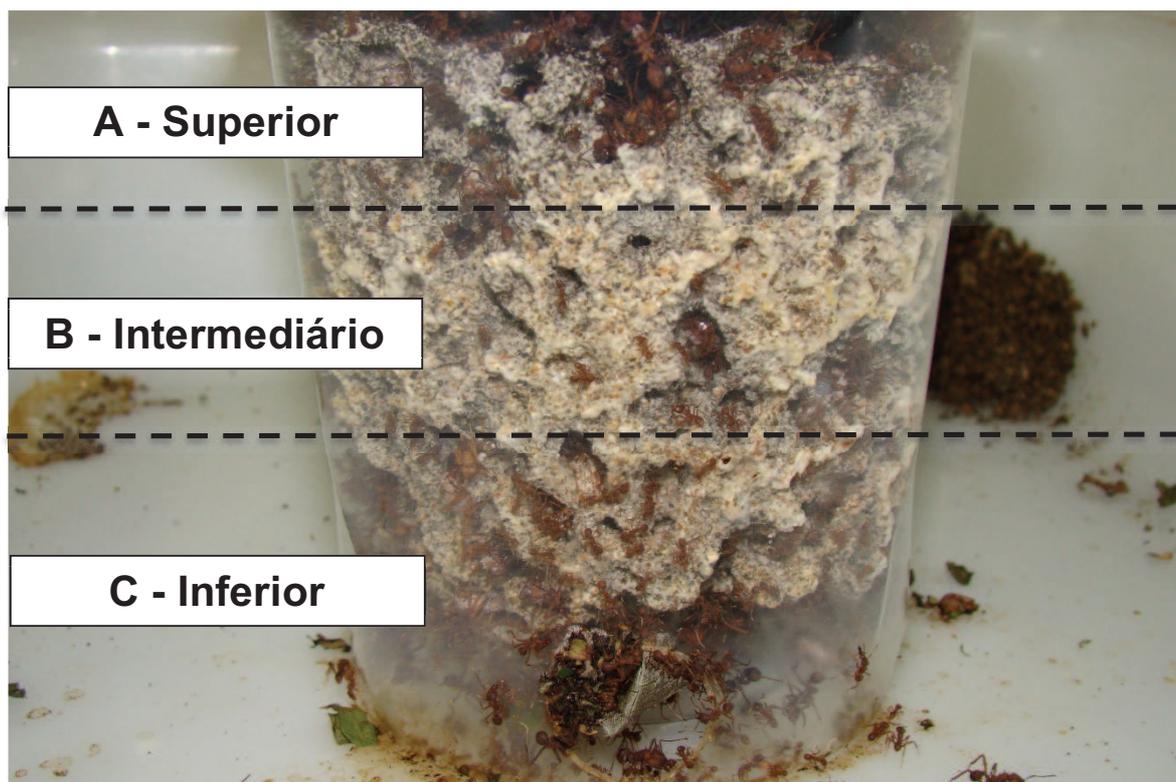


Figura 7. Divisão das três regiões dos jardins: superior (A), intermediária (B) e inferior (C).

#### 2.4. Desenho de primer ITS para detecção específica do gênero *Escovopsis* sp.

O desenho de um primer específico para amplificar o DNA da região ITS do gênero *Escovopsis* foi realizado através de sequências de DNA obtidas de isolados de *Escovopsis* de três gêneros de formigas Attini: *Trachymyrmex*, *Atta* e *Acromyrmex*. As sequências foram obtidas do Genbank e de amostras sequenciadas na Universidade de Bath e alinhadas através do software Mesquite v1.12, utilizando-se a ferramenta Opal. Sequências aleatórias entre 15 e 20 bases foram buscadas através do software BLASTn até obtenção de uma sequência com maior identidade possível para *Escovopsis* sp. e pouca identidade com outros fungos. O primer Esco1R foi desenvolvido para ser utilizado junto ao primer ITS1F (senso) para a amplificação da região ITS. Portanto, se trata de um primer antissenso.

## 2.5. Isolamento de *Escovopsis* sp. a partir de amostras de jardins de outras espécies de formigas

Com o objetivo de validar o método de detecção de *Escovopsis* sp. via marcador molecular, realizou-se seu isolamento a partir das seguintes espécies de formigas cortadeiras: *A. sexdens rubropilosa*, *Atta robusta*, *Acromyrmex balzani* e *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. Tal isolamento foi realizado a partir de amostras de jardins de colônias intoxicadas com 5 g de isca a base de sulfluramida. Amostras de aproximadamente 0,1 g dos jardins foram transferidas para tubos de Falcon estéreis de 50 mL contendo 5 mL de Tween 80 (0,05%) estéril. Os tubos foram então agitados em vórtex por cerca de 30s de onde 200µL da suspensão foram transferidas com auxílio de uma pipeta para três placas (três repetições de cada região) contendo meio SDA com cloranfenicol (100 mg. L<sup>-1</sup>) e a amostra foi espalhada com uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 26 °C ± 2 °C por um período de 15 dias e as colônias crescidas de *Escovopsis* sp. foram repicadas para novas placas, com meio SDA.

## 2.6. Extração de DNA das culturas axênicas e de amostras de jardins

O DNA de culturas axênicas e de amostras de jardins foi extraído a partir de 0,1 g de massa de hifas de *Escovopsis* ou de amostras de jardins. Para as amostras de jardim utilizou-se o kit de extração ZR Soil Microbe DNA MiniPrep™ e para as culturas axênicas de *Escovopsis* sp. o kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo Research®).

Para o controle da especificidade dos primers desenvolvidos para detecção de *Escovopsis*, foram feitas a extração do DNA de massa de hifas de culturas axênicas de *Leucogaricus* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus nidulans*, *Fusarium oxysporum*, *Pencillium expansum* e *Botrytis allii*, através do kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo Research®). As culturas axênicas de *Alternaria* sp., *Aspergillus nidulans*, *Fusarium oxysporum*, *Pencillium expansum* e *Botrytis allii* fazem parte da coleção micológica do laboratório de microbiologia do Department of Biology & Biochemistry da University of Bath. Já a cultura de *Leucoagaricus* sp.,

*Escovopsis* sp. (*Trachymyrmex* sp.) e *Escovopsis* sp. (*Sericomyrmex* sp.) pertence à coleção micológica do Laboratório de Entomologia e Fitopatologia da UENF.

Para verificar a detecção de conídios de *Escovopsis* em amostras de jardins, diferentes suspensões de esporos de *Escovopsis* sp. ( $1 \times 10^1$ ,  $1 \times 10^3$  e  $1 \times 10^5$  conídios mL<sup>-1</sup>) foram misturadas com 0,05 g de amostras de jardins sadios de *A. sexdens rubropilosa*. O DNA das amostras misturadas a conídios de *Escovopsis* sp. foi extraído através do kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo Research®).

## 2.7. Condições para PCR e eletroforese em gel

O primer específico para o gênero *Escovopsis* (Esco1R) foi utilizado juntamente com o primer ITS1F para amplificar a região Internal Transcribed Space (ITS), frequentemente utilizada para estudos de sistemática e filogenia de fungos. As condições para PCR (Touchdown) foram de 95°C por 15 min, para desnaturação inicial; 25 ciclos de 95°C por 30s para desnaturação; 55°C por um minuto para emparelhamento (-1°C a cada ciclo); 72°C por 2 min para alongamento. Os reagentes utilizados foram REDTaq® ReadyMix™ (Sigma-Aldrich®) 22,5µl, 1µl de cada primer e 1µl do DNA extraído das amostras de jardim ou de cultura pura de fungo. Os produtos do PCR foram analisados em gel de agarose 5% para confirmar a presença de *Escovopsis* sp., pela presença de banda equivalente a 500 pb de tamanho. Os amplicons e suas diluições foram quantificados em NanoDrop (Thermo Science®).

## 2.8. Análise filogenética das sequências de *Escovopsis* sp.

As sequências de *Escovopsis* sp. foram processadas e comparadas com o banco de dados do Genbank - NCBI pelo aplicativo Blastn® (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). As sequências com até 90% de homologia foram usadas como parâmetro de identificação a nível de gênero e utilizadas para a construção da árvore filogenética.

O alinhamento das sequências foi feito com o programa MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). Para a edição das sequências utilizou-se o software Mesquite versão 3.03. A construção da árvore filogenética foi feita no

programa MEGA versão 7, utilizando o algoritmo neighbor-joining, Kimura 2-parâmetros como modelo de substituição nucleotídica e 1000 pseudorréplicas de *bootstrap*.

## 2.9. Análises estatísticas

Testes de  $\chi^2$ , considerando 5% de nível de significância, foram realizados para comparação de dados dos bioensaios de detecção de *Escovopsis* sp. nas regiões superior, intermediária e inferior dos jardins de *A. sexdens rubropilosa*. Os testes e a plotagem de gráficos foram realizados no programa R v3.2.4.

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Identificação molecular de *Escovopsis* em amostras de jardins

O primer Esco\_1R (Antisenso) constitui da seguinte sequência nucleotídica: TTTCACGGCGGGGCCGAT. Sequência homóloga a Esco\_1R foi encontrada em *Bosea* sp. (um gênero de planta), com 94% de cobertura de consulta (Query cover). Quando utilizado DNA de cultura axênica de *Escovopsis* sp. os primers amplificaram fragmentos de 560-650 pb. Diluições em série de DNA de *Escovopsis* mostraram que o primer pode detectar um mínimo de 0,003 ng/ $\mu$ L de DNA (Figura 8). O DNA de culturas axênicas de *Leucogaricus* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus nidulans*, *Fusarium oxysporum*, *Pencillium expansum* e *Botytis allii*, foi utilizado como controle para verificar a especificidade dos primers para *Escovopsis* (Figura 9). O par de primers não foi capaz de amplificar DNA destas espécies de fungos, demonstrando ser específico para *Escovopsis* sp..

Os testes do conjunto de primers Esco\_1R e ITS1F em amostras misturadas com suspensões de conídios de *Escovopsis* sp. ( $10^1$ ,  $10^3$  e  $10^5$  conídios. mL<sup>-1</sup>), demonstraram ser capazes de detectar *Escovopsis* mesmo em uma amostra não axênica (Figura 10). Foi possível a amplificação por Esco\_1R para *Escovopsis* sp. mesmo em suspensões contendo  $10^5$  conídios mL<sup>-1</sup> (Figura 11).

### 3.2. Padrão da infecção de miniformigueiro por *Escovopsis* sp. após estresse por sulfluramida

De acordo com os resultados de eletroforese em gel provenientes das ampliações em PCR das amostras de jardins utilizando-se o primer Esco1R e ITS1F, a presença do fungo *Escovopsis* sp. não foi observada em nenhuma região do jardim até 24h após o estresse das minicolônias. Após 48h do estresse, pôde-se detectar *Escovopsis* sp. na região intermediária do jardim e após 72h do estresse, foi possível detectar *Escovopsis* sp. em todas as regiões dos jardins (Figura 9).

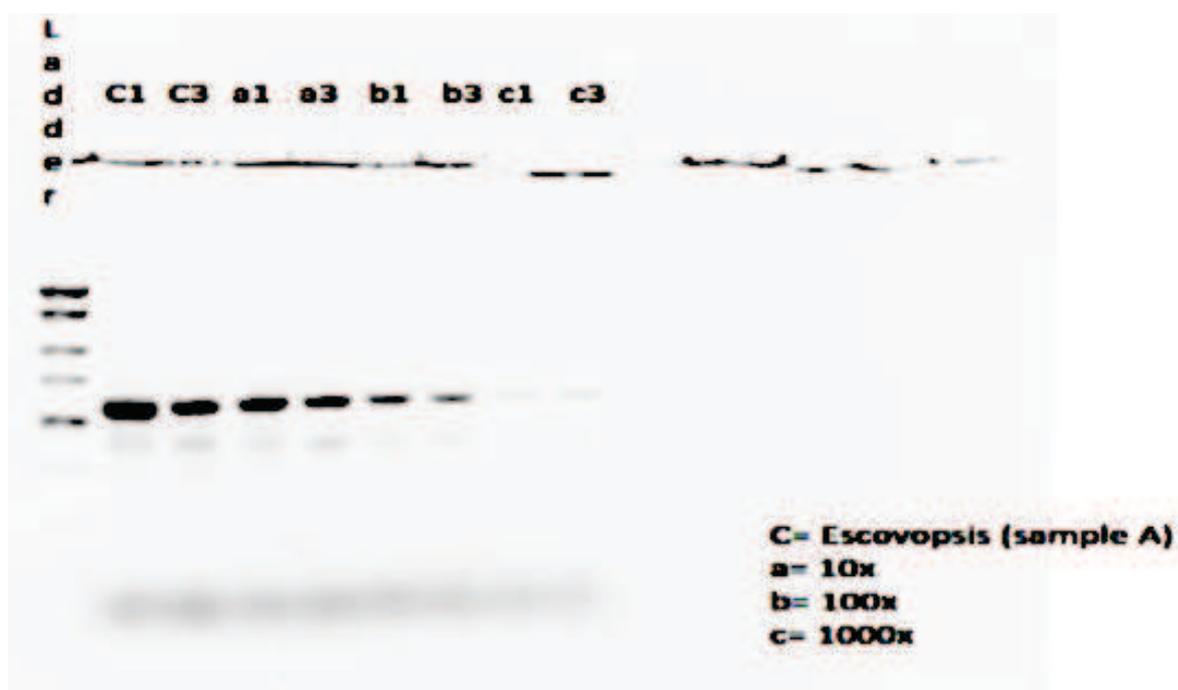


Figura 8: Avaliação de sensibilidade do primer Esco1R e ITS1F para detecção de *Escovopsis* sp. a partir de amostras de DNA diluído. Concentração original de 3 ng/ $\mu$ l (C maiúsculo) e respectivas diluições: (a) 10x, (b) 100x e (c) 1000x.

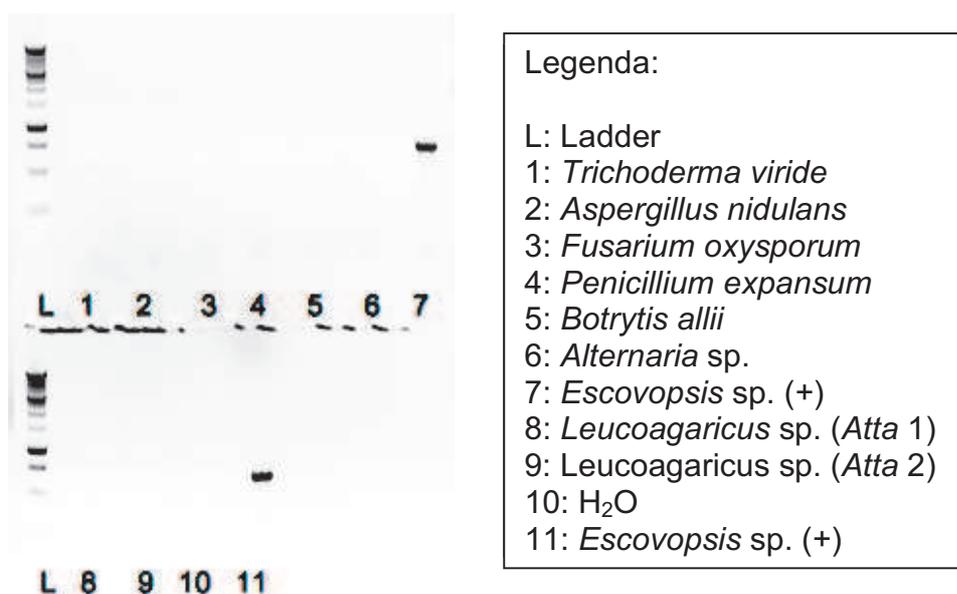


Figura 9: Avaliação de sensibilidade do primer Escov1R e ITS1F para especificidade de detecção de *Escovopsis* sp. a partir dos DNAs de diferentes espécies de ascomicetos.

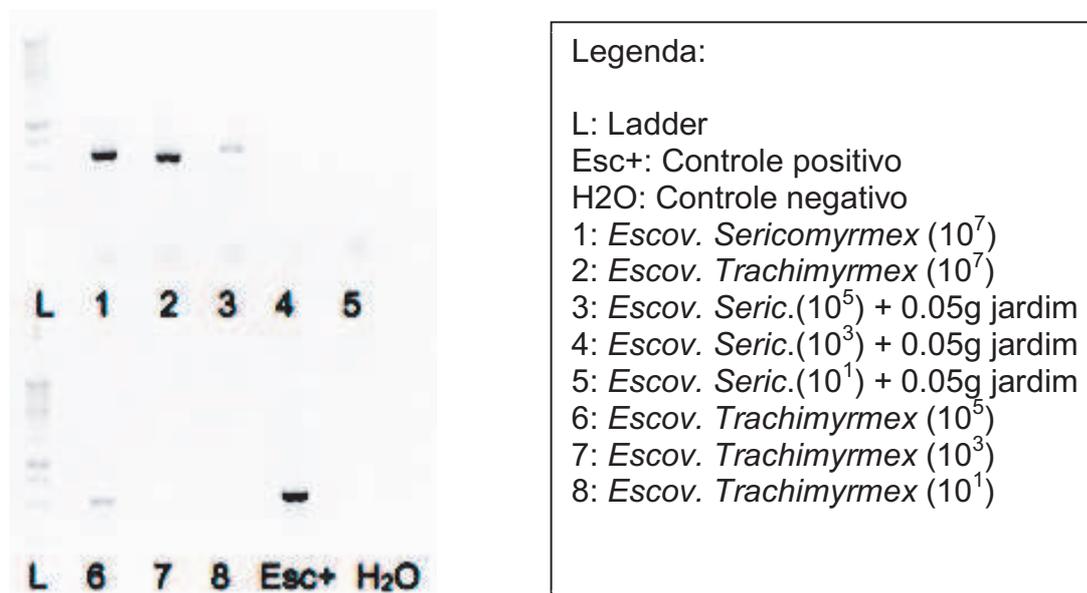


Figura 10: Avaliação de sensibilidade do primer Escov1R e ITS1F para detecção de *Escovopsis* sp. a partir dos DNAs de diferentes suspensões ( $10^7$ ,  $10^5$ ,  $10^3$  e  $10^1$ ) provenientes de culturas axênicas de duas colônias de formigas da tribo Attini (*Trachimymex* e *Sericomyrmex*) ou misturados a 0,05g de amostras de jardins.

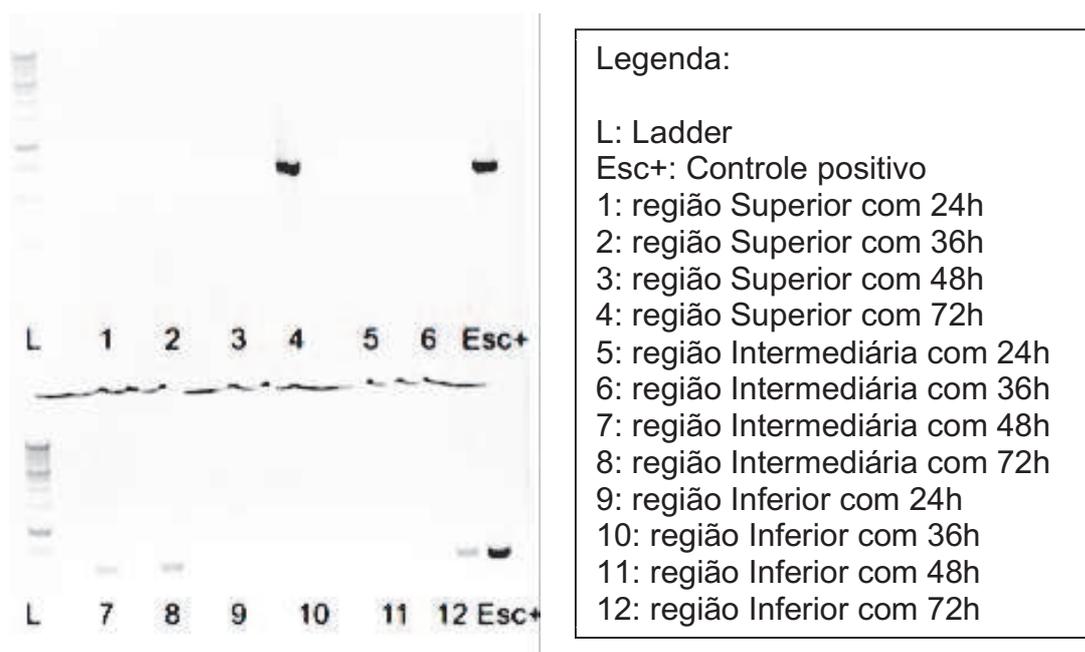


Figura 11: Avaliação de sensibilidade do primer Escov1R e ITS1F para detecção de *Escovopsis* sp. em DNA de amostras de jardim de diferentes regiões dos jardins e diferentes períodos após oferta de iscas com sulfluramida. Controle positivo (DNA extraído de cultura axênica de *Escovopsis* sp.).

### 3.3. Detecção de *Escovopsis* sp. a partir de amostras de jardins de colônias estressadas com iscas granuladas

A metodologia de isolamento de *Escovopsis* sp. por meio de amostras de jardins demonstrou que o parasita é difícil de ser isolado a partir de colônias sadias, tendo em vista a ausência de *Escovopsis* sp. em todas as placas de isolamento dos miniformigueiros Controle. Contudo, nas colônias do Tratamento com sulfluramida, o fungo *Escovopsis* sp. começa o processo de infecção, observando-se a tomada completa dos jardins em um período de 72 horas. Nas primeiras 24 horas após o estresse, o parasita somente foi isolado a partir de uma amostra da região superior (1 ocorrência). No período de 48 horas o *Escovopsis* sp. começou a tomar conta de todas as regiões dos jardins, com maior incidência nas regiões superior (5 ocorrências) e intermediária (5 ocorrências) (Figura 13). Em 72 horas os jardins foram completamente tomados visualmente pelo fungo parasita (Figura 12), mas as regiões intermediária e inferior apresentaram as maiores ocorrências (10 e 9

ocorrências, respectivamente) (Figura 13). Ao somar os valores de ocorrência entre os períodos de 24, 48 e 72 horas, verificou-se uma tendência de maior facilidade de isolamento de *Escovopsis* sp. da região intermediária (Figura 14). Contudo, análise de  $X^2$  da presença de *Escovopsis* sp. isolado das regiões superior, intermediária e inferior de amostras de jardim não mostrou diferenças significativas ( $p=0,1369$ ).



Figura 12. Minicolônia de *A. sexdens rubropilosa* sendo coberta pelo fungo parasita *Escovopsis* sp. em um período de 72 horas após oferta de iscas formicidas à base de sulfluramida às operárias.

#### 3.4. Filogenia de *Escovopsis* sp. provenientes de diferentes colônias

A filogenia das sequências ITS dos isolados de *Escovopsis* sp. obtidos dos jardins das espécies de formiga *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta robusta*, *Acromyrmex balzani* e *Acrmoymex subterraneus subterraneus*, comparada com espécies de *Escovopsis* sp. depositadas no banco internacional de dados do Genbank é apresentada na Figura 15. A análise filogenética das sequências que o conjunto de primer ITS1F e Esco\_1R amplificou, mostrou a distribuição de estirpes de *Escovopsis* sp. de diferentes colônias de formigas cortadeiras em um mesmo clado.

As sequências da região ITS de *Escovopsis* sp. utilizadas neste trabalho estão disponíveis no banco de dados do Genbank através dos códigos LE211130 a LE211151.

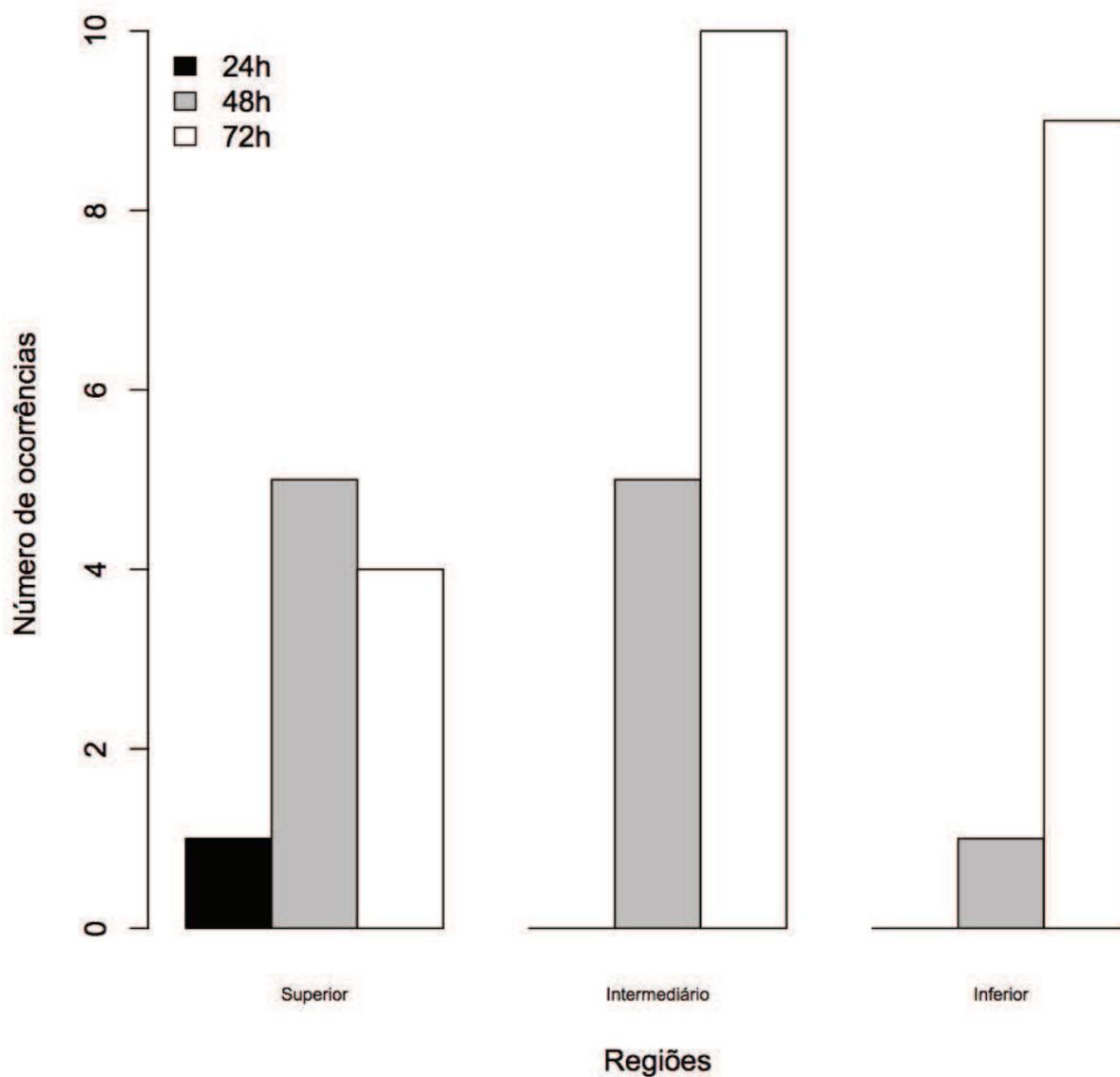


Figura 13. Ocorrência de *Escovopsis* sp. isolados de amostras de jardins das regiões superior, intermediário e inferior em períodos de 24, 48 e 72 horas após a oferta de isca com sulfluramida. Os controles tiveram resultados negativos para ocorrência de *Escovopsis* sp., portanto, não foram anexados ao gráfico.

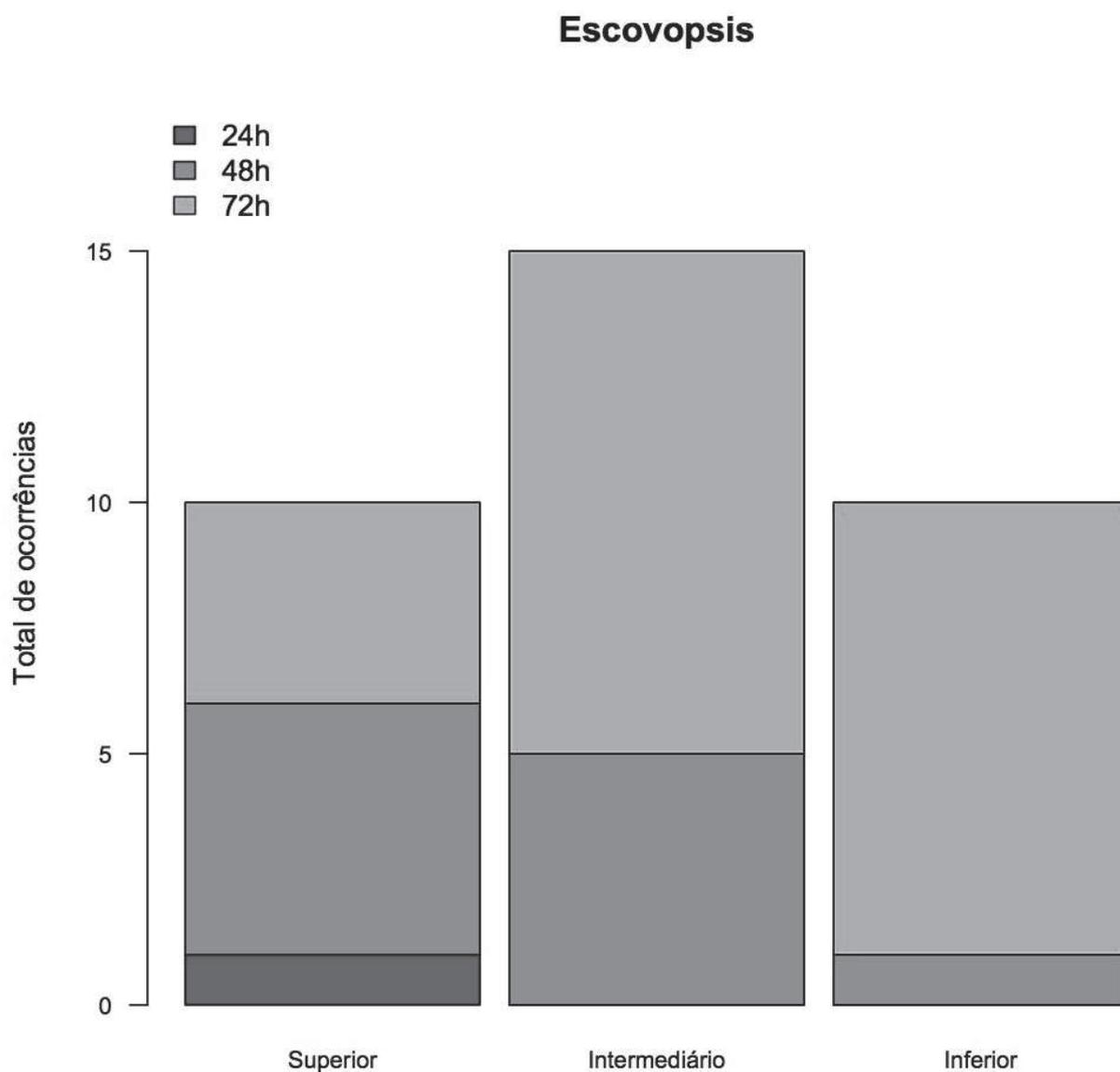


Figura 14. Gráfico cumulativo de ocorrência de *Escovopsis* sp. isolados de amostras de jardins das regiões superior, intermediária e inferior em períodos de 24, 48 e 72 horas após a oferta de isca com sulfluramida. Os controles tiveram resultados negativos para ocorrência de *Escovopsis* sp., portanto, não foram anexados ao gráfico.

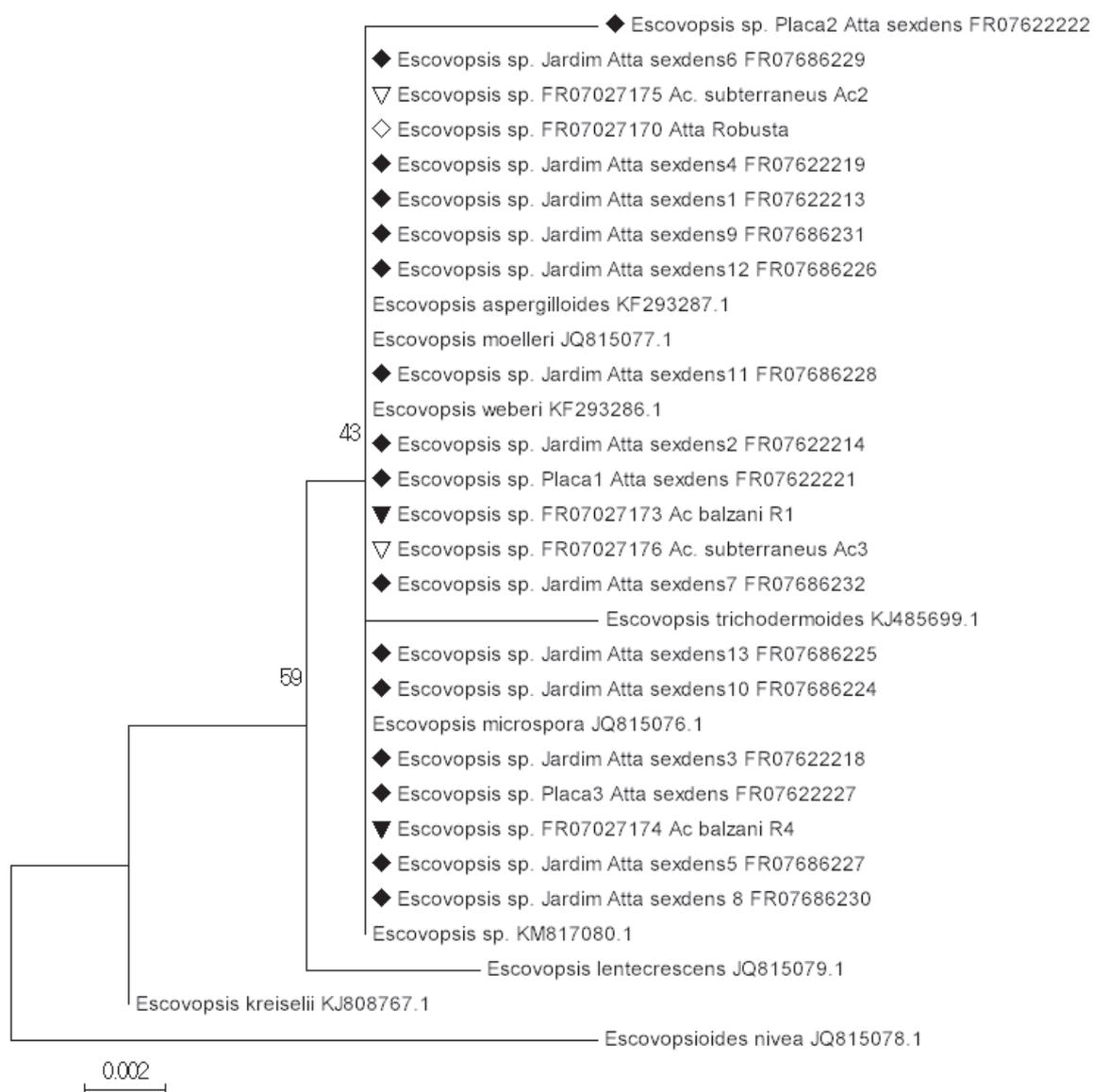


Figura 15. Árvore filogenética inferida a partir de sequências da região ITS do gênero *Escovopsis* sp. e relacionados. A árvore foi reconstruída utilizando o algoritmo de *neighbor-joining* com modelo de substituição nucleotídica de Kimura 2-parâmetros. Números nos ramos representam valores de suporte de *bootstrap* (n= 1000 pseudoréplicas). O nome do fungo é seguido pelo código de acesso da cultura e do número de acesso da sequência do GenBank. Taxons com marcadores correspondem aos isolados de fungos obtidos no presente estudo.

#### 4. DISCUSSÃO

A técnica de detecção através do primer ITS1F e Esco\_1R foi específica, sensível e possibilitou o estudo de *Escovopsis* sp. em amostras de jardins de formigas cortadeiras. Esta técnica é inédita para o gênero *Escovopsis* sp. e poderá servir em estudos futuros de infecções dos jardins de outras espécies de formigas da tribo Attini e para amplificação da região ITS (genes rRNA 18S, 5.8S e 28S) de *Escovopsis* sp. em amostras contaminadas por outros fungos. Augustin *et al.* (2013) demonstraram o potencial da região ITS como marcador filogenético do fungo *Escovopsis*. De maneira geral a região ITS é importante para identificação de fungos, atuando como uma região de “barcode” para fungos, portanto, marcadores moleculares específicos podem ser importantes para confirmação taxonômica de espécies de *Escovopsis* (Schoch *et al.* 2012).

A técnica de detecção de *Escovopsis* sp. através de isolamento a partir de amostras de jardins de colônias intoxicadas com sulfluramida, demonstrou que as populações de *Escovopsis* sp. são mantidas em controle constantemente pelas operárias das colônias. Em termos práticos é como se a isca ao intoxicar as operárias, desabilitasse as defesas do jardim e, por outro lado, *Escovopsis* apresenta efeito sinérgico à isca, por contaminar o jardim, impedindo a nutrição de operárias, larvas e rainha, levando a colônia a morte. Isto remete o que foi observado por Currie e Stuart (2001) onde operárias intensificam os comportamentos de remoção do patógeno de acordo com o aumento de sua população nos jardins, sendo difícil de se isolar *Escovopsis* sp. a partir de colônias sadias.

Através dos marcadores moleculares, pôde-se observar o aumento da infecção das colônias por *Escovopsis* em um período de 48 horas. A técnica possibilitou observar que o início das infecções ocorre a partir da região intermediária dos jardins, o que foi, de certa forma, compatível com as técnicas padrão utilizando-se meio de cultura, sendo que a ocorrência de *Escovopsis* sp. foi maior nesta região, até 72 horas após intoxicação das colônias. Ou seja, a infecção inicia-se na região intermediária, evoluindo para a região superior e inferior por igual ao longo do tempo. Este resultado concorda em parte com os resultados de Currie

(2001), que verificou o início da infecção na região intermediária e inferior dos jardins. Este autor sugeriu que as infecções são mais persistentes nas regiões mais velhas dos jardins (intermediária e inferior), podendo se espalhar para a região nova (superior), com adição de novos materiais foliares. Apesar do resultado semelhante com o de Currie (2001), questiona-se o fato de não ser observado o início da infecção na região inferior, como ocorreu no trabalho deste autor, colocando em questão a sua sugestão de que regiões mais velhas do jardim são mais susceptíveis a infecções por *Escovopsis*. Assim, sugere-se aqui que a dinâmica de infecção de *Escovopsis* ocorra em função do balanço de nutrientes do fungo simbiote. Schiott *et al.* (2008) ao estudar a atividade de xilanase do fungo simbiote nas regiões superior, intermediária e inferior dos jardins, descreveram a região intermediária como a que apresenta a maior concentração de gongilídias (estruturas ricas em nutrientes) se comparado às regiões superior e inferior. Portanto, a região intermediária apresenta maior valor nutricional se comparado às outras regiões do jardim, possibilitando o rápido crescimento do parasita *Escovopsis* sp. e a súbita infecção do jardim. Isto pode explicar a velocidade com a qual o parasita *Escovopsis* se desenvolve em questões de horas colonizando todo o jardim.

Ao estudar a dinâmica de infecção de *Escovopsis* sp. em diferentes regiões dos jardins de colônias de *Atta colombica*, Currie, (2001) aspergiu uma suspensão entre  $4 \times 10^4$  a  $6 \times 10^4$  conídios  $\text{ml}^{-1}$  de *Escovopsis* sp. sobre jardins para induzir as infecções. Neste trabalho as infecções por *Escovopsis* sp. ocorreram naturalmente, sem a inoculação artificial do parasita, sendo induzidas pelo “estresse” das colônias com iscas a base de sulfluramida que afetam as operárias das colônias. Além disso, Currie, (2001) verificou a presença do patógeno em diferentes regiões dos jardins depois de um período de 7 semanas após a inoculação da suspensão de *Escovopsis* sp.. Neste estudo, a intoxicação das colônias com sulfluramida, o parasita natural das colônias tomou os jardins em um período de 72 horas. Comparando-se com o trabalho de Currie (2001), sugere-se que os parasitas naturais podem apresentar uma dinâmica de infecção totalmente diferente de parasitas introduzidos.

## 5. CONCLUSÕES

O desenvolvimento de técnicas moleculares para detecção de infecções dos jardins de formigas cortadeiras pelo patógeno *Escovopsis* sp. foi eficiente no estudo da dinâmica de infecção.

O primer *Esco\_1R* desenvolvido neste trabalho é específico ao gênero *Escovopsis*, e é preciso na detecção deste fungo em amostras de jardins, podendo ser útil em estudos futuros.

Técnicas padrão por cultivo em meio de cultura apresentaram resultados semelhantes ao observado pelas técnicas moleculares, contudo, seus dados foram insuficientes para a confirmações das diferenças encontradas entre as infecções de diferentes regiões dos jardins.

As infecções dos jardins de fungo simbiote pelo parasita *Escovopsis* sp. ocorreram a partir da região Intermediária, espalhando-se para as regiões superiores e inferiores ao longo do tempo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, S.B. (1998) Fungos Entomopatogênicos. *In*: Alves S.B., Controle microbiano de insetos. 2. ed. Piracicaba, Fealq, p: 289-381.
- Andrade, A.P.P. (2002) Biologia e taxonomia comparada das subespécies de *Acromyrmex subterraneus* Forel, 1893 (Hymenoptera, Formicidae) e contaminação das operárias por iscas tóxicas. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Botucatu – SP, Universidade Estadual Paulista, 168p.
- Augustin, J.O., Groenewald, J.Z., Nascimento, R.J., Mizubuti, E.S.G., Barreto, R.W., Elliot, S.L., Evans, H.C. (2013) Yet More “Weeds” in the Garden: Fungal Novelties from Nests of Leaf-Cutting Ants. *PLoS One*, San Francisco, 8: e82265.
- Aylward, F.O., Burnum-Johnson, K.E., Tringe, S.G., Teiling, C., Tremmel, D.M., Moeller, J.A., Scott, J.J., Barry, K.W., Piehowski, P.D., Nicora, C.D., Malfatti, S.A., Monroe, M.E., Purvine, S.O., Goodwin, L.A., Smith, R.D., Weinstock, G.M., Gerardo, N.M., Suen, G., Lipton, M.S., Currie, C.R. (2013) *Leucoagaricus gongylophorus* produces diverse enzymes for the degradation of recalcitrant plant polymers in leaf-cutter ant fungus gardens. *Applied and Environmental Microbiology* 79: 3770–3778.
- Bacci, M., Ribeiro, S.B., Casarotto, M.E.F., Pagnocca, F.C. (1995) Biopolymer-degrading bacteria from nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 28: 79-82.
- Ballari, S., Farji-Brener, A., Tadey, M. (2007) Waste management in the leaf-cutting ant *Acromyrmex lobicornis*: division of labour, aggressive behaviour, and location of external refuse dumps. *J. Ins. Behav*, 20: 87-98.

- Bass, M., Cherrett, J. M. (1994) The role of leaf-cutting ant workers (Hymenoptera: Formicidae) in fungus garden maintenance. *Ecological Entomology*, 19 (3): 215-220.
- Bidochka, M.J., Kasperski, J.E., Wild, G.A.M. (1998) Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near northern habitats. *Can. J. Bot.*, 76: 1198-1204.
- Bot, A.N.M., Currie, C.R., Hart, A.G., Boomsma, J.J. (2001) Waste management in leaf-cutting ants. *Ethol. Ecol. Evol.* 13: 225-237.
- Brandão, C.R.F., Mayhe-Nunes, A.J., Sanhudo, C.E.D. (2011) Taxonomia e filogenia de formigas-cortadeiras. *In: Della-Lucia, T.M.C. Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo.* 1 ed. Viçosa: UFV, p. 27-48.
- Carlos, A.A., Rodrigues, A., Forti, L.C., Passador, M.M., Sierra, J.F. (2011) Filamentous fungi found in *Atta sexdens rubropilosa* colonies after treatment with different toxic bait formulations. *Journal of Applied Entomology*, 135 (4): 326-331.
- Carreiro, S.C., Pagnocca, F.C., Bueno, O.C., Júnior, M.B., Hebling, M.J.A., da Silva, O.A. (1997). Yeasts associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908. *Antonie van Leeuwenhoek*, 71(3): 243-248.
- Carreiro, S.C., Pagnocca, F.C., Bacci, M., Bueno, O.C., Hebling, M.J.A., Middelhoven, W.J. (2002). Occurrence of killer yeasts in leaf-cutting ant nests. *Folia microbiologica*, 47(3): 259-262.
- Carreiro, S.C., Pagnocca, F.C., Bacci Jr, M., Lachance, M.A., Bueno, O.C., Hebling, M.J.A., Rosa, C.A. (2004). *Sympodiomyces attinorum* sp. nov., a yeast species associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(5): 1891-1894.
- Chapela, I.H.; Rehner, S.A.; Schultz, T.R.; Mueller, U.G. (1994) Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. *Science*, 266 (5191): 1691-1694.
- Charnley, A.K. (1997) Entomopathogenic fungi and their role in pest control. *In: Wicklow D.T., Soderstrom M., (eds) The mycota IV - environmental and microbial relationships.* Berlin Heidelberg: Springer-Verlag., p. 185-201.
- Cherrett, J.M., Peregrine, D.J. (1976) A review of the status of leaf-cutting ants and their control. *Ann. App. Biol.*, 84: 12-48.
- Costa, A.N., Vasconcelos, H.L., Veira-neto, E.H.M., Bruna, E.M. (2008) Do herbivores exert top-down effects in neotropical savannas? Estimates of biomass consumption by leaf-cutter ants. *Journal of Vegetation Science*, 19: 849-854.
- Craven, S.E.; Dix, M.W.; Michaels, G.E. (1970) Attine fungus gardens contain yeasts. *Science (New York, N.Y.)*, 169 (3941): 184-6.

- Currie, C.R.; Scott, J.A.; Summerbell, R.C.; Malloch, D. (1999) Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature*, London, 398 (6729): 701-704.
- Currie, C.R. (2001) Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. *Oecologia*, Berlin, 128 (1): 99-106.
- Currie, C.R.; Stuart, A.E. (2001) Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, London, 268 (1471): 1033-1039.
- Currie, C.R., Wong, B., Stuart, A.E., Schultz, T.R., Rehner, S.A., Mueller, U.G., Straus, N.A. (2003a). Ancient tripartite coevolution in the attine ant-microbe symbiosis. *Science*, 299(5605): 386-388.
- Currie, C.R.; Bot, A.N.M.; Boomsma, J.J.; (2003b) Experimental evidence of a tripartite mutualism: bacteria protect ant fungus gardens from specialized parasites. *Oikos*, Copenhagen, 101 (1): 91-102.
- Currie, C.R.; Poulsen, M.; Mendenhall, J.; Boomsma, J.J.; Billen, J. (2006) Coevolved crypts and exocrine glands support mutualistic bacteria in fungus-growing ants. *Science (New York, N.Y.)*, 311 (5757): 81-3.
- Delabie, J.H.C., Alves, H.S.R., Reuss-Strenzel, G.M., Carmo, A.F.R., Nascimento I.C. (2011) Distribuição das formigas-cortadeiras *Acromyrmex* e *Atta* no Novo Mundo. *In: Della-Lucia, T. M. C. Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo*. 1 ed. Viçosa: UFV, p. 80-101.
- Della Lucia, T.M.C., Vilela, E.F., Anjos, N., Moreira, D.D.O. (1993) Criação de formigas cortadeiras em laboratório. *In: Della Lucia, T.M.C., As Formigas cortadeiras*. 1. ed. Viçosa: Folha de Viçosa, p.151-162.
- Della Lucia, T.M.C. (2003) Hormigas de importancia económica en la región Neotropical. *In: Fernández, F., Introducción a las hormigas de la región Neotropical*. 1 ed. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia, p. 337-350.
- Della Lucia, T.; Gandra, L.C.; Guedes, R.N.C. (2013) Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. *Pest management science*, 70 (1): 14-23.
- Diehl-Fleig, E., Silva, M.E., Labres, M.E.V., Specht, A. (1992) Ocorrência natural de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. no Rio Grande do Sul. *Acta Biologica Leopoldensia*, 14(1): 99-104.
- Diehl-Fleig, E., Luciano, H. (1995) Organismos associados a uma colônia de *Acromyrmex heyeri* (Hymenoptera: Formicidae) mantida em laboratório. *Acta Biologica Leopoldensia*, 17 (2): 47-56.

- Fernández-Marín, H., Zimmerman, J.K., Rehner, S. A., Wcislo, W.T. (2006) Active use of metapleural glands by ants in controlling fungal infection. *Proc. R. Soc.*, 273: 1689-1695.
- Fernandez-Marin, H., Zimmerman, J.K., Nash, D.R., Boomsma, J.J., Wcislo, W.T. (2009) Reduced biological control and enhanced chemical pest management in the evolution of fungus farming in ants. *Proc. R. Soc. London Ser. B*, 276: 2263-2269.
- Forti, L.C., Moreira, A.A., Andrade, A.P.P., Castellani, M.A., Caldato, N. (2011) Nidificação e arquitetura de ninhos de formigas-cortadeiras. *In: Della-Lucia, T. M. C. Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo*. 1 ed. Viçosa: UFV, p. 102-125.
- Gardes, M.; Bruns, T.D. (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2 (2): 113-118.
- Gerardo, N.M.; Mueller, G.M.; Price, S.L.; Currie, C.R. (2004) Exploiting a mutualism: parasite specialization on cultivars within the fungus-growing ant symbiosis. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, London*, 271 (1550): 1791-1798.
- Gerardo, N.M.; Mueller, U.G.; Currie, C.R. (2006) Complex host-pathogen coevolution in the *Apterostigma* fungus-growing ant-microbe symbiosis. *BMC Evolutionary Biology*, London, 6 (1), 88.
- Guedes, F.L.A.; Attili-Angelis, D.; Pagnocca, F.C. (2012) Selective isolation of dematiaceous fungi from the workers of *Atta laevigata* (Formicidae: Attini). *Folia microbiologica*, 57 (1): 21-6.
- Hart, A.G., Ratnieks, F.L.W. (2002) Waste management in the leaf-cutting ant *Atta colombica*. *Behavioral Ecology*, 13: 224-231.
- Hughes, W.O.H., Eilenberg, J., Boomsma, J.J. (2002) Trade-offs in group living: transmission and disease resistance in leaf-cutting ants. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 269: 1811-1819.
- Hughes, D.P., Evans, H.C., Hywel-Jones, N., Boomsma, J.J., Armitage, S.A.O. (2009) Novel fungal disease in complex leaf-cutting ant societies. *Ecological Entomology*, 34 (2): 214-220.
- Isaeva, O.V., Glushakova, A.M., Garbuz, S.A., Kachalkin, A.V., Chernov, I.Y. (2010) Endophytic yeast fungi in plant storage tissues. *Biology Bulletin*, 37 (1): 26-34.
- Kaewwichian, R., Yongmanitchai, W., Kawasaki, H., Limtong, S. (2012) *Metschnikowia saccharicola* sp. nov. and *Metschnikowia lopburiensis* sp. nov., two novel yeast species isolated from phylloplane in Thailand. *Antonie van Leeuwenhoek*, 102 (4): 743-51.

- Kreisel, H. (1972) Fungi from fungus gardens of *Atta insularis* in Cuba. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie*, 12 (8): 643-54.
- Lacerda F.G., Della Lucia T.M.C., Serrao J.E., Cecon P.R., Souza L.M., Souza D.J. (2010) Morphometry of the metapleural gland of workers engaged in different behavioral tasks in the ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Animal Biology*, 60: 229-236.
- Limtong, S., Kaewwichian, R., Yongmanitchai, W., Kawasaki, H. (2014) Diversity of culturable yeasts in phylloplane of sugarcane in Thailand and their capability to produce indole-3-acetic acid. *World journal of microbiology & biotechnology*, 30 (6): 1785-96.
- Little, A.E.F., Currie, C.R. (2008) Black yeast symbionts compromise the efficiency of antibiotic defenses in fungus-growing ants. *Ecology*, 89 (5): 1216-22.
- Lopez, D.C., Sword, G.A. (2015) The endophytic fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Purpureocillium lilacinum* enhance the growth of cultivated cotton (*Gossypium hirsutum*) and negatively affect survival of the cotton bollworm (*Helicoverpa zea*). *Biological Control*, 89: 53-60.
- Manso, T., Nunes, C. (2011) *Metschnikowia andauensis* as a new biocontrol agent of fruit postharvest diseases. *Postharvest Biology and Technology*, 61 (1): 64-71.
- Marsaro, A.L.Jr., Della Lucia T.M.C., Barbosa L.C.A., Maffia L.A., Morandi M.A.B. (2001) Efeito de secreções da glândula mandibular de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) sobre a germinação de conídios de *Botrytis cinerea* Pers. *Fr. Neotrop. Entomol*, 30: 403-406.
- Masiulionis, V.E., Cabello M.N., Seifert K.A., Rodrigues A., Pagnocca F.C. (2015) *Escovopsis trichodermoides* sp. nov., isolated from a nest of the lower attine ant *Mycocepurus goeldii*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107: 731-740.
- Mattoso, T. C., Moreira, D. D. O., Samuels, R. I. (2012) Symbiotic bacteria on the cuticle of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* protect workers from attack by entomopathogenic fungi. *Biology letters*, 8 (3): 461-464.
- Mayhé-Nunes, A.J. (1991) Estudo de *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae) com ocorrência constatada no Brasil: Subsídios para uma análise filogenética. (Tese Mestrado) - Viçosa - MG, UFV, 122p.
- Meirelles, L.A., Solomon, S.E., Bacci Jr, M., Wright, A.M., Mueller, U.G., Rodrigues, A. (2015) Shared *Escovopsis* parasites between leaf-cutting and non-leaf-cutting ants in the higher attine fungus-growing ant symbiosis. *R. Soc. Open sci*, 2 (9): 150257.
- Melo, W.G.P., Arcuri, S.L.; Rodrigues, A.; Morais, P.B.; Meirelles, L.A.; Pagnocca, F.C. (2014) *Starmarella acetii* sp. nov., a new ascomycetous yeast species isolated from fungus garden of the leafcutter ant *Acromyrmex balzani*.

- International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology, Reading, 64 (4): 1428-1433.
- Mendes, T. D., Rodrigues, A., Dayo-Owoyemi, I., Marson, F. A. L., Pagnocca, F. C. (2012) Generation of Nutrients and Detoxification: Possible Roles of Yeasts in Leaf-Cutting Ant Nests. *Insects*, 3 (1): 228-45.
- Middelhoven, W.J., Fonseca, A., Carreiro, S.C., Pagnocca, F.C., Bueno, O.C. (2003) *Cryptococcus haglerorum*, sp. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast isolated from nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 83 (2): 167-174.
- Möller, A. (1893) Die Pilzgärten einiger südamerikanischer Ameisen. G. Fisher, 6.
- Montoya, Q.V., Meirelles, L.A.; Chaverri, P., Rodrigues, A. (2016) Unraveling *Trichoderma* species in the attine ant environment: description of three new taxa. *Antonie van Leeuwenhoek*, 109 (5): 633-651.
- Moreira, D.D.O., Della Lucia, T.M.C. (1993) Duração do feromônio de trilha de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* e sua capacidade de atração em diferentes concentrações. *Revista Arvore*, 17(2): 202-212.
- Muchovej, J. J., Della Lucia, T. M. (1990) *Escovopsis*, a new genus from leaf cutting ant nests to replace *Phialocladus* nomem invalidum. *Mycotaxon*.
- Nikolcheva, L.G.; Bärlocher, F. (2004) Taxon-specific fungal primers reveal unexpectedly high diversity during leaf decomposition in a stream. *Mycological Progress*, 3, (1): 41–49.
- Ortiz A., Madrigal A., Orduz S., (1999) “Evaluacion del comportamiento de las hormigas *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae) frente a la contaminacion del jardín del hongo con *Trichoderma lignorum*,” *Revista Colombiana de Entomologia*, 25 (3-4): 169-177.
- Pagnocca, F. C.; Legaspe, M. F. C.; Rodrigues, A.; *et al.* (2010) Yeasts isolated from a fungus-growing ant nest, including the description of *Trichosporon chiarellii* sp. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 60, n. Pt 6, p. 1454–9.
- Pagnocca, F.C., Rodrigues, A., Bacci Júnior, M. (2011) Microrganismos associados às formigas-cortadeiras. *In: Della-Lucia, T. M. C. Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo*. 1 ed. Viçosa: UFV, p. 262-283.
- Pagnocca, F.C.; Masiulionis, V.E.; Rodrigues, A. (2012) Specialized Fungal Parasites and Opportunistic Fungi in Gardens of Attine Ants. *Psyche: A Journal of Entomology*, 2012: 1-9.
- Pereira, R.C., Della Lucia, T.M.C. (1998) Estimativa populacional em ninhos de *Acromyrmex subterraneus subterraneus* Forel, 1893 (Hymenoptera: Formicidae). *Revista Ceres*, 45: 573-578.

- Piano, S., Neyrotti, V., Migheli, Q., Gullino, M.L. (1997) Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple. *Postharvest Biology and Technology*, 11 (3): 131-140.
- Poulsen, M., Bot, A.N.M., Nielsen, M.G., Boomsma, J.J. (2002) Experimental evidence for the costs and hygienic significance of the antibiotic metapleural gland secretion in leaf-cutting ants. *Behav Ecol Sociobiol*, 52: 151-157.
- Reynolds, H.T.; Currie, C.R. (2004) Pathogenicity of *Escovopsis weberi*: The parasite of the attine ant-microbe symbiosis directly consumes the ant-cultivated fungus. *Mycologia*, Lawrence, 96 (5): 955-959.
- Ribeiro, M.M.R., Amaral, K.D., Seide, V.E., Souza, B.M.R., Della Lucia, T.M.C., Kasuya, M.C.M., de Souza, D.J. (2012) Diversity of fungi associated with *Atta bisphaerica* (Hymenoptera: Formicidae): the activity of *Aspergillus ochraceus* and *Beauveria bassiana*. *Psyche*, Cairo, 2012.
- Rodrigues, A., Pagnocca, F.C., Bacci, M., Hebling, M.J.A., Bueno, O.C., Pfenning, L.H. (2005). Variability of non-mutualistic filamentous fungi associated with *Atta sexdens rubropilosa* nests. *Folia microbiologica*, 50(5): 421-425.
- Rodrigues, A., Bacci JR, M., Mueller, U.G., Ortiz, A., Pagnocca, F.C. (2008a) Microfungal "weeds" in the leafcutter ant symbiosis. *Microbial ecology*, 56 (4): 604-614.
- Rodrigues, A., Carletti, C.D., Bueno, O.C., Pagnocca, F.C. (2008b) Leaf-cutting ant faecal fluid and mandibular gland secretion: effects on microfungi spore germination. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39: 64-67.
- Rodrigues, A., Cable, R.N., Mueller, U.G., Bacci, M., Pagnocca, F.C. (2009) Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungal garden pathogens of leaf-cutting ants. *Antonie van Leeuwenhoek*, 96 (3): 331-342.
- Rodrigues, A., Mueller, U.G., Ishak, H.D., Bacci, M., Pagnocca, F.C. (2011) 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*, 78 (2): 244-255.
- Santos, A.V., Dillon, R.J., Dillon, V.M., Reynolds, S.E., Samuels, R.I. (2004) Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *FEMS microbiology letters*, 239 (2): 319-323.
- Saravanakumar, D., Ciavarella, A., Spadaro, D., Garibaldi, A., Gullino, M.L. (2008) *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 outcompetes *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum* in apples through iron depletion. *Postharvest Biology and Technology*, 49 (1): 121-128.
- Sasan, R.K., Bidochka, M.J. (2012) The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development. *American journal of botany*, 99 (1): 101-107.

- Schiøtt, M., de Fine Licht, H.H., Lange, L., Boomsma, J.J. (2008) Towards a molecular understanding of symbiont function: identification of a fungal gene for the degradation of xylan in the fungus gardens of leaf-cutting ants. *BMC microbiology*, 8 (1): 40.
- Schmid-Hempel P. (1998) *Parasites in social insects: monographs in behavior and ecology*. Princeton University Press, 409 p.
- Schoch, C.L., Sung, G.H., López-Giráldez, F., Townsend, J.P., Miadlikowska, J., Hofstetter, V., Gueidan, C. (2009) The Ascomycota tree of life: a phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. *Systematic biology*, 58 (2): 224-239.
- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Miller, A.N. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16): 6241-6246.
- Schultz, T.R., Brady, S.G. (2008) Major evolutionary transitions in ant agriculture. *PNAS*, 105 (14): 5435–5440.
- Seifert, K.A., Samson, R.A., Chapela, I.H. (1995) *Escovopsis aspergilloides*, a rediscovered hyphomycete from leaf-cutting ant nests. *Mycologia*, Lawrence, 87 (3): 407-413.
- Sen, R., Ishak, H.D., Estrada, D., Dowd, S.E., Hong, E., Mueller, U.G. (2009) Generalized antifungal activity and 454-screening of *Pseudonocardia* and *Amycolatopsis* bacteria in nests of fungus-growing ants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 (42): 17805–17810.
- Sigma Aldrich (2015). Protocolo de PCR. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/standard-pcr.html>. Acessado em: 20/05/2015.
- Silva, A., Bacci Jr, M., de Siqueira, C.G., Bueno, O.C., Pagnocca, F.C., Hebling, M. J.A. (2003). Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. *Journal of Insect Physiology*, 49(4): 307-313.
- Sipiczki, M. (2006) *Metschnikowia* strains isolated from botrytized grapes antagonize fungal and bacterial growth by iron depletion. *Applied and environmental microbiology*, 72 (10): 6716–6724.
- Souto L.S., Sternberg L. (2011) Ciclagem de nutrientes por formigas-cortadeiras. *In: Della-Lucia, T. M. C. Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo*. 1 ed. Viçosa: UFV, p. 249-261.
- Tabashnik B. (1994) Evolution of Resistance to *Bacillus Thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*. 39: 47-79.

- Taerum S.J., Cafaro M.J., Little A.E.F., Schultz T.R., Currie C.R. (2007) Low host-pathogen specificity in the leaf-cutting ant-microbe symbiosis. *Proc R Soc Lond B*, 274: 1971-1978.
- Thermofisher (2015). Protocolo de clonagem. Disponível em: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/topota\\_man.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/topota_man.pdf). Acessado em: 07/07/2015.
- Türkel, S., Korukluoğlu, M., Yavuz, M. (2014) Biocontrol Activity of the Local Strain of *Metschnikowia pulcherrima* on Different Postharvest Pathogens. *Biotechnology research international*, 2014.
- Van Bael, S.A, Fernández-Marín, H., Valencia, M.C., Rojas, E.I., Wcislo, W.T., Herre, E.A. (2009) Two fungal symbioses collide: endophytic fungi are not welcome in leaf-cutting ant gardens. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 276 (1666): 2419-2426.
- Van Bael, S.A., Estrada, C., Rehner, S.A., Santos, J.F., Wcislo, W.T. (2012) Leaf endophyte load influences fungal garden development in leaf-cutting ants. *BMC ecology*, 12 (1): 1.
- Weber, N.A. (1995) Pure Cultures of Fungi Produced by Ants. *Science (New York, N.Y.)*, 121 (3134): 109.
- Wilson, E. (1971) *The insect societies*. (Harvard Univ. Press, Cambridge, MA). 548 p.
- Wilson, E., Hölldobler, B. (1990) *The Ants*. 732 p.
- Zymo research (2015). Protocolo de extração de DNA. Disponível em: <https://www.zymoresearch.com/dna/microbial-environmental-dna-isolation-1/soil-fecal-plant-dna/zr-soil-microbe-dna-miniprep>. Acessado em: 12/05/2015.