



**Universidade Federal do Tocantins
Câmpus de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal**

MARIELA OTONI DO NASCIMENTO

Interações microbianas em colônias da formiga-cortadeira *Atta sexdens* (L.)

**GURUPI - TO
2018**



**Universidade Federal do Tocantins
Câmpus de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal**

MARIELA OTONI DO NASCIMENTO

Interações microbianas em colônias da formiga-cortadeira *Atta sexdens* (L.)

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal do Tocantins como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Danival José de Souza

**GURUPI - TO
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

D676i Do Nascimento, Mariela Otoni.
Interações microbianas em colônias da formiga-cortadeira *Atta sexdens* (L.). / Mariela Otoni Do Nascimento. – Gurupi, TO, 2018.
94 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus
Universitário de Gurupi - Curso de Pós-Graduação (Doutorado) em
Produção Vegetal, 2018.

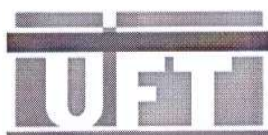
Orientador: Danival José De Souza

1. Attina. 2. Fungos entomopatogênicos. 3. Escovopsis. 4.
Mortalidade de colônias. I. Título

CDD 635

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



UNIVERSIDADE FEDERAL
DO TOCANTINS

Universidade Federal do Tocantins
Câmpus de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal

ATA nº 04/2018

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE MARIELA OTONI DO NASCIMENTO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS

Aos 16 dias do mês de Julho do ano de 2018, às 08 horas, na Sala de defesa do prédio do programa de pós graduação em Produção Vegetal, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Orientador Dr. Danival José de Souza do Câmpus Universitário de Gurupi/ Universidade Federal do Tocantins, Prof. Dr. Renato de Almeida Sarmento do Câmpus Universitário de Gurupi / Universidade Federal do Tocantins, Prof. Dr. Gil Rodrigues dos Santos do Câmpus Universitário de Gurupi / Universidade Federal do Tocantins, Prof.^a Dra. Talita Pereira de Souza Ferreira do Câmpus Universitário de Gurupi / Universidade Federal do Tocantins, Prof.^a Dra. Terezinha Maria Castro Della Lucia da Universidade Federal de Viçosa, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de **MARIELA OTONI DO NASCIMENTO**, intitulada "**Interações microbianas em colônias da formiga-cortadeira *Atta sexdens* (L.)**". Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo parecer favorável à aprovação, habilitando-a ao título de doutor em Produção Vegetal.

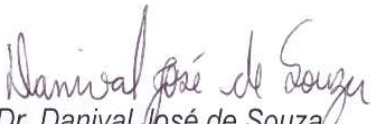
Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Dr. Renato de Almeida Sarmento
Universidade Federal do Tocantins


Dr. Gil Rodrigues dos Santos
Universidade Federal do Tocantins


Dra. Talita Pereira de Souza Ferreira
Universidade Federal do Tocantins


Dra. Terezinha Maria Castro Della Lucia
Universidade Federal de Viçosa


Dr. Danival José de Souza
Universidade Federal do Tocantins
Orientador e presidente da banca examinadora

Gurupi, 16 de julho de 2018.


Dr. Rodrigo Ribeiro Fidelis
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal

À **Deus**, autor e consumidor da vida.

Ao meu esposo **Hélio** e minha filha **Maria Clara**.

Aos meus pais **Luís Otoni** e **Maria Nasaré**.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me proporcionou mais uma vitória. Toda honra a ele.

Ao meu querido esposo, que me auxiliou nas coletas de campo, sempre me amparando, confortando e estimulando a prosseguir. À minha doce e linda filha Maria Clara que sempre foi minha companheira e abriu mão de férias e passeios (mesmo contra a vontade dela) por todos esses anos do mestrado e doutorado. Obrigada pela compreensão de vocês. À minha pequena filha Heloísa, que ainda em meu ventre já me inspira a ser melhor a cada dia. Em setembro estarás em nossos braços.

Ao meu pai Luís Otoni, que sempre incentivou suas filhas a estudarem e dizia “Que o estudo é algo que ninguém pode tirar de vocês”, obrigada pai. A minha mãe Maria Nasaré que está sempre me estendendo a mão para ajudar.

Às minhas irmãs Mirela e Marcele, meus sobrinhos Luís Henrique, Lara e Rodrigue, vocês são “dez”.

Ao meu orientador professor Dr. Danival José de Souza, obrigada por compartilhar seus conhecimentos, obrigada pela paciência e obrigada por acreditar em mim. Sou grata a ti.

À Universidade Federal do Tocantins, que me permitiu flexibilizar a minha carga horária de trabalho com a pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal do Tocantins, pela oportunidade de desenvolvimento intelectual e profissional.

Ao professor Dr. Renato de Almeida Sarmiento que não mediu esforços para acomodar as colônias de formigas-cortadeiras no laboratório de Ecologia funcional e aplicada. À professora Maíra Ignácio Sarmiento, sempre positiva, incentivando e dividindo seus conhecimentos.

Aos professores que aceitaram compor essa banca examinadora, e assim, estão contribuindo com o meu desenvolvimento acadêmico e pessoal.

Aos colegas de pesquisa do Laboratório de Controle Microbiano de insetos: Cléia de Almeida, Cinthia Horrana, Amanda Tenório (que foi uma grande companheira, e ainda fez o favor de ir em Viçosa para acompanhar a extração de DNA de actinobactérias). À minha prima Ms. Kamilla Otoni que cedeu sua amizade enquanto estava realizando suas pesquisas de mestrado.

À Dra Rita de Cássia Cerqueira Melo e Prof.^a Maria Catarina Megumi Kasuya do laboratório de Genética Molecular de Bactérias da UFV, pelo auxílio na etapa de identificação das actinobactérias.

A todos do Laboratório de Ecologia Funcional e Aplicada, pelo suporte e amparo. Ao Dr. Marçal de Pedro Neto, Dra. Marciane Dotto e Doutoranda Aline Silvestre. À doutoranda Poliana Silvestre e Dr. Carlos Henrique “Carlos melancia” me ensinaram a usar o programa Sigma Plot, muito obrigada. À Ms. Adriana Gonçalves de Oliveira, “dri”, que foi tão legal comigo e com minha filha. A todos os alunos que passaram por ali. Aos colegas do Casadinho – UFT, que muito colaboraram com os momentos de descontração, fornecendo palavras amigas e motivadoras.

A todos que de qualquer maneira me ajudaram realizar este projeto.

Meus sinceros agradecimentos.

Sumário

RESUMO GERAL	9
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
CAPÍTULO 1 – A influência do solo no desenvolvimento de colônias incipientes de <i>Atta sexdens</i> (Linnaeus)	46
Resumo	47
Abstract.....	48
Introdução.....	49
Material e métodos	50
Resultados.....	54
Discussão	60
Referências	62
CAPÍTULO 2 – Actinobactérias do solo inibem fungos associados às colônias de formigas-cortadeiras.....	66
Resumo	66
Abstract.....	67
Introdução.....	68
Material e métodos	69
Resultados.....	72
Discussão	80
Referências	81
CAPÍTULO 3 – Colônias de <i>Atta sexdens</i> aceitam formulações granuladas de <i>Escovopsis</i> sp. 85	
Resumo	85
Abstract.....	86
Introdução.....	87
Material e métodos	88
Resultados e discussão	90
Referências	92

RESUMO GERAL

Microrganismos formam associações com a maioria das espécies animais e um exemplo fascinante são as múltiplas interações nas colônias de formigas-cortadeiras. Os efeitos dessas interações (positivos e negativos) se manifestam na sanidade e desenvolvimento das colônias. Sendo assim, a compreensão das interações que ocorrem entre os microrganismos das colônias de formigas-cortadeiras *A. sexdens* é importante para fundamentar o controle biológico desta praga. Esse presente trabalho foi dividido em três capítulos. O primeiro capítulo objetivou comparar o desenvolvimento de colônias de *Atta sexdens* (Linnaeus) em contato com dois solos: (i) de área com ninhos e (ii) de área sem ninhos de formigas-cortadeiras. Foram conduzidos dois experimentos em laboratório. No experimento I, fêmeas recém-fecundadas fundaram a colônia em pote com gesso e, após 106 dias, entraram em contato com solo. No experimento II, as fêmeas recém-fecundadas fundaram suas colônias diretamente no solo. A taxa de mortalidade de colônias, após 106 dias da revoada e se desenvolvendo em pote com gesso, foi de 28,6%. Quando se desenvolveram desde o início em contato com o solo, a taxa de mortalidade elevou-se a 67,2 %. Os resultados confirmam que as colônias incipientes de *A. sexdens* sofrem forte pressão seletiva de microrganismos do solo no momento da fundação. No entanto, após o surgimento da força operária, mecanismos de defesa imune social, provavelmente, garantem o desenvolvimento da colônia a despeito da presença de microrganismos patogênicos no solo dos ninhos. O segundo capítulo objetivou isolar e identificar actinobactérias de solos de câmaras de jardim de fungos de *A. sexdens* e avaliar o efeito inibitório desses isolados sobre fungos associados às colônias de formigas-cortadeiras. Foram sequenciados o gene 16S rRNA de nove actinobactérias, sendo seis do gênero *Streptomyces*, duas do gênero *Nocardia* e uma do gênero *Kitasatospora*. Foi verificado que dois isolados de *Streptomyces* e um de *Kitasatospora* inibiram não só o fungo *Escovopsis* sp., como também o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e o fungo antagonista do cultivar simbiote de cortadeiras *Trichoderma* aff. *strigosellum*. Uma vez que não existem evidências de cultivo de actinobactérias na cutícula de operárias do gênero *Atta*, é possível hipotetizar que essas operárias estabeleçam simbiose temporária adaptativa com microrganismos do solo produtores de substâncias antifúngicas e antibióticas e que vivem em alguma parte de seu ninho ou mesmo no interior do seu corpo. Além disso,

os fungos patogênicos para colônias de formigas-cortadeiras presentes no solo adjacente ao ninho, apesar de constituírem um risco, podem ser controlados pelas secreções produzidas pelas operárias, bem como pelos metabólitos de algumas actinobactérias. O terceiro capítulo teve como objetivo verificar a aceitação e incorporação de iscas contendo micélio de *Escovopsis* sp. em colônias jovens de *Atta sexdens*. Verificou-se o transporte de iscas em todas as colônias do teste. Houve redução no peso do jardim de fungos das colônias que receberam iscas com *Escovopsis* sp., e aumento no peso do jardim de fungos de colônias que receberam tratamento controle. Conclui-se que a utilização de iscas com micélio de *Escovopsis* sp. foi satisfatória para introduzir o fungo parasita no jardim de fungos de colônias de *Atta sexdens*.

Palavras-chave: Attina, fungos entomopatogênicos, fungo parasita, mortalidade de colônias e antagonismo.

ABSTRACT

Microorganisms form associations with most animal species, and a fascinating example is the multiple interactions in the colonies of leaf-cutting ants. The effects of these interactions (positive and negative) are exhibited in the health and development of the colonies. Therefore, the understanding of the interactions that occur among the microorganisms into leaf-cutting ants colonies is important to support of biological control of this pest. This work was divided into three chapters. The first chapter aimed to compare the development of colonies of *Atta sexdens* (Linnaeus) in contact with two types of soil: (i) from an area used for nesting and (ii) from an area not used for nesting of leaf-cutting ants. Two experiments were conducted in the laboratory. In experiment I, newly fertilized females founded the colony in a plastic pot with gypsum and, after 106 days were transferred to a plastic pot with soil. In experiment II, newly fertilized females founded their colonies directly on the soil. Colony mortality rate 106 days after nuptial flight and founding in a plastic pot with gypsum was 28.6%. When they developed directly in contact with the soil, mortality rate increased to 67.2%. The results support that incipient colonies of *A. sexdens* undergo strong selective pressure from soil microorganisms at the time of foundation. However, after the emergence of the worker force, social immune defense mechanisms likely guarantee the development of the colony, despite the presence of pathogenic microorganisms in the soil of the nests. The second chapter aimed to isolate and identify actinobacteria from soils of fungi garden chambers of *A. sexdens* and to evaluate the inhibitory effect of these isolates on fungi associated with leaf-cutting colonies. To identify the isolates, the 16S rRNA gene was sequenced from nine actinobacteria: six of *Streptomyces* genus, two of *Nocardia* genus and one of *Kitasatospora* genus. Two *Streptomyces* and one *Kitasatospora* isolates inhibited not only the fungus *Escovopsis* sp., but also the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and the antagonistic fungus of the cultivar symbiont of leaf-cutting ant *Trichoderma* aff. *strigosellum*. Since there is no evidence of cultivation of actinobacteria on the *Atta* worker cuticle, it is possible that these workers establish temporary adaptive symbiosis with soil microorganisms producing antifungal and antibiotic substances and living in some part of their nest or even in the interior of their body. It can be hypothesized that pathogenic fungi present in the soil adjacent to the leaf-cutting ant nest, despite the risk they represent, are controlled by the secretions produced by the workers, as well as by the metabolites of

some actinobacteria. The third chapter had the objective of verifying the acceptance and incorporation of baits containing mycelium of *Escovopsis* sp. by young colonies of *A. sexdens*. We verified the transport of baits in all tested colonies. There was a reduction in the weight of the fungus garden of the colonies that received baits with *Escovopsis* sp., and an increase in the weight of the fungus garden of colonies that received control treatment. It is concluded that the use of baits with mycelium of *Escovopsis* sp. was satisfactory to introduce the fungus parasite in the fungus garden of *A. sexdens* colonies.

Key words: *Attina*, entomopathogenic fungi, parasitic fungus, colony mortality and antagonism.

1. INTRODUÇÃO GERAL

As formigas-cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* são pragas severas da região neotropical, são conhecidas como saúvas e quenquéns respectivamente. Sua importância econômica é destacada pelo fato delas cortarem material vegetal fresco que serve de substrato para o fungo cultivado (Della Lucia & Souza, 2011; Della Lucia et al., 2014). Os cortes de folhas por esses insetos geram grandes prejuízos financeiros, sendo que os danos podem ser irreversíveis para as plantas causando até a morte (Zanetti et al., 2014).

Os ninhos de formigas-cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae) são construídos no subsolo e, assim, estão sujeitos às condições específicas que esse espaço apresenta. Características físicas, químicas e biológicas dos solos podem interferir na composição da comunidade de microrganismos e nas relações ecológicas entre eles (Michereff et al. 2005). Assim sendo, a escolha do local de fundação dos ninhos é fator decisivo no sucesso da vida das formigas-cortadeiras, sendo esse um comportamento específico. A complexidade de interações entre os microrganismos do solo é pouco compreendida devido à sua grande diversidade, aos encontros aleatórios que ocorrem entre eles e ao pouco conhecimento que há sobre o papel que cada táxon desempenha em uma teia alimentar (Stamford et al. 2005).

A microbiota do solo exerce papel direto nas colônias de cortadeiras e é capaz até de limitar o desenvolvimento e a sobrevivência das mesmas (Araújo et al. 2003), como é o caso de fungos entomopatogênicos (e.g. *Metarhizium anisopliae* Metsch.), antagonistas (e.g. *Trichoderma* spp. - Ascomycota: Hypocreaceae) e parasitas do fungo simbiote de cortadeiras *Leucoagaricus gongylophorus* (Basidiomycota: Agaricales) (e.g. gênero *Escovopsis* spp. - Ascomycota: Hypocreaceae). Em contrapartida, as formigas podem recrutar microrganismos produtores de substâncias antimicrobianas que estão no solo e cultivá-las em seu jardim de fungo (Santos et al. 2004).

As colônias de formigas-cortadeiras são eficientes na prevenção de infecção por patógenos devido à combinação de comportamento higiênico aliado à complexidade de sua organização social. Elas utilizam substâncias antifúngicas e

antibióticas secretadas principalmente pelas glândulas metapleurais e mandibulares (Mendonça et al. 2009), estabelecem associação com actinobactérias produtoras de substâncias antimicrobianas (Sen et al. 2009) e apresentam, também, o hábito de afastar seus resíduos das câmaras de cultivo do fungo simbiote mutualista (Hart & Ratnieks 2002; Scott et al. 2010).

Um patógeno quando entra na colônia de formigas-cortadeiras é identificado pelas operárias por causa da divisão do trabalho que há entre as diferentes castas morfológicas (Griffiths & Hughes 2010; Montoya-Lerna et al. 2012). Aliado a esse comportamento social, é destacado também que a cavidade infrabucal das formigas funciona como um aparato capaz de filtrar e neutralizar partículas. Nesta cavidade, os esporos são armazenados sob a forma de "pellets" e são eliminados como rejeitos (Della Lucia 2011). Desta forma, é um desafio introduzir microrganismos patogênicos na colônia, quando se trata de controle biológico aplicado.

A compreensão das interações que ocorrem entre os microrganismos que abrangem as colônias da formiga-cortadeira *A. sexdens* é importante para fundamentar ações de controle biológico desta praga. Desta forma, o primeiro capítulo desse estudo buscou compreender as diferenças no comportamento de colônias que se desenvolvem em contato com solo utilizado previamente para nidificação de formigas-cortadeiras e solo não utilizados para nidificação. O segundo capítulo isolou actinobactérias que estão presentes no solo de câmaras de jardim de fungo de *A. sexdens* e avaliou o efeito inibitório desses isolados sobre fungos associados às colônias de formigas-cortadeiras. Por fim, no terceiro capítulo, foram confeccionadas iscas com polpa cítrica misturada com micélio de *Escovopsis* sp. e verificada a aceitação e incorporação dessas iscas em colônias jovens de *A. sexdens*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FORMIGAS-CORTADEIRAS

As formigas-cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae) pertencem à subtribo Attina, elas cultivam fungo simbiote mutualista *Leucoagaricus gongylophorus* (Basidiomycota: Agaricales) para sua nutrição. A associação fungo-inseto evoluiu até o ponto em que essas formigas e o fungo mutualista não podem viver isoladamente (Mueller et al., 2005). As formigas-cortadeiras dos gêneros *Atta* Fabricius e *Acromyrmex* Mayr se diferenciam das demais formigas cultivadoras de fungo por utilizarem, preferencialmente, partes verdes de plantas para o cultivo do fungo (Mueller et al., 2010).

As cortadeiras são insetos eussociais daí possuem cuidados com a prole, divisão reprodutiva do trabalho e sobreposição de gerações que dividem o trabalho da colônia. A colônia é constituída por machos e fêmeas alados (que ocorrem apenas em período específico para a formação de novas colônias), pela rainha que é responsável pela reprodução e pelas operárias que são responsáveis por buscas de materiais vegetais, pela limpeza da colônia e outras funções (Brandão et al., 2011; Della Lucia & Souza, 2011).

Atta e *Acromyrmex* são consideradas as pragas mais importantes da silvicultura, atacando de maneira constante e em qualquer fase do desenvolvimento das plantas (Zanetti et al., 2002); também causam prejuízos a muitas culturas agrícolas e pastagens (polífagas). É relevante destacar que elas exibem seletividade nas escolhas do material vegetal para fornecer ao jardim de fungo. Elas controlam suas fontes de folhas enquanto forrageiam e exibem uma flexibilidade nas decisões de forrageamento. Como consequência de tais hábitos de forrageamento e escolha, elas acabam aumentando a área de forrageamento que resulta em ameaça aos campos cultivados mais afastados do ninho, maior risco de ataque em plantações monoculturais e rejeição de inseticidas e iscas contaminadas com patógenos (Kost et al., 2005; Kost et al., 2011).

Na associação formiga-inseto, as formigas obtêm seus nutrientes por meio da degradação de polissacarídeos como pectinas, amido e celulose (Richard & Mora,

2005; Silva et al, 2006) e o fungo encontra um ambiente favorável para o seu desenvolvimento, tendo recursos acessíveis e livres de patógenos e competidores, além dele ser propagado pela própria formiga. O fungo cultivado possui na porção terminal das suas hifas uma estrutura dilatada contendo reservas nutritivas, que são sugados pelas formigas, sendo ricas em glicogênio, chamadas gongilídios (Schultz & Brady, 2008).

As formigas-cortadeiras cultivam seu fungo simbiote em câmaras no sub-solo e ali encontram condições controladas de temperatura e umidade (Sosa-Calvo et al., 2015). Os ninhos das cortadeiras estão sujeitos às condições específicas de cada localidade, pois os microrganismos presentes naturalmente no solo influenciam diretamente nas colônias, sendo capazes até de limitar o desenvolvimento e a sobrevivência das mesmas (Araújo et al., 2003).

4.2 O SURGIMENTO DA FUNGICULTURA

A agricultura é desenvolvida em apenas quatro grupos de animais: humanos, cupins, besouros ambrosia e formigas (Mueller et al., 2005). O homem começou a domesticação de plantas e animais selvagens, há 10.000 anos (Diamond, 2002). Já nos insetos, os cupins da subfamília Macrotermitinae que são encontrados na Ásia e África, cultivam o fungo *Termitomyces* sp. (basidiomiceto), e esta associação possivelmente surgiu há 24-34 milhões de anos (Aanen et al., 2002). Os coleópteros da subfamília Scolitynae e Platypodinae iniciaram o cultivo do fungo entre 20- 60 milhões de anos, sendo cultivado um tipo de fungo chamado ambrósia (ascomiceto), que são transportados e cultivados em galerias construídas na madeira (Farrell et al., 2001). As formigas que cultivam fungo pertencem à subtribo Attina, sendo um fungo basidiomiceto, e esta associação é datada há mais de 50 milhões de anos (Schultz & Brady, 2008).

A fungivoria é um hábito raro entre os animais, mesmo que os fungos sejam um recurso abundante. É relatada a fungivoria em alguns gêneros de formigas, e na medida em que são estudados os hábitos de milhares de formigas, novos casos são descobertos. Por exemplo, foi relatado por Witte & Maschwitz (2008) uma espécie de formiga que é especializada em forragear cogumelos. Também formigas especializadas em predação do fungo cultivado pelas Attina, como exemplo,

Gnamptogenys hartmani (Dijkstra & Boomsma, 2003). É verificado que além do fungo servir de alimento, as formigas podem usá-lo para reforçar a parede de seus ninhos ou túneis, como em *Azteca brevis* (Mayer & Voglmayr, 2009). As formigas da subtribo Attina estão além da fungivoria, pois cultivam o fungo simbiote e também possibilitam a sua reprodução clonal (Della Lucia et al., 2014).

Alguns trabalhos tentam esclarecer os passos que levaram uma agricultura simples até a agricultura mais complexa (simbiose mutualística) da subtribo Attina. As formigas da subtribo Attina constituem um grupo monofilético, um clado incluindo todas as espécies derivadas de um único ancestral, e têm distribuição exclusiva na região neotropical (Schultz & Brady, 2008). A agricultura da subtribo evoluiu em cinco sistemas distintos, segundo Della Lucia & Souza (2011): agricultura inferior (são espécies que usam como substrato do fungo partes mortas de plantas, carcaças de invertebrados e fezes de insetos; sabe-se que *Escovopsis* parasita esse fungo); agricultura de um fungo Pterulaceae (formigas do gênero *Apterostigma* iniciaram o cultivo de um fungo que não é da família Lepiotaceae, que também é parasitada pelo *Escovopsis*); agricultura de leveduras (originou-se há 5-25 milhões de anos, e a forma selvagem cresce na forma de micélio, e não se conhece um parasita *Escovopsis* associado); agricultura superior (são incluídas as formigas-cortadeiras, que utilizam também partes vegetais frescas de plantas, é exibido alto grau de “domesticação”, ou seja, adaptando da vida livre até uma vida associada obrigatória. Somente o fungo cultivado por essas formigas apresenta gongilídio nas extremidades das hifas, que servem para a nutrição); agricultura nos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* (nestes gêneros não é utilizado partes mortas de plantas e animais, preferencialmente partes frescas de vegetais, o surgimento dessas cortadeiras se deu entre 5-15 milhões de anos).

Foram propostos dois modelos para ordenar a evolução que culminaram na fungicultura das Attina. O mais aceito foi proposto por Weber (Weber, 1958; 1972), que propõe que as formigas praticavam primeiramente a micofagia, e em seguida elas adquiriram a habilidade de cultivá-lo. Um grupo irmão das Attina ainda não foi descoberto, e isso poderia ajudar muito a elucidar sobre hábitos alimentares dos ancestrais. Mueller (2002) sugeriu que o ancestral das Attina deve ter sido uma espécie neotropical habitante da serapilheira, onde construía ninhos pequenos ou de médio porte diretamente entre as camadas de folhas mortas ou em madeiras em

decomposição (apresentando poucas operárias). Esse ancestral pode ter sido um predador ou um saprófago, que acumulava exoesqueleto de suas presas e outros detritos dentro ou perto do ninho. Esses detritos acumulados dentro do ninho podem ter servido de substrato para fungos saprofiticos crescerem no ninho. A fase seguinte desse processo seria que esse micélio passaria a ser cultivado por essas formigas e assim ser dispersos por elas (dispersão vertical). A natureza exata da associação ancestral Attina-fungo é difícil de deduzir dado o longo tempo decorrido desde a origem da tribo e sua intensa diversificação posterior.

Atualmente são conhecidas mais de 230 espécies da subtribo Attina e 12 gêneros. Formigas dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* são as verdadeiras formigas-cortadeiras e juntamente com os gêneros *Trachymyrmex* e *Sericomyrmex* constituem as formigas-cortadeiras “superiores”; este nome é devido a suas colônias serem maiores, maiores operárias e maior complexidade social. Outros doze gêneros formam as Attina “inferiores” (*Apterostigma*, *Cyphomyrmex*, *Kalathomyrmex*, *Mycetagroicus*, *Mycetarotes*, *Mycetagroicus*, *Mycetophylax*, *Mycetosoritis*, *Mycocepurus*, *Myrmicocrypta*, *Paramycetophylax* e *Pseudoatta*).

O fungo cultivado pelas formigas da subtribo Attina pertence a dois gêneros, sendo *Leucoagaricus* e *Leucocoprinus* da família Lepiotaceae (Agaricales: Basidiomycota). Há apenas duas exceções que são encontradas no gênero *Apterostigma* (que cultivam o fungo da família Pterulaceae), e em *Cyphomyrmex* que cultivam o fungo na forma de levedura (Della Lucia & Souza, 2011). Sem dúvida, a aquisição de um cultivar monofilético com gongilídio pelas Attina (em especial *Atta* e *Acromyrmex*) foi uma importante etapa evolutiva na história. A coleta de apenas material vegetal fresco para substrato do fungo e a conversão desse substrato em nutriente disponível para as operárias, exige uma série de operações e especializações (por exemplo, a operária que corta a vegetação apresenta uma largura de cabeça de 1,6 mm ou mais, a operária que cuida do fungo é menor, e para funções intermediárias exige operárias de tamanho intermediário) (Brandão et al., 2011).

4.3 MODIFICAÇÕES COEVOLUTIVAS NA FUNGICULTURA

A especialização agricultor-cultivar aumenta o potencial de coadaptação, em que a modificação evolutiva em um dos parceiros provoca uma modificação coevolutiva no outro parceiro (Futuyma, 2009). É relativamente fácil identificar modificações evolutivas nas espécies do agricultor, como estruturas morfológicas especializadas para o transporte das cultivares por fêmeas durante a dispersão no voo (por exemplo, cavidade infrabucal nas formigas), modificações de mandíbulas (Schultz & Meier, 1995), ou o conjunto de modificações comportamentais, glandulares ou fisiológicas que constituem a base da agricultura de insetos. Exemplos de modificações evolutivas nas cultivares são mais difíceis de identificar porque os fungos cultivados são mais difíceis de estudar. Os exemplos claros de modificações de cultivares são as intumescências das hifas (gongilidia) produzidas pelo cultivar de *Attina* superiores, que são estruturas ricas em nutrientes projetadas para fácil colheita pelos agricultores, ingerindo e alimentando as larvas ou ninfas. Outras possíveis modificações coevolutivas que devem ser investigadas incluem a reprodução predominantemente assexuada nos cultivares e a capacidade dos cultivares de sobreviver ao armazenamento na cavidade infrabucal (Mueller et al., 2005).

De uma perspectiva evolutiva, a agricultura de insetos representa um caso de cooperação entre as linhagens de agricultores e cultivares, cada uma explorando a outra com finalidade de perpetuação da espécie (Mueller, 2002). As interações entre eles são frequentemente instáveis e podem se perder ao longo do tempo evolutivo, por exemplo, quando surgem supressores (cultivares invasores). Uma série de conflitos entre agricultores-cultivares podem desestabilizar o mutualismo, mas pelo menos dois mecanismos evolutivos preservam a natureza cooperativa da associação agricultor-cultivar: o feedback do parceiro (quanto à transmissão vertical do cultivar), que é um mecanismo de feedback automático no qual um parceiro não cooperativo reduz a aptidão do outro parceiro, na medida em que reduz sua própria aptidão também; e, a escolha do parceiro (simbionte) em que os agricultores favorecem associações com cultivares produtivas e discriminam cultivares inferiores em situações de escolha (Aanen et al., 2005; Schultz & Brady, 2008).

A escolha do simbionte foi investigada para formigas *Attina*, e verificaram que os agricultores são capazes de discernir diferenças genotípicas surpreendentemente excelentes entre cultivares (Mueller et al., 2004), sugerindo que a diversidade de cultivares em jardins de formigas, surgem por exemplo, através de mutação em um jardim ou através da importação de novas cepas, que pode evoluir a uma "seleção artificial".

4.4 FUNDAÇÃO DE COLÔNIAS DE FORMIGAS-CORTADEIRAS

A fundação de uma nova colônia nos insetos sociais é efetuada por pelo menos uma fêmea fecundada. Em *Atta sexdens* a nova colônia se inicia com a revoada, que ocorre a cada ano nos saueiros adultos (38 meses após a fundação), momento em que são liberadas formigas reprodutivas aladas (Della Lucia et al., 2011). Durante o voo ocorre o acasalamento e a fêmea fecundada (futura rainha) desce ao solo, retira suas asas e busca um local adequado para instalação do ninho e o macho morre logo após a cópula. As fêmeas aladas, antes de saírem do ninho, retiram um fragmento do fungo *L. gongylophorus* e o armazenam na cavidade infrabucal (Araújo et al., 2011). Em condições de laboratório, a rainha do gênero *Atta* pode viver até 20 anos.

As formigas possuem metamorfose completa passando pelos estágios de ovo, larva, pupa e adultos. Em espécies de *Atta*, a fêmea fecundada escava um túnel de 8,5 a 18 cm de profundidade com uma pequena câmara na porção terminal, onde será regurgitado o fungo e iniciada a postura dos ovos, e poderá ficar enclausurada por até 90 dias nesta câmara. Inicialmente, a rainha cultivará o fungo, realizando constantes lambeduras e deposição de fluídos fecais; o surgimento dos adultos só ocorrerá 60 dias após a revoada (Araújo et al., 2011). As fases de fundação do ninho de *Atta sexdens* estão resumidas na Figura I.

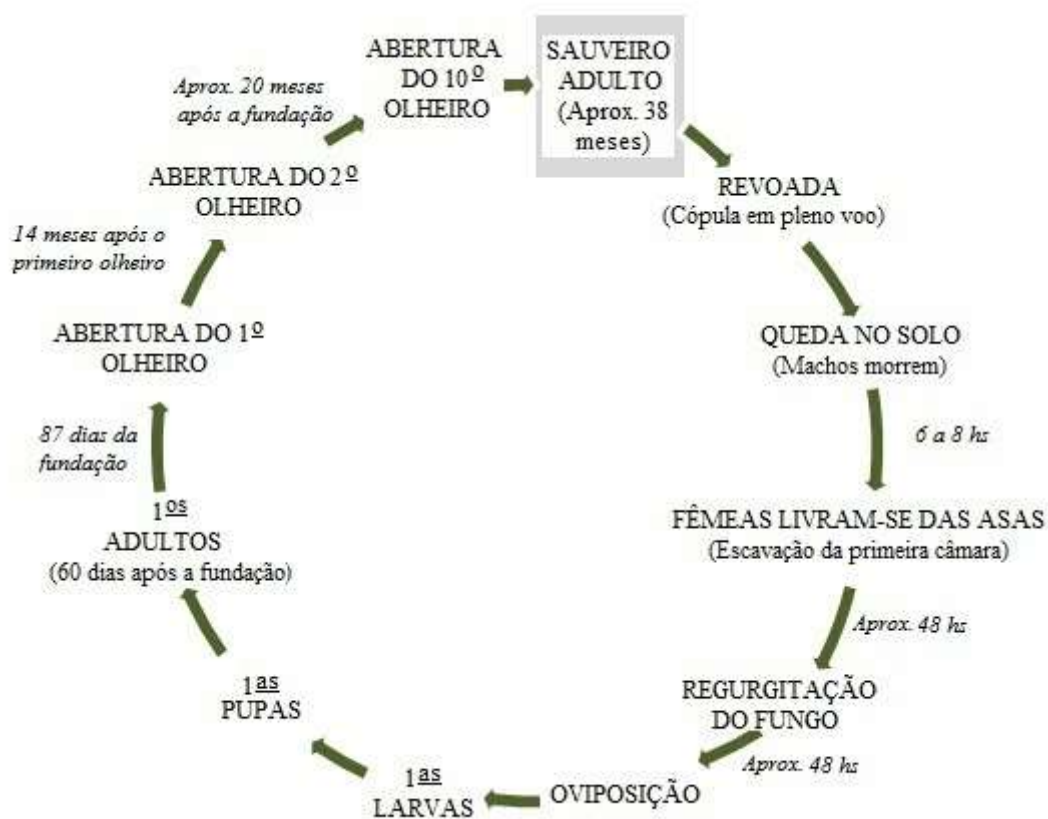


Figura I – Fases da fundação do ninho de formigas-cortadeiras *Atta sexdens* (adaptado de Della Lucia, 2011).

Os ninhos das cortadeiras são encontrados geralmente sob o solo e são compostos por câmaras ou painéis interligados por túneis (Della Lucia, 1993). Em formigas-cortadeiras do gênero *Atta*, com poucas exceções, apenas uma fêmea será responsável pelo sucesso da fundação do ninho e o sucesso nessa fase dependerá da influência direta de fatores ambientais, como as condições climáticas da área escolhida para escavação (Vieira & Vasconcelos, 2010). Observações feitas em campo por Autuori (1950) mostraram uma taxa de sobrevivência de rainhas de *Atta* spp. em torno de 2,5% após 100 dias da revoada e 0,05% após 15 meses. A elevada mortalidade pode ser relacionada com as condições adversas do ambiente, pelo ataque de predadores e pela ação de microrganismos patogênicos que estão presentes naturalmente no solo.

O local de fundação dos ninhos é variável dentre as espécies do gênero *Atta*. *Atta sexdens* constrói ninhos em áreas limpas, mas preservadas da insolação direta

(Van Gils et al., 2010; Van Gils & Vanderwoude, 2012). Vasconcelos et al. (2006) observaram que fêmeas de *A. laevigata* preferem áreas limpas à beira de estradas do que áreas da vegetação adjacente. Araújo et al. (2003) observaram que *A. bisphaerica* optaram por escavar seus ninhos em áreas que sofreram queimadas em plantio de cana de açúcar, possivelmente porque a superfície desses solos esteja exposta. Essas características do local escolhido para nidificação se somam a fatores físicos e biológicos do local.

Em outro gênero de formigas-cortadeiras também foi verificado comportamento semelhante. Em laboratório, fêmeas recém-fecundadas de *Acromyrmex striatus* rejeitaram o solo fértil para a fundação de seu ninho, preferindo solos argilosos e arenosos (Diehl-Fleig & Rocha, 1998). É observado que fêmeas de *Atta* sp. tendem a procurar solos pobres em nutrientes e com baixa carga microbiana para fundação de ninhos. Em razão disso, ocorre maior taxa de viabilidade das suas colônias, provavelmente, em parte, devido ao menor ataque por fungos entomopatogênicos e antagonistas do seu fungo mutualista (Bento et al., 1991; Van Gils, 2011).

Os predadores, parasitoides e microrganismos patogênicos são ameaças reais para as cortadeiras (Della Lucia et al., 2014), entretanto não são as únicas barreiras para o sucesso da colônia. O microclima do local de fundação se não estiver adequado para o desenvolvimento do fungo simbiote, poderá ser limitante para desenvolvimento do mesmo e o cultivo não apresentará rendimento desejado para nutrição das operárias. Então, as cortadeiras investem fortemente na construção, reparação e manutenção da estrutura do ninho, podendo até deslocar seu jardim de fungo para câmaras mais adequadas (Bollazi & Roces, 2010).

O fungo cultivado demanda alta quantidade de material vegetal fresco, assim sendo, gera grandes quantidades de material degradado, que frequentemente são contaminados com fungos oportunistas potencialmente prejudiciais para o jardim. As formigas-cortadeiras se habituaram em retirar os pedaços do fungo exaurido, misturados com o material vegetal degradados e também as operárias mortas, que são depositados à parte do jardim de fungo, como forma de restringir a contaminação e multiplicação de patógenos dentro da colônia (Bot et al., 2001; Hart & Ratnieks, 2002; Scott et al., 2010; Arenas & Roces, 2016).

4.5 INFLUÊNCIA DOS ATRIBUTOS DOS SOLOS NO DESENVOLVIMENTO DE COLÔNIAS DE FORMIGAS-CORTADEIRAS

Os ninhos de formigas-cortadeiras são facilmente visualizados no campo, porque estão rodeados por montes de solo que foram retirados de câmaras e galerias subterrâneas. As operárias escavaram o solo para abrir câmaras, nas quais elas cultivam o fungo simbiote ou mesmo para depositar seu rejeito; este solo proveniente da escavação permanece na superfície do solo, e dependendo da espécie de formiga o lixo também é depositado junto a este monte de terra (Della Lucia, 1993). A escavação das câmaras e galerias pode ser difícil em solos com agregados resistentes ou muito úmidos. Os fatores que afetam a densidade da população de formigas-cortadeiras e os efeitos das propriedades do solo na fundação das colônias são pouco conhecidos (Dóstal et al., 2005). O conhecimento dos fatores que afetam a distribuição dos ninhos de cortadeiras pode contribuir para uma melhor compreensão da ecologia das cortadeiras, permitindo aplicações práticas em programas de manejo integrado de controle de pragas.

As formigas-cortadeiras estão distribuídas por todo território brasileiro, sendo que a distribuição do ninho não é homogênea e são observadas maiores densidades de ninho em algumas áreas do que em outras, e esse fato atraiu a atenção de vários estudos para entender por que isso ocorre. Por exemplo, Bento et al. (1991) encontraram uma correlação positiva entre a densidade do ninho de formigas e os solos de baixa fertilidade. Diehl-Fleig e Rocha (1998) concluíram que, quando tiverem a opção de escolher entre solos arenosos, argilosos ou férteis, as fêmeas recém-fecundadas preferem as duas primeiras para a fundação da colônia. No entanto, esses autores não levaram em consideração os atributos físicos do solo, e essas características estão ligadas à aeração e à umidade do solo, importantes para a fundação do ninho de formigas e o estabelecimento de colônias (Della Lucia, 1993).

É encontrada naturalmente no solo uma diversidade de microrganismos, podendo eles ser patogênicos ou não, e as características físicas, químicas e biológicas do solo podem interferir na patogenicidade desses microrganismos (Bettiol & Ghini, 2005). Devido aos ninhos de formigas-cortadeiras estarem no sub-solo, eles estão constantemente sujeitos às condições específicas do solo da área escolhida

para nidificação. Os microrganismos do solo exercem papel direto nas colônias, e são capazes até de limitar o desenvolvimento e a sobrevivência das mesmas (Araújo et al., 2003). Com o objetivo de verificar o efeito dos microrganismos de ocorrência natural no solo, Bento et al. (1991) realizaram um teste com fêmeas fecundadas de *A. sexdens*. Nesse trabalho foram utilizados solos do horizonte A, B e C de um latossolo, sendo verificados os teores de elementos químicos e quantidade de fungos, bactéria e actinomicetos. Os autores puderam concluir que houve maior estabelecimento de colônias em solos do horizonte C e ficou evidenciado que a sobrevivência das fêmeas no solo do horizonte A foi menor e também perceberam que solos mais pobres nutricionalmente e com menores quantidades de microrganismos favorecem a sobrevivência do saubeiro.

Van Gils et al. (2010) avaliaram a porcentagem de cobertura vegetal e atributos físicos e químicos de vários solos de regiões próximas a ninhos de *A. sexdens* e compararam com solos de áreas em que não haviam ninhos dessas cortadeiras. Dentre os parâmetros avaliados foram encontradas diferenças significativas entre as duas localidades no teor de silte, porcentagem de cobertura vegetal, pH e resistência do solo a penetração na camada 0-20 cm. Esses parâmetros foram correlacionados com a fundação e desenvolvimento da colônia. A cobertura vegetal apresentou uma correlação positiva com a quantidade de ninhos na área, corroborando com o trabalho que foi publicado posteriormente por Van Gils & Vanderwoude (2012), que verificaram que colônias de *A. sexdens* migraram e outras morreram após o desmatamento na área que estavam estabelecidos os ninhos. Desta forma é reforçada a importância da cobertura vegetal na manutenção da temperatura e umidade nas áreas para fundação de ninhos. A resistência de penetração do solo e o percentual de silte foram correlacionados negativamente com a presença de ninhos. Os solos que apresentam menores níveis de silte e menor resistência à penetração podem ser mais fáceis para a escavação pela rainha. Também nesses solos é mais fácil manter as condições microclimáticas adequadas nas câmaras do ninho e drenagem após as chuvas. Os voos nupciais de *A. sexdens* coincidem com o início da estação chuvosa, o que pode aumentar a probabilidade delas encontrarem um solo mais macio e fácil de escavação (Della Lucia et al., 1993). Quanto ao pH, foi percebido que os ninhos estavam presentes em solos com menores níveis de pH. Sabe-se que o fungo simbiote

cultivado pelas formigas cresce diretamente no solo e em pH baixo (Loeck et al., 2004), o que sugere que a fungicultura é beneficiada nesses solos em que os ninhos estavam presentes. O pH baixo está correlacionado negativamente com o crescimento de fungos e bactérias no solo (Rousk et al., 2009), conseqüentemente os solos ácidos podem antagonizar o crescimento de possíveis microrganismos patogênicos.

4.6 MODIFICAÇÕES DOS ATRIBUTOS DO SOLO PELAS FORMIGAS-CORTADEIRAS

As formigas-cortadeiras são insetos sociais dominantes nos ambientes tropicais capazes de alterar os ecossistemas (Della Lucia et al., 2014). Apesar de causarem prejuízos econômicos a diversas culturas, elas estão ligadas à manutenção e funcionamento dos ecossistemas fornecendo uma variedade de serviços ecológicos, por exemplo, como recurso alimentar, dispersão de sementes, modificadores da estrutura do solo, ciclagem de nutrientes e outros (Del Toro et al., 2012). As formigas junto com os cupins, besouros e minhocas formam o grupo dos “engenheiros do ecossistema” (Meyer et al., 2013), devido à capacidade de modificar a estrutura química, física e biológica do solo, criando micro-habitats ricos em nutrientes que são disponibilizados para a vegetação adjacente (Farji-Brener & Illes, 2000; Garrettson et al., 1998; Sousa-Souto & Sternberg, 2011; Pirk & Farji-Brener, 2013).

Nas proximidades do ninho, há mudanças na estrutura e composição química do solo, permeabilidade de água e na disponibilidade de nutrientes em diferentes horizontes, devido ao revolvimento do solo e mineralização da matéria orgânica acumulada nas câmaras de lixo (Farji-Brener & Ghermandi, 2000; Moutinho et al., 2003; Sousa-Souto et al., 2012). Podemos destacar que a presença de ninhos de cortadeiras, principalmente do gênero *Atta*, facilita a penetração de raízes e influencia no desempenho das plantas, quando avaliados a altura, comprimento de raiz, biomassa, e concentração de nutrientes nas folhas. As variações nos teores de nutrientes favorecem o desenvolvimento de espécies vegetais e refletem na abundância e diversidade da vegetação, comparando com as áreas adjacentes ao ninho (Moutinho et al., 2003; Sousa-Souto et al., 2011; Farji-Brener et al., 2014;).

O lixo produzido pelas formigas cortadeiras é proveniente da degradação do material vegetal transportado pelas operárias utilizado para incorporação no jardim de fungo. Além do material vegetal, o lixo também é composto por formigas mortas, microrganismos que vivem associados ao fungo simbiote e por partes do próprio fungo simbiote, que já foi devidamente consumido pelas operárias (Della Lucia et al., 2014). O lixo gerado pela colônia, dependendo da espécie, pode ser mantido em câmara no interior da colônia ou então ser depositado fora do ninho (Della Lucia & Moreira, 1993), formando assim regiões ricas em nutrientes.

Além do papel ecológico do lixo das formigas-cortadeiras no solo e nas comunidades vegetais, esse material pode ter outras aplicações. Em formigas que descartam o lixo na superfície externa do ninho, por exemplo *Acromyrmex balzani* e *Atta colombica*, esse rejeito pode ser um recurso renovável e com alto potencial para uso como substrato em cultivos orgânicos (Cerdeira et al. 2012). As cortadeiras em ambientes que passaram por perturbações (isto é, fogo, desmatamento, seca prolongada) podem minimizar ou até mesmo balancear o impacto sofrido, pois o lixo pode aumentar a fertilidade, porosidade e umidade do solo e ainda propiciar um maior recrutamento de espécies vegetais (Farji-Brenner et al. 2014; Fernández et al. 2014).

Moutinho et al. (2003) avaliaram algumas propriedades físicas e químicas dos solos próximos aos ninhos de *A. sexdens* e compararam com solos de áreas sem ninhos. Puderam notar que nessas localidades houve diferença na resistência do solo na profundidade de 100-200cm e no tamanho na quantidade de macroporos. Esses autores relacionaram tanto a redução da resistência à penetração quanto o aumento do volume de macroporos com as câmaras de lixo. Pode ser que o resultado da agregação de partículas de argila induzidas pela difusão de ácidos orgânicos e cátions no solo seja por tais rejeitos. A matéria orgânica presente nesse rejeito pode aumentar a estabilidade de agregados do solo (ação cimentante da matéria orgânica devido aos polissacarídeos dos microrganismos e também hifas de fungos), diminuindo assim a resistência à penetração e aumentando a macroporosidade do solo. Os cátions também podem formar pontes entre as partículas do solo, agregando ainda mais o solo (Wohlenberg et al., 2004). Com a melhoria na estruturação do solo há um aumento na retenção de água no perfil.

4.7 CONTROLE DAS FORMIGAS-CORTADEIRAS

O controle de formigas-cortadeiras se torna difícil devido às diversas características biológicas e comportamentais da colônia, tais como: a organização social, a associação das formigas com o fungo simbiote, a arquitetura de seus ninhos, o grande número de operárias, a divisão de trabalho entre as castas, os hábitos de limpeza, a produção de substâncias antimicrobianas e outros (Marinho et al., 2006). A remoção da rainha e destruição física da colônia são formas de controle, no entanto são limitados a áreas pequenas, ninhos com pequenas populações, colônias superficiais (colônias jovens).

O controle químico é o método amplamente utilizado para controle de populações de formigas-cortadeiras. Os produtos químicos podem ser aplicados por meio de pó seco, termonebulização e também iscas granuladas.

A aplicação de formulações em pó seco é feita por bombeamento do pó inseticida nos orifícios ativos do ninho. Organofosforados, carbamatos e particularmente piretróides foram utilizados como pó seco para fornecer controle eficiente sob condições ambientais secas e contra ninhos pequenos e pouco profundos. Essa técnica não é viável em ninhos profundos e com muitas câmaras, como geralmente são observados em ninhos adultos de *Atta*. Dificilmente o pó atingirá as câmaras mais protegidas no qual aloja a rainha e seus imaturos (Della Lucia et al., 2000).

Na termonebulização o inseticida é aplicado em meio a uma suspensão com óleo diesel ou mineral, para isso é necessário que um motor aqueça o óleo e a fumaça misturado com o inseticida seja injetada pelo orifício do ninho. Em ninhos grandes a saturação dos túneis é mais demorada, podendo também como o pó seco, não atingir todas as câmaras e a colônia se reestabelecer posteriormente (Della Lucia et al., 2014).

As iscas granuladas contêm atrativos para as formigas, podendo ser formuladas com fipronil ou sulfluramida, e é o método mais utilizado por ser mais fácil de aplicação que outros métodos de controle (Zanuncio et al., 2002; Zanetti et al., 2002). As iscas são distribuídas perto das trilhas das formigas e das aberturas do

ninho. A quantidade de isca é baseada no tamanho do ninho, e as operárias forrageadoras carregam as iscas, as introduzem no ninho e assim contaminam o jardim de fungo e as outras operárias, causando a morte das mesmas dentro de 4 a 5 dias. Com a morte delas, o cultivo do fungo fica comprometido (Della Lucia & Araújo, 2000; Zanetti et al., 2002; Zanuncio et al., 2002; Antunes et al., 2005; Montoya-Lerma et al., 2012; Della Lucia et al., 2014).

A utilização de produtos químicos, além de aumentar os custos da produção, causam danos ao ambiente e à saúde humana, são de baixa especificidade, favorecem o surgimento de populações resistentes e a eliminação de inimigos naturais (Zanuncio et al., 2002; Zanetti et al., 2014). Devido a esses problemas, há necessidade de se utilizar métodos alternativos de controle de cortadeiras, utilizando-se produtos mais específicos e menos agressivos ao meio ambiente.

Os agentes de controle, tanto biológicos quanto químicos, requisitam diferentes formas de ação no combate às formigas-cortadeiras. Em ambos os tipos de controle, objetiva-se a mortalidade elevada da população, mas provavelmente a colônia consiga se restabelecer. Portanto, os agentes de controle que visam impactar ou eliminar a rainha e ou o fungo simbiote podem ter mais sucesso efetivo (Della Lucia et al., 2000; Della Lucia et al., 2014).

4.8 CONTROLE BIOLÓGICO FORMIGAS-CORTADEIRAS

O controle biológico propõe reduzir a população de uma praga a um nível em que esta não cause prejuízos econômicos e ambientais, assegurando a manutenção dos inimigos naturais, causando assim um equilíbrio entre os organismos (Parra et al., 2002). O controle biológico é um item da estratégia do manejo integrado de praga (MIP) e atualmente assume papel importante nesses programas de manejo de pragas. Parasitoides, predadores e patógenos promovem o controle biológico e formam o grupo dos inimigos naturais de uma praga. Os parasitoides e predadores de insetos são chamados de entomófagos e os patógenos que infectam insetos são chamados de entomopatogênicos (Bueno et al., 2011).

Os forídeos parasitoides são agentes de controle biológico seguro para formigas-cortadeiras. Os principais gêneros de forídeos parasitoides que atacam

formigas-cortadeiras são *Apocephalus* (Brown), *Eibesfeldtphora* (Disney) e *Myrmosicarius* (Disney). Os parasitoides perseguem as operárias pelas trilhas de forrageamento e põem ovos em sua cutícula. As formigas ficam perturbadas com o ataque dos parasitoides e buscam se proteger. Entretanto, o ataque desses inimigos naturais não é suficiente para controlar níveis populacionais de formigas-cortadeiras a níveis que não causem danos econômicos. Desta forma é controverso a utilização de parasitoides como única forma de controle de formigas-cortadeiras, podendo ele ser associado a outros métodos de controle biológico (Bragança et al., 2002; Bragança et al., 2009; Bragança, 2011; Guillade & Folgarait, 2011; Elizalde & Folgarait, 2012).

Os predadores são indivíduos de vida livre, geralmente são maiores que as presas e requerem um grande número de presas para completar o seu ciclo de vida, podem preda insetos em estágio larval e adultos. (Towsend et al., 2010; Jackson et al., 2000). Em formigas-cortadeiras pode-se destacar as aves, ácaros, formigas e besouros como os principais predadores. As aves, principalmente espécies insectívoras e onívoras, são importantes como inimigos naturais de cortadeiras (Boaretto e Forti, 1997). O besouro *Canthon virens* (Mannerhein) decapita a rainha de cortadeira e usa seu cadáver como um substrato para alimentação e até para oviposição (Araújo et al., 2015).

Inúmeros microrganismos estão relacionados ao controle microbiano de insetos como fungos, bactérias, vírus, além de outros microrganismos menos estudados como protozoários, rickétsias, espiroplasmas e fitoplasmas (Alves, 1998). O uso de microrganismos entomopatogênicos para o controle de pragas apresenta diversas vantagens como alta especificidade e seletividade, é de fácil multiplicação, dispersão e produção em meios artificiais, não causa poluição ambiental e toxicidade ao homem e outros organismos não-alvo, dentre outras (Butt et al., 2001; Jackson et al., 2000).

O controle biológico natural ocorre com a ação de predadores, parasitoides e microrganismos patogênicos e é uma forma natural e satisfatória de regulação das populações de cortadeiras. Para maior eficiência do controle biológico aplicado, é necessário conhecer os aspectos geográficos e microclimáticos da região bem como as espécies vegetais cultivadas, buscando assim uma linhagem específica de

microrganismo adequado às condições e técnicas de aplicação no inseto. Entretanto, em formigas-cortadeiras o controle biológico com microrganismos se esbarra em problemas particulares como a organização social desses insetos, complexidade estrutural dos ninhos, cultivo do fungo e hábitos de limpeza dentro da colônia (Della Lucia, et al., 2014).

Diversos trabalhos têm buscado alternativas de controle de cortadeiras em conjunto a programas de Manejo Integrado de Pragas. O controle biológico por meio da utilização de fungos entomopatogênicos é uma alternativa de controle de populações de insetos que oferece um controle específico e promissor das formigas-cortadeiras (Della Lucia et al., 2014).

4.9 HABILIDADES PARA PROTEÇÃO DA COLÔNIA

As colônias de formigas-cortadeiras são uma sociedade bem-sucedida devido à sua capacidade de combinar hábitos de higiene com a complexidade da organização social. Como estratégias de higiene pode-se destacar o uso de substâncias químicas secretadas principalmente pelas glândulas metapleurais, a associação com bactérias mutualistas (*Pseudonocardia* - cultivadas no exoesqueleto de formigas do gênero *Acromyrmex*), o gerenciamento dos seus resíduos (afastando-os das câmaras cultivadoras de fungos) e comunicação química entre as operárias (Hart & Ratnieks, 2002; De Souza et al., 2006; Fernández-Marín et al., 2009, Scott et al., 2010). Os metabólitos produzidos pela bactéria mutualista *Pseudonocardia* são considerados antimicrobianos ativos contra diversos patógenos generalistas que são ameaças para o jardim de fungo e também para as operárias (Fernández-Marín et al., 2006).

O alto nível de organização e o hábito de higiene do jardim de fungo conferem a elas o sucesso de sua colônia. A divisão do trabalho por diferentes castas morfológicas mantém a homeostase dentro da colônia, fazendo com que elas sejam capazes de identificar rapidamente a introdução de patógenos ou mesmo de substratos vegetais nocivos ao fungo cultivado (Little et al. 2006; Griffiths e Hughes 2010; Mueller et al., 2010; Montoya-Lerma et al., 2012). Seu par de glândulas metapleurais secretam compostos de ação antibiótica e possui funções complexas e especializadas para proteger a colônia (Fernández-marín et al., 2006). É destacado também que a cavidade infrabucal funciona como um dispositivo complexo que filtra

e neutraliza partículas. Neste local os fragmentos do alimento, microrganismos e compostos que representam um risco potencial para a colônia, são armazenados sob a forma de "pellets" na cavidade e são eliminados como rejeitos (Della Lucia et al., 2011). Além de todos os mecanismos especializados de defesa das formigas, o fungo simbiote também possui a capacidade de desintoxicar compostos tóxicos (Dowd, 1992). Sendo assim, o desafio maior é introduzir microrganismos patogênicos na colônia que, em certas circunstâncias, podem alterar o crescimento e o desenvolvimento do fungo simbiote e dos insetos.

Os microrganismos patogênicos não são as únicas ameaças para o jardim de fungo. Se o microclima não estiver adequado para o desenvolvimento do fungo simbiote, o cultivo não será adequado para a nutrição das operárias. Então, elas investem fortemente na construção, reparação e manutenção da estrutura do ninho, podendo até deslocar seu jardim de fungo para câmaras mais adequadas (Bollazi & Roces, 2010).

O fungo cultivado demanda alta quantidade de material vegetal fresco, assim sendo, gera grandes quantidades de material degradado, que frequentemente são contaminados com fungos oportunistas potencialmente prejudiciais para o jardim. As formigas-cortadeiras se habituaram a retirar os pedaços do fungo exaurido, misturados com o material vegetal degradados e também as operárias mortas, que são depositados à parte do jardim de fungo, como forma de restringir a contaminação e multiplicação de patógenos dentro da colônia (Bot et al., 2001; Hart & Ratnieks, 2002; Scott et al., 2010; Arenas & Roces, 2016).

Os cuidados apresentados pelas colônias e a higienização exibidas por elas conferem restrições no uso de produtos com agentes patogênicos ou mesmo agentes químicos, impedindo assim que toda a colônia seja comprometida (Della Lucia et al., 2014).

4.10 INFLUÊNCIA DOS MICRORGANISMOS DOS SOLOS NAS COLÔNIAS

Os solos abrigam uma diversidade de microrganismos patogênicos ou não, e as características físicas, químicas e biológicas do solo podem interferir na relação do patógeno e do hospedeiro (Michereff et al., 2005). As formigas-cortadeiras cultivam

seu fungo simbiote em câmaras no sub-solo e além de encontrar condições controladas de temperatura e umidade, ali estão em contato íntimo com os microrganismos do solo (Sosa-Calvo et al., 2015). Assim, os ninhos das cortadeiras estão sujeitos às condições específicas de cada localidade, pois os microrganismos podem influenciar diretamente as colônias (Araújo et al., 2003). Os fungos e bactérias são os principais microrganismos que podem influenciar no desenvolvimento de formigas-cortadeiras.

Os fungos do gênero *Trichoderma* (Ascomycota: Hypocreaceae) são micoparasitas facultativos, comumente encontrados em solos ricos em matéria orgânica de diferentes regiões do mundo. Esses fungos são antagonistas de *L. gongylophorus* e o grau do antagonismo dependerá da espécie de *Trichoderma* utilizada, o fungo alvo e as condições do ambiente em que estão se desenvolvendo (Kredics et al., 2014). Alguns trabalhos avaliaram in vitro a ação antagonista de isolados de *Trichoderma* contra *L. gongylophorus*; todos os isolados testados foram capazes de antagonizar o crescimento do fungo simbiote (Ortiz & Orduz, 2001; Silva et al., 2006; do Nascimento et al., 2017). Lopez & Orduz (2003) utilizaram iscas contendo o fungo antagonista *Trichoderma* e o fungo entomopatogênico *M. anisopliae* em saúveiro, de forma isolada ou em combinado. Verificaram que houve sucesso em todos os tratamentos no controle de ninhos, num período de até 42 semanas.

Pode-se encontrar interação entre o fungo filamentosso *Escovopsis* e a colônia de formiga-cortadeira. A existência do fungo anamórfico do gênero *Escovopsis* (Ascomycota: Hypocreaceae) foi observada várias vezes e foi discutido exclusivamente pela primeira vez em 1893 por Möller. Currie et al. 1999 relataram que *Escovopsis* sp. está associado a vários gêneros de formigas attina e foi considerado um parasita especializado do fungo cultivado por esses insetos (Reynolds & Currie, 2004). Um estudo de Currie et al. (2003) forneceu evidências para a história evolutiva que *Escovopsis* compartilha com esses insetos o fungo mutualista. Essa relação com as formigas e fungo mutualista contribuiu para o aparecimento de padrões filogenéticos amplos que levaram a diferentes grupos de *Escovopsis* especializados em parasitar diferentes fungos mutualistas (Currie et al., 2003; Gerardo et al., 2006; Birnbaum e Gerardo 2016). Man et al. (2016) mostraram que o genoma de *Escovopsis* também sofreu mudanças significativas durante a evolução para ser adaptado ao

estilo de vida de micoparasita (por exemplo, genoma reduzido pela perda de genes envolvidos no metabolismo do material vegetal, quando comparado com parentes fúngicos próximos).

Apenas duas espécies do gênero *Escovopsis* são formalmente reconhecidas, *Escovopsis weberi* que foi isolado do jardim de *Atta* sp. (Muchovej & Della Lucia, 1990) e *Escovopsis aspergilloides* que foi isolado do jardim de *Trachymyrmex ruthae* (Seifert et al., 1995). Os dados disponíveis indicam que existe uma alta variação na morfologia e características genéticas entre as duas espécies, sugerindo que novas espécies deste gênero podem ser descritas no futuro próximo (Gerardo et al., 2006; Currie, 2001). Além disso, um novo gênero chamado *Escovopsioides* foi encontrado nos jardins de fungos de formigas-cortadeiras de folhas (Augustin et al., 2013).

Pouco se sabe sobre os mecanismos de parasitismo do *Escovopsis* com o hospedeiro *L. gongylophorus*, pois não parece que *Escovopsis* seja um concorrente de nutrientes do fungo mutualista. Na primeira tentativa de esclarecer a natureza deste parasitismo por Reynolds e Currie (2004), *Escovopsis weberi* apresentou o melhor crescimento na presença do fungo mutualista. Esses autores mostraram que *E. weberi* não obteve um bom desenvolvimento quando inoculado em placas de Petri contendo material vegetal como fonte de nutrientes. Além disso, por meio de ensaios de micoparasitismo, os autores documentaram a degradação das hifas do fungo mutualista antes das interações físicas com as hifas de *E. weberi*. Esses resultados levaram os autores a classificar este fungo como um micoparasita necrotrófico. Em estudo in vitro com isolados de *Escovopsis* contra o fungo simbiote, Silva et al. (2006) encontraram efeitos antagônicos do parasita e perceberam que a virulência era diferente em cada isolado.

Um estudo recente de Marfetán et al. (2015) relatou a ocorrência de estruturas de hifas especializadas por isolados de *E. weberi*, como protuberâncias semelhantes a gancho e prolongamentos com pontas para penetrar as hifas hospedeiras. Eles descobriram que os isolados capazes de produzir tais estruturas eram os mais ofensivos para o hospedeiro. Em seguida, os autores reclassificaram *Escovopsis* como um micoparasita biotrófico destrutivo ao interpretar que eles adquiriram seus

nutrientes de células vivas do fungo simbiote e que a morte do hospedeiro ocorreu após esse processo parasítico.

Vários aspectos da biologia de *Escovopsis* sp. ainda não foram conhecidos. Não se sabe sobre seu ciclo de vida ou se existe um estado teleomórfico (sexual). Além disso, o modo de transmissão entre colônias é desconhecido. Com relação a este aspecto, Currie et al. (1999) sugerem que a transmissão pode ser através de outros artrópodes que visitam ou habitam os ninhos, como os ácaros. De fato, a transmissão vertical (de colônias parentais para prole) desse fungo não foi observada.

É percebe-se que o ecossistema das formigas-cortadeiras é muito mais complexo do que o descrito inicialmente como uma coevolução das formigas, do seu fungo simbiote mutualista, de um simbiote aderido na cutícula (*Pseudonocardia*) e de um patógeno especializado (*Escovopsis*) (Currie et al., 2003). Os microrganismos do solo ou das plantas (endofíticos), que são carregadas pelas formigas como recurso alimentar, podem conter patógenos que competem com o fungo simbiote. O cultivo do fungo *L. gongylophorus* nas câmaras subterrâneas é ameaçado por vários fungos, como *Escovopsis* (Currie et al., 1999), *Syncephalastrum* (Barcoto et al., 2017) e *Trichoderma* (Rodrigues et al., 2005). Em contrapartida, as formigas inspecionam seu jardim de fungo com grande cuidado, removendo qualquer material suspeito para câmaras de resíduos (Bot et al., 2001) e também utilizam secreções químicas antimicrobianas (Fernández-Marín et al., 2006).

Uma diversidade de simbioses microbianas pode estar dentro dos ninhos das formigas. Estes simbioses cumprem diversas funções, incluindo a defesa contra patógenos ou a promoção do crescimento do fungo do jardim (por exemplo, pela fixação de nitrogênio) (Pinto-Tomáz 2009). Como alguns simbioses bacterianos de cortadeiras também podem prejudicar o crescimento do fungo mutualista, a visão unilateral das formigas e *L. gongylophorus* como parceiros mutualistas deve ser questionada (Currie, 2001). Para compreender melhor o papel ecológico dos microrganismos associados às formigas é crucial conhecer a composição química dos metabólitos secretados por cada microrganismo.

3- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aanen, D.K.; Eggleton, P.; Rouland-Lefevre, C.; Guldborg-Frøslev, T.; Rosendahl, S.; Boomsma, J.J. (2002) The evolution of fungus-growing termites and their mutualistic fungal symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(23), 14887-14892.

Alves, S. B. (1998) Controle microbiano de insetos. Fealq., 407 p.

Antunes, A.C.; Della Lucia, T.M.C.; Guedes, R.N.C. & Serrao, J.E. (2005) Abamectin-driven, alterations on queen ovaries of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* 45:163–172.

Araújo M.S., Della Lucia T.M.C., Ribeiro G.A., Kasuya M.C. (2003) Impacto da queima controlada da cana-de-açúcar na nidificação e estabelecimento de colônias de *Atta bisphaerica* Forel (Hymenoptera: Formicidae). *Neotrop Entomol* 32:685–691 . doi: 10.1590/S1519-566X2003000400021

Araújo, M.S.; Ribeiro, M.M.R.; Marinho, C.G.S.; Oliveira, M.A.; Della Lucia, T.M.C. Fundação e estabelecimento de formigueiros. (2011) In: Della Lucia, T.M.C. Formigas-cortadeiras: da Bioecologia ao manejo. Viçosa, MG, Editora UFV.

Araújo, M.S.; Rodrigues, C.A.; Oliveira, M.A.; Jesus, F.G. (2015) Controle biológico de formigas-cortadeiras: o caso da predação de fêmeas de *Atta* spp. por *Canthon virens*. *Revista de Agricultura Neotropical, Cassilândia-MS*, 2(3), p. 8–12.

Arenas, A.; Roces, F. (2016) Learning through the waste: olfactory cues from the colony refuse influence plant preferences in foraging leaf-cutting ants. *Journal of Experimental Biology*, 219(16), 2490-2496.

Augustin, J.O.; Groenewald, J.Z.; Nascimento, R.J.; Mizubuti, E.S.; 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*, 8(12), e82265.

Autuori, M. V- Número de formas aladas e redução dos sauveiros iniciais. (1950) in: Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp.- Hymenoptera-Formicidae). *Arquivos Instituto Biológico, São Paulo*. v.19, p.325-331.

Barcoto, M.O.; Pedrosa, F.; Bueno, O.C.; Rodrigues, A. (2017) Pathogenic nature of *Syncephalastrum* in *Atta sexdens rubropilosa* fungus gardens. *Pest management science*, 73(5), 999-1009.

Bento, J.M.S.; Della Lucia, T.M.C.; Muchovej, R.C.M.; Vilela, E.F. (1991) Influência da composição química e da população microbiana de diferentes horizontes do solo no estabelecimento de saúveiros iniciais de *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae) em laboratório. *Anais da Sociedade Entomologia Brasileira*. 20: 307-317.

Bettiol, W.; Ghini, R. (2005) *Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais*. Recife. *Imprensa Universitária da Universidade Federal Rural de Pernambuco*.

Birnbaum, S.L.; Gerardo, N.L. (2016) Patterns of specificity of the pathogen *Escovopsis* across the fungus-growing ant symbiosis. *188*(1), 52-65.

Bollazzi, M.; Roces, F. (2010) Control of nest water losses through building behavior in leaf-cutting ants. *Insect Soc* 57:267–273.

Bot, A.N.M.; Currie, C.R.; Hart, A.G.; Boomsma, J.J. (2001) Waste management in leaf-cutting ants. *Ethology Ecology & Evolution*, 13(3), 225-237.

Butt, T.M.; Jackson, C.; Magan, N. (2001) *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. CABI International, Wallingford.

Cerda, N. V., Tadey, M., Farji-Brener, A. G., & Navarro, M. C. (2012). Effects of leaf-cutting ant refuse on native plant performance under two levels of grazing intensity in the Monte Desert of Argentina. *Applied Vegetation Science*, 15(4), 479-487.

Bragança, M.A.L.; Tonhasca, A.J.; Moreira, D.D.O. (2002) Parasitism characteristics of two phorid fly species in relation to their host, the leaf-cutting ant *Atta laevigata* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae). *Neotropical Entomology* 31:241–244.

Bragança, M.A.L.; Tonhasca, A.J.; Della Lucia, T.M.C. (2009) Características biológicas e comportamentais de *Neodohrniphora elongata* Brown (Diptera: Phoridae), um parasitoide da saúva *Atta sexdens rubropilosa* Forel. *Revista Brasileira de Entomologia* 53:600–606.

Bragança, M.A.L. (2011) Parasitoides de formigas-cortadeiras In: DELLA LUCIA, T.M.C. Formigas-cortadeiras: da Bioecologia ao manejo. Viçosa, MG, Editora UFV. p. 321–343.

Brandão, C.R.; Mayhé-Nunes, A.J.; Sanhudo, C.E.D. (2011) Taxonomia e filogenia das formigas-cortadeiras, in: Formigas-cortadeiras – da biologia ao manejo. Viçosa, MG, Editora UFV, pp. 27–48.

Bueno, A.; Junior, J.; Junior, A.M.; Silveira, L.D. (2011) Controle biológico e manejo de pragas na agricultura sustentável. *Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Lavras*.

Currie, C.R.; Mueller, U.G.; Malloch, D. (1999) The agricultural pathology of ant fungus gardens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(14), 7998-8002.

Currie, C. R., & Stuart, A. E. (2001). Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 268(1471), 1033-1039.

Currie, C.R.; Wong, B.; Stuart, A.E.; Schultz, T.R.; Rehner, S.A.; Muller, U.G.; Sung, G.H.; Spatafora, J.W.; Straus, N.A. (2003) Ancient tripartite coevolution in the attine ant-microbe symbiosis. *Science* 299: 386–388.

Della Lucia, T.M.C. (1993) As formigas-cortadeiras. Viçosa, MG: Sociedade de investigações florestais.

Della Lucia, T.M.C.; Anjos, N.; Zanuncio, J.C. (2000) Controle de formigas cortadeiras. Viçosa, MG: CPT, p. 52.

Della Lucia TMC (2011) Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo. da UFV.

Della Lucia, T.M.C.; Souza, D.J. (2011) Importância e história de vida das formigas-cortadeiras. In: Della Lucia, T.M.C. Formigas-cortadeiras: da Bioecologia ao manejo. Viçosa, MG, Editora UFV.

Della Lucia, T.M.C.; Gandra, L.C.; Guedes, R.N. (2014) Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. *Pest management science*, 70(1), 14-23.

- Del Toro, I.; Ribbons, R.R.; Pelini, S.L. (2012) The little things that run the world revisited: a review of ant-mediated ecosystem services and disservices (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecological News*, 17, 133-146.
- De Souza, D.J.; Della Lucia, T.M.C.; Barbosa, L.C.A. (2006) Discrimination between workers of *Acromyrmex subterraneus molestans* from monogynous and polygynous colonies. *Braz Arch Biol Technol* 49:277–285.
- Diamond, J. (2002) Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature*, 418(6898), 700-707.
- Diehl-Fleig, E.; Rocha, E.S. (1998) Escolha do solo por fêmeas de *Acromyrmex striatus* (Roger) (Hymenoptera: Formicidae) para construção do ninho. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 27: 41-45.
- Dijkstra, M.B.; Boomsma, J.J. (2003) *Gnamptogenys hartmani* Wheeler (Ponerinae: Ectatommini): an agro-predator of *Trachymyrmex* and *Sericomyrmex* fungus-growing ants. *Naturwissenschaften*, 90(12), 568-571.
- do Nascimento, M.O., Sarmiento, R.A.; dos Santos, G.R.; de Oliveira, C.A.; de Souza, D.J. (2017) Antagonism of *Trichoderma* isolates against *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. *Journal of Basic Microbiology*. 57: 699–704.
- Dostál, P.; Březnová, M.; Kozlíčková, V.; Herben, T.; Kovář, P. (2005) Ant-induced soil modification and its effect on plant below-ground biomass. *Pedobiologia*, 49(2), 127-137.
- Dowd, P.F. (1992) Insect fungal symbionts: a promising source of detoxifying enzymes. *Journal of Industrial Microbiology*. 9:149–161.
- Elizalde, L. & Folgarait, P.J. (2012) Behavioral strategies of phorid parasitoids and responses of their hosts, the leaf-cutting ants. *Journal Insect Science* 12:135.
- Farji-Brener, A.G.; Ghermandi, L. (2000) Influence of nests of leaf-cutting ants on plant species diversity in road verges of northern Patagonia. *Journal of Vegetation Science*, 11(3), 453-460.

- Farji-Brener, A.G., Werenkraut, V. (2014) A meta-analysis of leaf-cutting ant nest effects on soil fertility and plant performance. *Ecology Entomology*. 40:1-8.
- Farrell, B.D.; Sequeira, A.S.; O'Meara, B.C.; Normark, B.B.; Chung, J.H.; Jordal, B.H. (2001) The evolution of agriculture in beetles (Curculionidae: Scolytinae and Platypodinae). *Evolution*, 55(10), 2011-2027.
- Fernández-Marín, H.; Zimmerman, J.K.; Rehner, S.A.; Wcislo, W.T. (2006) Active use of metapleural glands by ants in controlling fungal infection. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 273:1689–1695.
- Fernández-Marín, 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. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 276:2263–2269.
- Futuyma, D.J. (2009) Coevolution. *In: Encyclopedia of Insects (Second Edition)* (175-179).
- Garrettson, M.; Stetzel, J.F.; Halpern, B.S.; Hearn, D.J.; Lucey, B.T.; Mckone, M.J. (1998) Diversity and abundance of understory plants on active and abandoned nests of leaf-cutting ants (*Atta cephalotes*) in a Costa Rican rain forest. *Journal Tropical Ecology*, 14, 17-26.
- Gerardo, N.M.; Jacobs, S.R.; Currie, C.R.; Mueller, U.G. (2006) Ancient host-pathogen associations maintained by specificity of chemotaxis and antibiosis. *PLoS Biol* 4:e235.
- Griffiths HM & Hughes WOH (2010) Hitchhiking and the removal of microbial contaminants by the leaf-cutting ant *Atta colombica*. *Ecological Entomology* 35:529–537.
- Guillade, A. & Folgarait, P.J. (2011) Life history traits and parasitism rates of four phorid species (Diptera: Phoridae), parasitoids of *Atta vollenweideri* leaf-cutter ants (Hymenoptera: Formicidae) in Argentina. *Journal Econ Entomology* 104:32–40.
- Hart AG, Ratnieks FLW (2002) Waste management in the leaf-cutting ant *Atta colombica*. *Behav Ecol* 13:224–231

Jackson, T.A., Alves, S.B., Pereira, R.M. (2000) Success in biological control of soil-dwelling insects by pathogens and nematodes. In: Gurr, G., Wratten, S. (eds) Biological control: measures of success. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands, pp 271–296.

Kost, C.; de Oliveira, E.G.; Knoch, T.A.; Wirth, R. (2005) Spatio-temporal permanence and plasticity of foraging trails in young and mature leaf-cutting ant colonies (*Atta* spp.). *Journal Tropical of Ecology* 21:677–688.

Kost, C.; Tremmel, M.; Wirth, R. (2011) Do leaf cutting ants cut undetected? Testing the effect of ant-induced plant defences on foraging decisions in *Atta colombica*. *PLoS ONE* 6:e22340.

Little, A.E.F.; Murakami, T.; Mueller, U.G.; Currie, C.R. (2006) Defending against parasites: fungus-growing ants combine specialized behaviours and microbial symbionts to protect their fungus gardens. *Biol Lett.* 2:12–16.

Loeck, A. E.; Pierobom, C. R.; Gusmão, L. G. D.; Afonso, A. P. (2004) Growth of symbiont fungi of some higher attine ants in mineral medium. *Ciência Rural*, 34(1), 79-82.

Man, T.J.de; Stajich, J.E.; Kubicek, C.P.; Teiling, C.; Chenthamara, K.; Atanasova, L.; Bozick, B.A. (2016) Small genome of the fungus *Escovopsis weberi*, a specialized disease agent of ant agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(13), 3567-3572.

Marinho, C.G.S.; Della Lucia, T.M.C.; Picanço, M.C. (2006) Fatores que dificultam o controle das formigas cortadeiras. *Bahia Agrícola*, v. 7, p. 18-21.

Marfetán, J.A.; Romero, A.I.; Folgarait, P.J. (2015) Pathogenic interaction between *Escovopsis weberi* and *Leucoagaricus* sp.: mechanisms involved and virulence levels. *Fungal Ecology* 17: 52–61.

Mayer, V.E.; Voglmayr, H. (2009) Mycelial carton galleries of *Azteca brevis* (Formicidae) as a multi-species network. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, rspb20090768.

Michereff SJ, Andrade D, Menezes M (2005) Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais. Universidade Federal e Rural de Pernambuco

Mendonça A de L, da Silva CE, de Mesquita FLT, et al (2009) Antimicrobial activities of components of the glandular secretions of leaf cutting ants of the genus *Atta*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 95:295–303 . doi: 10.1007/s10482-009-9312-0

Meyer, S.T.; Neubauer, M.; Sayer, E.J.; Leal, I.R.; Tabarelli, M.; Wirth, R. (2013) Leaf-cutting ants as ecosystem engineers: topsoil and litter perturbations around *Atta cephalotes* nests reduce nutrient availability. *Ecol Entomol*, 38: 497–504. doi:10.1111/een.12043

Michereff, S.J.; Andrade, D.E.G.T.; Menezes, M. (2005) Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais. Universidade Federal e Rural de Pernambuco.

Moutinho, P.; Nepstad, D.C.; Davidson, E.A. (2003) Influence of leaf-cutting ant nests on secondary forest growth and soil properties in Amazonia. *Ecology*, 84(5), 1265-1276.

Montoya-Lerma J, Giraldo-Echeverri C, Armbrecht I, Farji-Brener A & Calle Z (2012) Leaf-cutting ants revisited: Towards rational management and control. *International Journal of Pest Management* 58:225–247.

Muchovej, J.J.; Della Lucia, T. M. C. (1990) *Escovopsis*, a new genus from leaf-cutting ant nests to replace *Phialocladus nomem invalidum*. *Mycotaxon*, 37(1): 191–195.

Mueller, U.G. (2002) Ant versus fungus versus mutualism: ant-cultivar conflict and the deconstruction of the attine ant-fungus symbiosis. *The American Naturalist*, 160(4), 67-98.

Mueller UG, Poulin J, Adams RMM (2004) Symbiont choice in a fungus-growing ant (Attini, Formicidae). *Behav. Ecol.* 15:357–64

Mueller, U.G.; Gerardo, N.M.; Aanen, D.K.; Six, D.L.; Schultz, T.R. (2005) The evolution of agriculture in insects. *Annual Review Ecology Evolution and Systematics*, 36, 563-595.

- Mueller, U.G.; Scott, J.J.; Ishak, H.D., Cooper, M.; Rodrigues, A. (2010) Monoculture of leafcutter ant gardens. *PLoS One*, 5(9), e12668.
- Parra, J.R.P.; Botelho, P.S.M.; Correa-Ferreira, B.S.; Bento, J.M.S. (eds.), (2002) Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. Editora Manole, São Paulo. 609p.
- Pinto-Tomás, A.A., Anderson, M.A., Suen, G., Stevenson, D.M., Chu, F.S., Cleland, W.W.; Currie, C.R. (2009). Symbiotic nitrogen fixation in the fungus gardens of leaf-cutter ants. *Science*, 326 (5956), 1120-1123.
- Pirk, G.I.; Farji-Brener, A.G. (2013) Can the nutrient-rich soil patches created by leaf-cutting ants favor plant compensation for foliar damage? A test of the compensatory continuum hypothesis. *Plant ecology*, 214(8), 1059-1070. doi:10.1007/s11258-013-0231-9
- Richard, F.J.; Mora, P. (2005) Digestive capacities of leafcutting ants and the contribution of their fungal cultivar to degradation of plant material. *Journal of Comparative Physiology B*. 175:297–303.
- 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*, 96(5), 955-959.
- Rodrigues, A.; Pagnocca, F.C.; Bueno, O. C.; Pfenning, L.H.; Bacci Jr, M. (2005) Assessment of microfungi in fungus gardens free of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology*, 46(2), 329-334.
- Rousk, J.; Brookes, P. C.; Bååth, E. (2009) Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(6), 1589-1596.
- Santos AV, Dillon RJ, Dillon VM, et al (2004) Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *FEMS Microbiol Lett* 239:319–323
- Schultz, T.R.; Meier, R. (1995) A phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. *Systematic*

Entomology. 20:337–70

Schultz, T.R.; Brady, S.G. (2008) Major evolutionary transitions in ant agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105: 5435–5440.

Scott JJ, Budsberg KJ, Suen G, et al (2010) Microbial community structure of leaf-cutter ant fungus gardens and refuse dumps. *PLoS One* 5:e9922

Seifert, K. A., Samson, R. A., & Chapela, I. H. (1995). *Escovopsis aspergilloides*, a rediscovered hyphomycete from leaf-cutting ant nests. *Mycologia*, 407-413.

Sen R, Ishak HD, Estrada D, et al (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* 106:17805–17810

Silva, A., Bacci, M., Pagnocca, F.C., Bueno, O.C.; Hebling, M.J.A. (2006) Starch metabolism in *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. *Microbiological research*, 161(4), 299-303.

Sosa-Calvo, J.; Jesovnik, A.; Okonski, E.; Schultz, T.R. (2015). Locating, collecting, and maintaining colonies of fungus-farming ants (Hymenoptera: Myrmicinae: Attini). *Sociobiology*, 62 (2), 300-320.

Sousa-Souto, L.; Sternberg, L. Ciclagem de nutrientes por formigas cortadeiras, in: Terezinha Maria Castro Della Lucia. (2011) *Formigas-Cortadeiras da Bioecologia ao Manejo*, Viçosa, Editora UFV.

Sousa-Souto, L.; Guerra, M.B.B.; Ambrogi, B.G.; Pereira-Filho, E.R. (2012) Nest refuse of leaf-cutting ants mineralize faster than leaf fragments: Results from a field experiment in Northeast Brazil. *Applied Soil Ecology* 61, 131-136.

Stamford, N. P., Stamford, T. L., Andrade, D. E. G. T., & Michereff SJ (2005) Microbiota dos solos tropicais. In: *Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais*. UFRPE, Recife

Townsend, Colin R.; Begon, Michael; Harper, John L. (2010) *Fundamentos em Ecologia*. 3ª edição. Porto Alegre: Artmed.

Van Gils, H.A.J.A.; Gaigl, A.; Gómez, L.E. (2010) The relationship between soil variables and leafcutter ant (*Atta sexdens*) nest distribution in the Colombian Amazon. *Insectes Sociaux*, 57 (4), 487-494.

Van Gils, H.A.J.A. (2011) Los factores ambientales em relación com La hormiga arriera (*Atta sexdens*) em el sur Del trapecio amazónico. Dissertação, Faculdade de Agronomia, Universidade Nacional da Colômbia, Colômbia.

Van Gils, H.A.J.A.; Vanderwoude, C. (2012) Leafcutter ant (*Atta sexdens*) (Hymenoptera: formicidae) nest distribution responds to canopy removal and changes in micro-climate in the southern colombian amazon. *Florida Entomologist*, 95 (4), 914-921.

Vasconcelos, H.L.; Vieira-Neto, E.H.M.; Mundim, F.M.E; Bruna, E.M. (2006) Roads Alter the Colonization Dynamics of a Keystone Herbivore in Neotropical Savannas. *Biotropica*, 38, p.661–665.

Vieira, H.E.; Vasconcelos, H.L. (2010) Developmental changes in factors limiting colony survival and growth of the leaf-cutters ants *Atta laevigata*. *Ecography*, 3, 538-544.

Weber, N.A. (1958) Evolution in fungus-growing ants. In: Proceedings of the Tenth International Congress of Entomology. 2, 459-473).

Weber, N.A. (1972) The Attines: the fungus-culturing ants. *American Scientist*, 60, 448-456.

Witte, V.; Maschwitz, U. (2008) Mushroom harvesting ants in the tropical rain forest. *Naturwissenschaften*, 95(11), 1049-1054.

Wohlenberg, E. V.; Reichert, J. M.; Reinert, D. J.; Blume, E. (2004) Dinâmica da agregação de um solo franco-arenoso em cinco sistemas de culturas em rotação e em sucessão. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 28(5), 891-900.

Zanetti, R.; Carvalho, G.A.; Santos, A.; Silva, A.S.; Godoy, M.S. (2002) Manejo integrado de formigas cortadeiras. Lavras: UFLA, 16p.

Zanetti, R.; Zanuncio, J.C.; Santos, J.C.; da Silva, W.L.P.; Ribeiro, G.T.; Lemes, P.G. (2014) An overview of integrated management of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in Brazilian forest plantations. *Forests*, 5(3), 439-454.

Zanuncio, J.C.; Sossai, M.F.; Oliveira, H.N. De; Zanuncio Junior, J.S. (2002) Influência das iscas formicidas Mirex-S Max e Blitz na paralisação de corte e no controle de *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). *Revista Árvore*, 26 (2), p. 237-242.

CAPÍTULO 1 – A influência do solo no desenvolvimento de colônias incipientes de *Atta sexdens* (Linnaeus)

Mariela Otoni do Nascimento^{1*}, Cléia Almeida de Oliveira¹, Danival José de Souza¹

¹ Gurupi University *Campus*, Federal University of Tocantins, Gurupi, Tocantins, Brazil.

***Correspondence:** Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, *Campus* Universitário de Gurupi, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, Tocantins, 77410-530, Brasil. Email: marielaotoni@uft.edu.br

Short title: Influência do solo no desenvolvimento de colônias de formigas-cortadeiras.

Keys words: *Atina*, *formigas-cortadeiras*, *fundação de ninhos*, *mortalidade de colônias*.

Acknowledgements

The authors are grateful to the “National Counsel of Technological and Scientific Development”(CNPq) for financial support (Research Project 403708-2013-3).

- Artigo submetido ao periódico “Insectes Sociaux” em 15 de Junho 2018

Resumo

Ninhos de formigas-cortadeiras são construídos no sub-solo e ficam sujeitos às condições específicas desse espaço. Considerando que existem áreas com alta densidade de ninhos de formigas-cortadeiras e outras áreas em que não são encontrados ninhos, esse trabalho procurou esclarecer as preferências por locais de nidificação dessas formigas. Este trabalho objetivou comparar o desenvolvimento de colônias de *Atta sexdens* (Linnaeus) em contato com dois tipos de solo: (i) de área utilizada para nidificação e (ii) de área não utilizada para nidificação de formigas-cortadeiras; os dois tipos foram divididos em solos autoclavados e não autoclavados. Foram conduzidos dois experimentos em laboratório. No experimento I, fêmeas recém-fecundadas fundaram a colônia em pote com gesso e, após 106 dias, entraram em contato com solo. A produção de rejeitos foi quantificada semanalmente em cada colônia e o jardim de fungo pesado no início e final do experimento. No experimento II, as fêmeas recém-fecundadas fundaram suas colônias diretamente no solo, sendo que, neste caso, o experimento encerrou-se após 26 dias da abertura do olheiro. A taxa de mortalidade de colônias, após 106 dias da revoada e se desenvolvendo em pote com gesso, foi de 28,6%. Quando se desenvolveram desde o início em contato com o solo, a taxa de mortalidade elevou-se a 67,2 %, após 90. A produção de rejeitos das colônias que entraram em contato com solo de área sem ninhos, autoclavado e não autoclavado, foram estatisticamente diferentes. Os resultados corroboram que as colônias incipientes de *A. sexdens* sofrem forte pressão seletiva de microrganismos do solo no momento da fundação. No entanto, após o surgimento da força operária, mecanismos de defesa imune social, provavelmente, garantem o desenvolvimento da colônia a despeito da presença de microrganismos patogênicos no solo dos ninhos.

Palavras-chaves: Attina, formigas-cortadeiras, fundação de ninhos, mortalidade de colônias.

Abstract

Nests of leaf-cutting ants are built in the subsoil and are subject to the specific conditions of this space. Since it is observed that there are areas with high density of nesting leaf-cutting ants and other areas where nests are not found, this work aimed to study the preferences for nesting sites of these ants. This study compared the development of colonies of *Atta sexdens* (Linnaeus) in contact with two types of soil: (i) area used for nesting and (ii) area not used for nesting. The two soils were divided into autoclaved and non-autoclaved and two experiments were conducted in the laboratory. In experiment I, newly fertilized females founded a colony in a pot with gypsum and had contact with the soil after 106 days. The production of residues was quantified weekly in each colony and the fungus garden weighed at the beginning and end of the experiment. In experiment II, the newly fertilized females founded their colonies directly on the soil; here, the experiment ended twenty-six days after nest entrance opening. The mortality rate of colonies developing in pots with gypsum, 106 days after the nuptial flight, was 28.6 %. When they developed in contact with the soil from the outset, the mortality rate increased to 67.2 % after ninety days. Production of residues by colonies that contacted soil of areas without nests was statistically different, whether the soil was autoclaved or not. The results corroborate that incipient colonies of *A. sexdens* undergo strong selective pressure from soil microorganisms at the time of foundation. However, after the emergence of the worker force, social immune defense mechanisms must likely guarantee the development of the colony, despite the presence of pathogenic microorganisms in the soil of the nests.

Keywords: Attina, leaf-cutting ants, nesting, colony mortality.

Introdução

O cultivo do próprio alimento não é exclusivo dos seres humanos, pois alguns insetos desenvolveram a habilidade de cultivar fungo como fonte de nutrição há milhões de anos (Schultz and Brady 2008). A fungicultura é encontrada em três ordens de insetos: Hymenoptera – nas formigas cultivadoras de fungo da subtribo Attina, Blattodea - cupins da família Termitidae, subfamília Macrotermitinae e Coleópteros – conhecidos como besouros de ambrosia (Mueller et al. 2005; Inward et al. 2007). O fungo é cultivado por esses insetos em ninhos localizados em câmaras no subsolo, galerias na madeira ou mesmo sob substratos no solo (Mueller et al. 2005; Perna and Theraulaz 2017). A construção do ninho assegura às colônias condições microclimáticas controladas (por exemplo, temperatura e umidade) (Sosa-Calvo et al. 2015; Gouttefarde et al. 2017; Vélé and Holuša 2017) e também minimiza contaminações por microrganismos patogênicos (Karlik et al. 2016).

Como forma de restringir a contaminação e multiplicação de microrganismos patogênicos dentro da colônia, os insetos cultivadores de fungos apresentam um repertório variado de comportamentos higiênicos como a remoção de partes mortas e decompostas do fungo simbiote, bem como de operárias mortas e de outros contaminantes (Bot et al. 2001; Biedermann and Taborsky 2011; Sun and Zhou 2013; Arenas and Roces 2016; Katariya et al. 2017). Em colônias de formigas-cortadeiras, observa-se que as operárias mortas e pedaços do fungo cultivado, misturados com o material vegetal degradados, são retirados e depositados fora do jardim de fungo (Bot et al. 2001; Hart and Ratnieks 2002; Scott et al. 2010), em câmaras específicas para esse fim ou nas partes externas do ninho.

Embora exista grande diversidade de bactérias, leveduras e fungos filamentosos associados ao jardim de fungo das formigas-cortadeiras (Van Borm et al. 2002; Santos et al. 2004; Carreiro et al. 2004; Scott et al. 2010), a densidade desses microrganismos é mantida em equilíbrio nas colônias saudáveis (Currie and Stuart 2001). A função que cada microrganismo desempenha na simbiose estabelecida com a formiga-cortadeira é variada, sendo que alguns podem auxiliar na degradação de polissacarídeos (Somera et al. 2015), na fixação de nitrogênio (Pinto-Tomás et al. 2009) e na produção de substâncias antimicrobianas (Barke et al. 2011), dentre outras.

Características físicas, químicas e biológicas dos solos podem interferir na composição da comunidade de microrganismos e nas relações ecológicas entre eles (Michereff et al. 2005). Uma vez que são construídos no sub-solo, os ninhos de formigas-cortadeiras estão sujeitos às condições específicas desse espaço. A microbiota do solo exerce papel direto nas colônias e é capaz de limitar o desenvolvimento e a sobrevivência das mesmas (Araújo et al. 2003). Assim sendo, a escolha do local de fundação dos ninhos é fator decisivo no sucesso da vida das formigas-cortadeiras, sendo esse um comportamento espécie-específico. Rainhas de *Atta laevigata* Smith preferem áreas abertas à beira de estradas em vez de áreas da vegetação adjacente (Vasconcelos et al., 2006). Os ninhos de *A. sexdens* são construídos em áreas limpas, porém estão abrigados da insolação direta (Van Gils et al., 2010; Van Gils and Vanderwoude, 2012). Em laboratório, Bento et al. (1991) observaram que *A. laevigata* prefere solos pobres em nutrientes e com baixa densidade microbiana para fundação do ninho. Diehl-Fleig & Rocha (1998), demonstraram que *Acromyrmex striatus* Roger rejeitou solo fértil para fundação do ninho, preferindo primeiramente solos arenosos e depois argilosos.

Considerando que existem áreas com alta densidade de ninhos de formigas-cortadeiras e outras áreas em que não são encontrados ninhos, esse trabalho procurou esclarecer as preferências por locais de nidificação dessas formigas. Sendo assim, objetivou-se avaliar o desenvolvimento de colônias incipientes de *A. sexdens* em contato com solo de área utilizada para nidificação e solo de área não utilizado para nidificação de formigas-cortadeiras.

Material e métodos

Foram conduzidos dois experimentos em laboratório em dois anos consecutivos, em sala climatizada com temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa do ar de 80 ± 5 %. No primeiro, as fêmeas recém-fecundadas fundaram suas colônias em potes de plástico de 250 mL com uma camada de 1 cm de gesso. Após 106 dias, as colônias foram colocadas em contato com o solo com o auxílio de uma espátula. No segundo ensaio, as fêmeas recém-fecundadas fundaram suas colônias diretamente no solo. Os solos foram coletados aproximadamente 15 dias antes da montagem dos experimentos e foram mantidos úmidos e armazenados em sala climatizada aguardando a coleta de fêmeas fecundadas. Logo após a coleta de cada

solo, foram retiradas amostras e encaminhadas para o laboratório a fim de se quantificar o número de unidades formadoras de colônias (UFC.g⁻¹) de fungos filamentosos por grama de solo. No segundo ensaio, houve também a caracterização física e química do solo realizada pelo Laboratório Sellar, Gurupi- TO.

Coleta dos solos

Para utilização no experimento I, foram coletados solos de duas áreas no *Campus* Universitário de Gurupi, Universidade Federal do Tocantins (UFT), no mês de fevereiro de 2014. Cinco amostras de cada solo foram coletadas na profundidade de 0-20 cm e misturadas, formando assim uma amostra composta. A primeira amostra de solo foi coletada a uma distância de 7 metros do olheiro principal de um saueiro de *A. sexdens*, denominada de PN1 (Presence of nest 1). A segunda amostra de solo foi coletada em área de fragmento de floresta do Bioma Cerrado “Cerradão”, sem a presença de saueiro, com dossel fechado e densa camada de serapilheira denominado de AN1 (Absence of Nest 1). Averiguou-se a ausência de ninhos de formigas-cortadeiras num raio de 200 metros.

Para utilização no experimento II, foram coletados solos de duas áreas próximas à cidade de Gurupi, no mês de novembro de 2015 (início do período chuvoso, alguns dias antes voo nupcial). Em ambos os solos, foram coletadas amostras em duas profundidades, de 0-10 cm e 10-20 cm. O primeiro solo foi coletado a uma distância de um metro do olheiro principal de um saueiro, denominado de PN2 (Presence of nest 2). O outro solo foi coletado em área de fragmento de floresta do Bioma Cerrado “Cerradão”, sem a presença de saueiros, com dossel fechado e densa camada de serapilheira denominado de AN2 (Absence of Nest 2). Averiguou-se a ausência de ninhos de formigas-cortadeiras num raio de 200 metros. As amostras compostas de cada profundidade dos solos PN2 e AN2 foram colocadas cada uma em um pote de plástico com capacidade de 750 mL. Cada amostra de profundidade de solo diferente preenchia 10 cm de altura do pote. Os potes de cada solo e de cada profundidade foram sobrepostos da seguinte maneira: o pote superior, com o fundo removido, contendo o solo da profundidade de 0-10 cm e o pote inferior, contendo o solo da profundidade de 10-20 cm. Ao final, formaram-se dois conjuntos de potes sobrepostos que se conectavam, para cada solo (Figura 1).

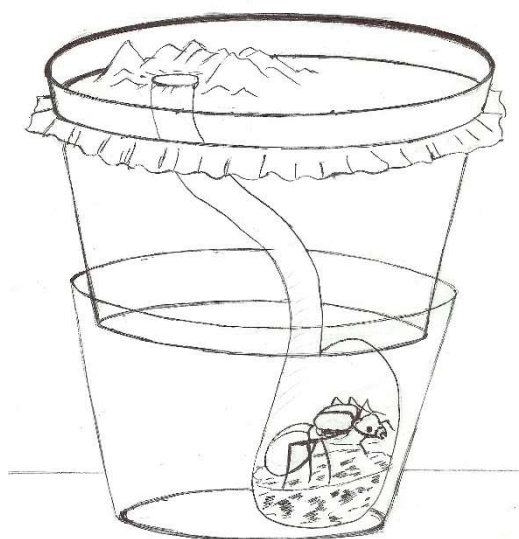


Figura 1- Esquema da montagem dos potes com solos, utilizados no experimento II.

Experimento I - Desenvolvimento de colônias no gesso

Fêmeas recém-fecundadas de *A. sexdens* (n= 56) foram coletadas durante revoada ocorrida no dia 07 de novembro de 2013, no *Campus* Universitário de Gurupi. As fêmeas foram individualizadas em potes plásticos de 200 mL (6 x 8 x 8) cm contendo 1 cm de gesso no fundo, com a função de manter o recipiente úmido, e a tampa perfurada para permitir a ventilação. Os potes foram acondicionados em escotofase total. Após a emergência das primeiras operárias, foram oferecidas folhas de *Mangifera indica* Linnaeus, *Citrus* sp. e *Tecoma stans* (L.) Kunth e o fotoperíodo foi alterado para 12:12 (Luz: Escuro).

Parte das duas amostras de solos coletados, como especificado acima, foi autoclavada por 20 minutos com a finalidade de diminuir a quantidade de fungos filamentosos. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com esquema fatorial 4x1, com 9 repetições. Os tratamentos foram: PN1 natural e PN1 autoclavado, AN1 natural e AN1 autoclavado. As colônias com 106 dias de desenvolvimento foram transferidas cuidadosamente para potes plásticos de 250 mL, com auxílio de uma espátula estéril, contendo aproximadamente 35 g de solo no fundo do pote. As colônias foram selecionadas aleatoriamente, sendo nove colônias (repetições) para cada tratamento. O pote contendo solo foi conectado a outro pote plástico de 200 mL por meio de um tubo de 19 mm de diâmetro. O pote menor foi destinado à arena de forrageamento e depósito de rejeitos da colônia. A umidade foi mantida por meio de

um algodão molhado sobre a tampa do pote com o solo. A cada sete dias, durante 13 semanas, pesou-se em balança analítica a produção de rejeitos e foi registrado o número de operárias mortas. O jardim de fungo, que é uma mistura de micélio do fungo simbionte com material vegetal, foi pesado no início e final do experimento para avaliar o desenvolvimento da colônia.

Experimento II - Desenvolvimento de colônias no solo

As fêmeas recém-fecundadas foram coletadas no dia 26 de novembro de 2015 e colocadas em potes contendo o solo PN2 (n=32) e o solo AN2 (n=32). Os potes foram acondicionados em escotofase total, e observados diariamente e descartados aqueles com fêmeas mortas antes da escavação da primeira câmara. Foi calculado o tempo médio de abertura do olheiro nos dois solos. Após a abertura do olheiro pelas primeiras operárias que emergiram na colônia, foram fornecidas folhas de *M. indica* Linnaeus, *Citrus* sp. e *T. stans* (L.) Kunth e o fotoperíodo foi alterado para 12:12 (Luz: Escuro). O experimento foi finalizado após 26 dias da abertura do olheiro. A massa fresca do jardim de fungo (em gramas), o número de operárias, pupas e larvas foram medidos a fim de avaliar o desenvolvimento das colônias.

Quantificação de fungos filamentosos

Foi utilizado o método de diluição decimal seriada para contagem de UFC.g⁻¹ de fungos filamentosos conforme descrito por Nascimento et al. (2017). Para isso, foi diluído 1g de solo em 9 mL de solução salina 0,9% (p/v) estéril e agitado em aparelho vórtex por 10 minutos. Foi transferido 0,1 mL dessa solução para placas de Petri contendo meio batata dextrose ágar (BDA) + Cloranfenicol (150 mg/L). As placas permaneceram em escotofase total, temperatura de 25±1 °C e no sétimo dia contadas as UFC.

Análises estatísticas

No experimento I as médias do peso de rejeitos e a massa fresca do jardim de fungo (g) em cada tratamento foram submetidas à ANOVA, seguido por teste de comparações múltiplas – teste de Tukey. No experimento II, as médias do peso do jardim de fungo e número de adultos, larvas, pupas e tempo médio de abertura do olheiro foram submetidos ao teste ANOVA, seguido por teste de comparações

múltiplas quando necessário. As taxas de mortalidade de colônias nos dois testes foram analisadas pelo teste de comparação de proporções de duas amostras, utilizando o teste Qui-quadrado de Pearson. As análises foram feitas utilizando o programa Action Stat versão 3.2.60.1118, sendo considerado um nível de significância de 5%.

Resultados

Observou-se que, no solo de área sem ninhos, havia maior valor de UFC.g⁻¹ de fungos filamentosos, no primeiro e no segundo experimento (Tabelas 1 e 2). Após autoclavagem do solo no primeiro experimento, ocorreu decréscimo do valor de UFC.g⁻¹ de fungos filamentosos de 13,6% e 24,8%, no solo com ninho e no solo sem ninho, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1- Número de UFC.g⁻¹ por grama de solo de fungos filamentosos no solo do experimento I.

	Unidade	Presença de ninhos	Presença de ninhos (autoclavado)	Ausência de ninhos	Ausência de ninhos (autoclavado)
Fungos filamentosos	UFC	1.33 x 10 ³	1.15 x 10 ³	4.16 x 10 ³	3.13 x 10 ³

Os solos do experimento II apresentavam acidez elevada nas duas áreas. A partir da análise granulométrica, os solos foram classificados como textura argilosa e textura média (Solos 2013), respectivamente em área com ninhos e área sem ninhos (Tabela 2).

Tabela 2 – Características físicas e químicas do solo e número de UFC.g⁻¹ de fungos filamentosos do solo no experimento II.

	Unidade	Presença de ninho 2	Ausência de ninho 2
pH (CaCl ₂)	-	4.1	4.2
M.O.	dag.kg ⁻¹	1.8	1.9

P (mehlich)	mg.dm ⁻³	2.4	3.9
K		0.3	0.2
Ca	cmol _c .dm ⁻³	0.3	0.6
Al		0.5	0.2
Fe		145	60
Zn		0.7	0.2
Mn	mg.dm ⁻³	2.8	11
Cu		0.7	0.4
Argila		360	160
Silte	g.kg ⁻¹	38	38
Areia		602	802
Fungos filamentosos	UFC	1.66 x 10 ³	2.40 x 10 ³

Taxa de mortalidade das colônias

No experimento I, 16 colônias morreram (28,6%) após 106 dias em potes com gesso (Figura 2). Quando as colônias foram colocadas em contato com o solo nos quatro tratamentos e avaliadas durante 13 semanas, foi então observada a morte de rainhas nos seguintes tratamentos: AN1 natural, PN1 natural e PN1 autoclavado. Ao fim do experimento, após seis meses da coleta de fêmeas fecundadas, somaram-se 19 colônias mortas (33,9%).

No experimento II, foi observada uma taxa de mortalidade de 43 colônias nos dois tratamentos (67,2%), aproximadamente 90 dias após a coleta de fêmeas fecundadas. Foi utilizado o teste de qui-quadrado de Pearson para comparar a taxa de proporção de sobrevivência das colônias que se desenvolveram no solo com

ninhos e solo sem ninhos, verificou-se então que não houve diferença na proporção de sobrevivência das colônias entre os dois solos ($\chi^2= 1,77$; Df= 1; $P=0,18$) (Figura 3). Em seguida, foi também comparada a proporção de sobrevivência entre as colônias que desenvolveram no gesso e as colônias que se desenvolveram diretamente no solo. Verificou-se então que não houve diferença na taxa de sobrevivência das colônias entre os dois experimentos ($\chi^2= 0,25$; Df= 1; $P=0,61$) (Figura 2).

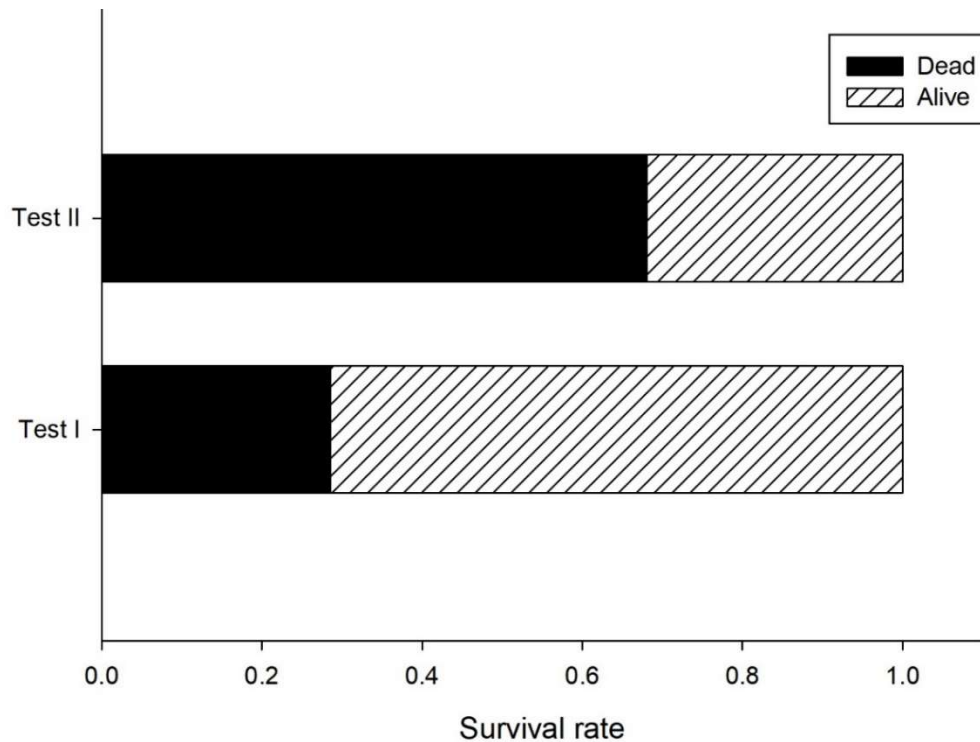


Figura 2- Taxa de sobrevivência de colônias. Teste I – colônias desenvolvendo sobre o gesso e Teste II – colônias se desenvolvendo diretamente no solo. ns= não significativo ao nível de 5%, pelo teste de Qui-quadrado de Pearson.

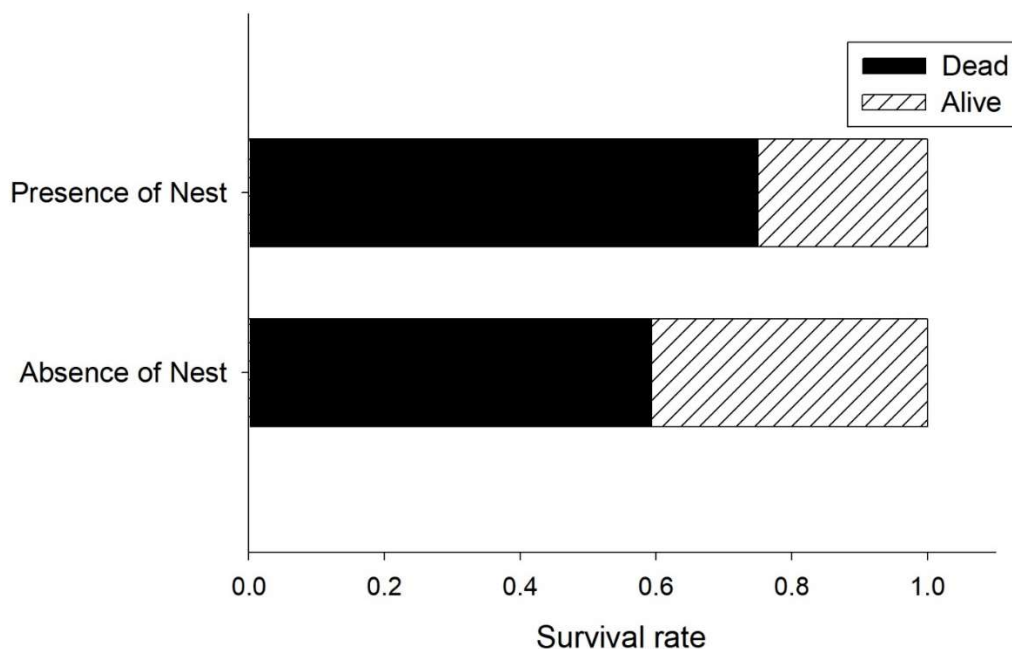


Figura 3- Taxa de sobrevivência de colônias que se desenvolveram em solo de área sem ninhos e solo de área com ninhos, após 90 dias no teste II.

Avaliação do experimento I e experimento II

No primeiro experimento, após as colônias serem colocadas em contato com o solo, verificou-se que não houve forrageamento pelas operárias, na primeira e segunda semana. Inicialmente as operárias se ocuparam da remoção do solo. Quantificou-se o solo que as operárias retiraram juntamente com os rejeitos. Com este comportamento, o peso médio de rejeitos registrado nas duas primeiras semanas em todos os tratamentos foi maior que nas demais semanas. Por isso, o peso dos rejeitos das duas primeiras semanas do experimento foi desconsiderado.

Assim, avaliando a produção de rejeitos pelas colônias, em todos os tratamentos, verificou-se que a média diminuiu até a nona semana. Posteriormente, houve um aumento gradativo até o final do experimento, conforme observado na Figura 4. A comparação das médias de produção de rejeitos entre os tratamentos mostrou diferença significativa ($F_{3,30} = 7,37$; $P < 0,001$), sendo que no tratamento AN1 houve maior produção de rejeitos (531,83 mg), seguido pelos tratamentos PN1 autoclavado (363,41 mg), PN1 (356,48 mg) e AN1 autoclavado (233,52 mg). As comparações múltiplas das médias, pelo teste de Tukey, mostraram que a produção

de rejeitos dos tratamentos AN1 natural e AN1 autoclavado foram estatisticamente diferentes (Figura 5).

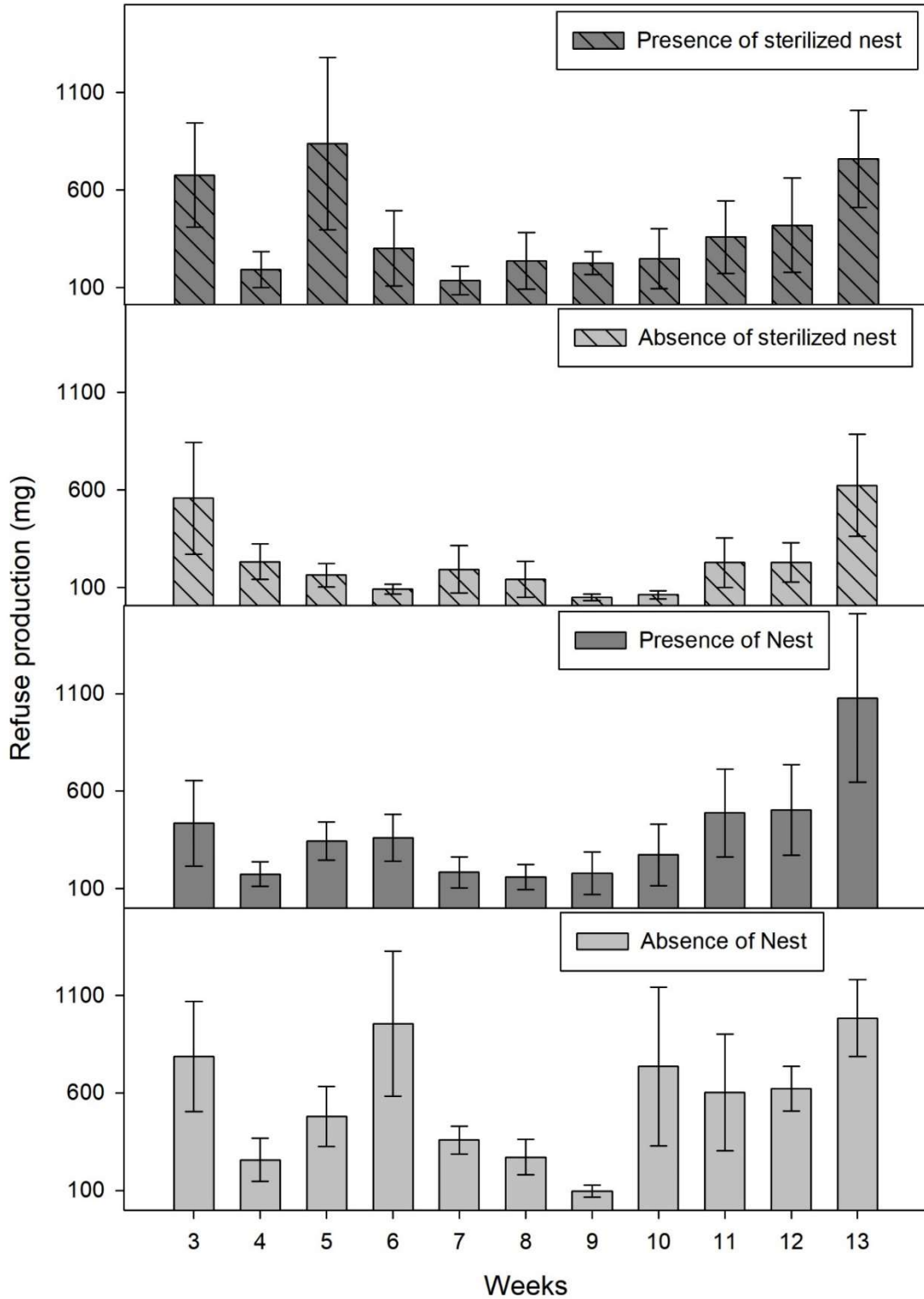


Figura 4- Produção de rejeitos no experimento I (média \pm erro padrão) de cada tratamento, exceto semanas 1 e 2.

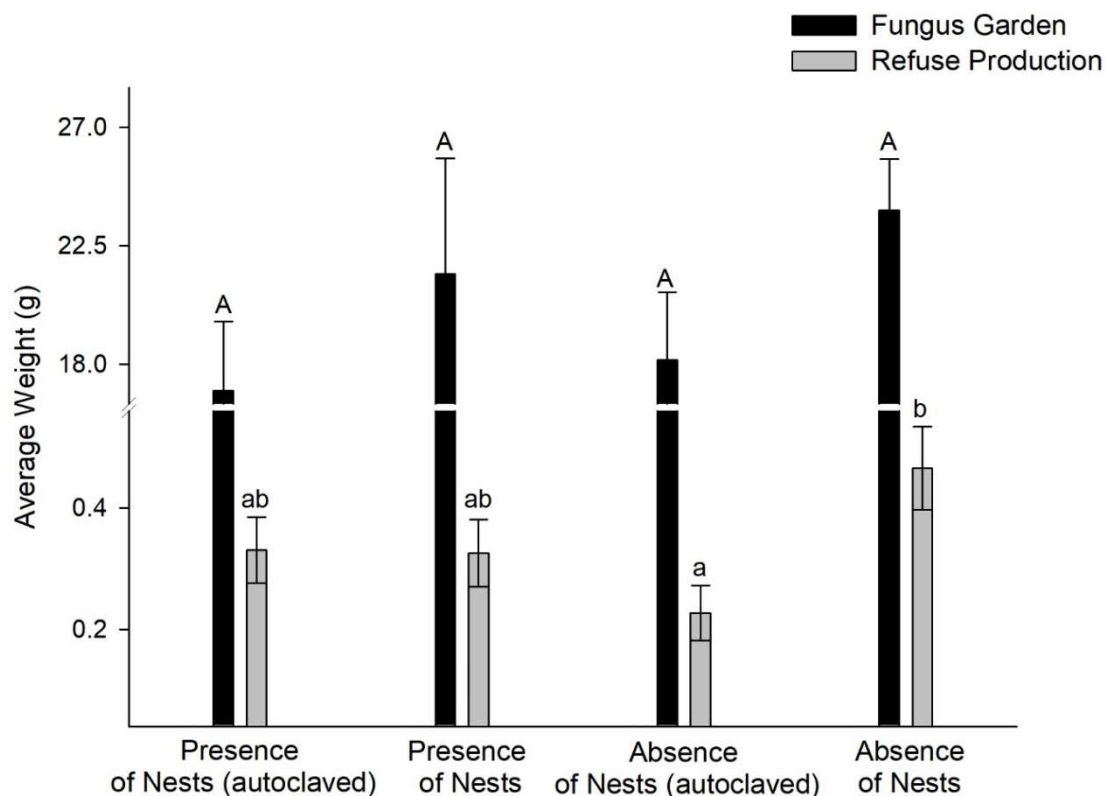


Figura 5- Massa fresca do jardim de fungo e produção média de rejeito, média \pm erro padrão, em cada tratamento exceto as semanas 1 e 2, no experimento I. Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5%.

As médias de peso de jardim de fungo nas colônias em contato com solos não autoclavados (PN1 natural e AN1 natural) foram 23,83 g e 21,43 g respectivamente e não diferiram entre si ($F_{3,29} = 1,27$; $P = 0,304$) (Figura 5). A média de formigas mortas nos tratamentos PN1 autoclavado e AN1 autoclavado durante as 11 semanas foram 1,89 e 1,99 operárias/semana respectivamente, não apresentando diferença entre elas ($F_{3,40} = 1,77$; $P = 0,173$). Quando se correlaciona o peso da produção de rejeitos com o peso de jardim de fungo, verifica-se que houve correlação negativa moderada ($r = -0,60$, $P < 0,001$), já o peso de rejeitos correlacionados com o número de formigas mortas apresentaram correlação positiva moderada ($r = 0,51$, $P < 0,001$).

O tempo médio de abertura do olheiro nas colônias do experimento II foi em média de 62,23 dias no solo de área com ninhos e de 63,75 dias no solo sem ninhos, não apresentando diferença entre eles ($F_{1,19} = 1,21$; $P = 0,28$). A avaliação das colônias

nos dois tratamentos após 26 dias da abertura do olheiro do ninho, ou seja, 90 dias depois da revoada, mostrou que não houve diferença entre as médias de números de adultos ($F_{1,19}= 1,96$; $P= 0,18$), larvas ($F_{1,19}= 0,01$; $P= 0,90$), pupas ($F_{1,19}= 0,67$; $P= 0,42$) e peso do jardim de fungo ($F_{1,19}= 0,38$; $P= 0,54$) (Figura 6).

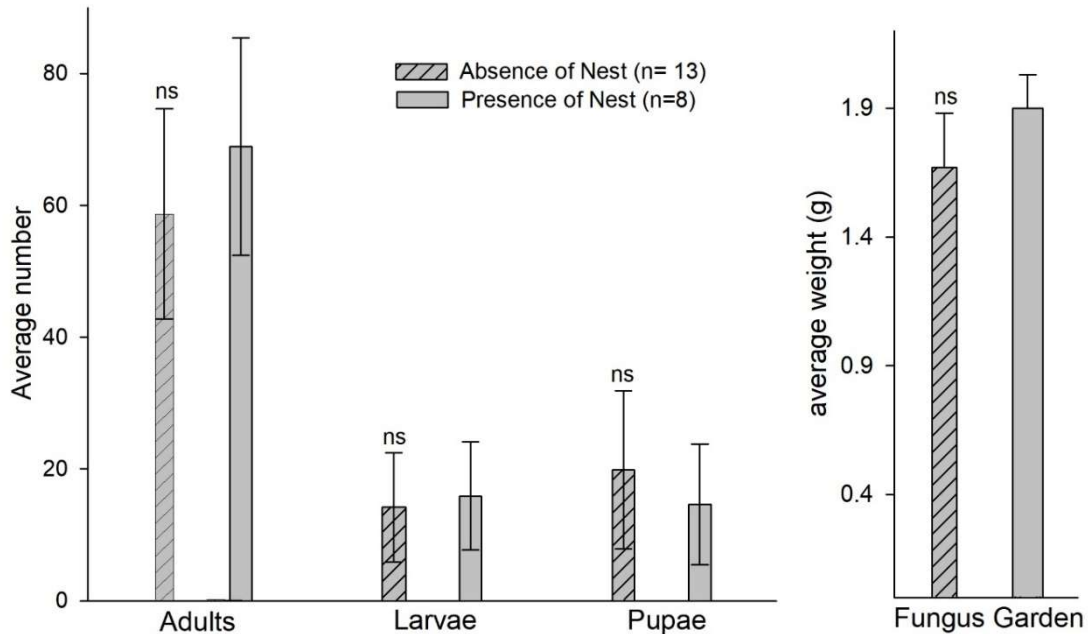


Figura 6- Avaliação de colônias de *Atta sexdens* após 26 dias da abertura do olheiro, em solo de área sem ninho e solo de área com ninho de *Atta sexdens*, no experimento II. ns = Não significativo ao nível de 5%, pelo teste t.

Discussão

As colônias que se desenvolveram inicialmente em contato com o gesso apresentaram menores taxas de mortalidade do que as colônias que se desenvolveram diretamente no solo, evidenciando que os componentes da comunidade microbiana do solo devem exercer ação negativa no estabelecimento da colônia. De modo semelhante, Camargo et al. (2013) avaliaram o desenvolvimento inicial de colônias de *A. sexdens* simultaneamente em campo e em laboratório quando verificaram que as colônias que não entraram em contato com solo, ou seja, se desenvolveram em laboratório, eram colônias maiores, isto é, apresentavam maiores quantidades de operárias quando comparadas com as colônias da mesma idade que se desenvolveram naturalmente no solo. Isso mostra que condições do ambiente influenciam fortemente no desenvolvimento inicial da colônia, desde a escavação da

primeira câmara. Anteriormente, em condições naturais, Autuori (1950) encontrou uma elevada taxa de mortalidade em colônias de *A. sexdens*, sendo de 97,5% após 100 dias da revoada.

Quando a colônia entraram em contato com solo de área com ninho autoclavado, onde há naturalmente baixa densidade de fungos filamentosos, e solo de área com ninho não autoclavado, não foi verificada alteração no desenvolvimento e comportamento das colônias, pois foi observado que essas colônias não apresentaram diferenças na média de peso de rejeitos e no peso médio do jardim de fungos. No entanto, o processo de autoclavagem do solo de área sem ninho foi capaz de reduzir a quantidade de fungos filamentosos. Com a redução da quantidade de fungos nesse solo, houve a redução na produção de rejeitos sem, contudo, alterar o peso médio de jardim de fungos. Isso mostra que a produção de rejeitos não pode ser correlacionada diretamente com o desenvolvimento da colônia. Em algumas situações, a produção de rejeitos pode indicar um exaurimento mais rápido da esponja fúngica, como no caso de infecção por *Escovopsis* sp. Em outros casos, maior produção de rejeitos pode indicar um desenvolvimento mais rápido da colônia. Segundo Somera et al. (2015), o jardim de fungo funciona como um biorreator no qual vários grupos de microrganismos associados ao jardim de fungo consomem o material vegetal depositado pelas operárias e, desta forma, aumentam a produção de rejeitos na colônia.

Quando as colônias entraram em contato com o solo após o seu estabelecimento e desta forma essas já possuíam operárias ativas forrageando constantemente e realizando a limpeza do ninho, a mortalidade de colônias foi menor. Isso sugere que os microrganismos do solo têm impacto alto no momento da fundação e a sua influência diminui à medida que a colônia se desenvolve e surgem as primeiras operárias. Ninhos com poucos meses de fundação apresentam várias espécies de fungos do gênero *Trichoderma* nas paredes de suas câmaras e, apesar deles serem potencialmente antagonistas de seu fungo simbiote mutualístico, as colônias desenvolviam-se normalmente (Nascimento et al. 2017) .

Os resultados do presente trabalho apontam que as colônias incipientes de *A. sexdens* estão submetidas à forte pressão seletiva de microrganismos do solo no

momento da fundação. Após o surgimento da força operária, os mecanismos de defesa imune social garantem o desenvolvimento da colônia a despeito da presença de microrganismos patogênicos que estão presentes no solo do ninho.

Referências

- Araújo MS, Della Lucia TMC, Ribeiro GA, Kasuya MC. (2003) Impacto da queima controlada da cana-de-açúcar na nidificação e estabelecimento de colônias de *Atta bisphaerica* Forel (Hymenoptera: Formicidae). *Neotrop Entomol* 32:685–691. doi: 10.1590/S1519-566X2003000400021
- Arenas A, Roces F (2016) Learning through the waste: olfactory cues from the colony refuse influence plant preferences in foraging leaf-cutting ants. *J Exp Biol* 219:2490–2496. doi: 10.1242/jeb.139568
- Autuori M (1950) A contribution to the knowledge of *Atta* spp. V. The Numbers of alate forms and the reduction of the incipient nests. *Arch do Inst Biol São Paulo* 19: 325-331.
- Barke J, Seipke R, Yu D, Hutchings M (2011) A mutualistic microbiome: How do fungus-growing ants select their antibiotic-producing bacteria? *Communicative & integrative biology* 4:41-43.
- Bento JMS, Della Lucia TMC, Muchovej RMC, Vilela EF (1991) Influência da composição química e da população microbiana de diferentes horizontes do solo no estabelecimento de saúveiros iniciais de *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae) em laboratório. *An da Soc Entomológica do Bras* 20:307–317
- Biedermann PHW, Taborsky M (2011) Larval helpers and age polyethism in ambrosia beetles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:17064–17069. doi: 10.1073/pnas.1107758108
- Bot ANM, Currie CR, Hart AG, Boomsma JJ (2001) Waste management in leaf-cutting ants. *Ethol Ecol Evol* 13:225–237
- Camargo R da S, Fonseca JA, Lopes JFS, Forti LC (2013) Influência do ambiente no desenvolvimento de colônias iniciais de formigas cortadeiras (*Atta sexdens*

rubropilosa). *Ciência Rural* 43:1375–1380. doi: 10.1590/S0103-84782013000800006

Carreiro SC, Pagnocca FC, Bacci MJ, et al (2004) *Sympodiomyces attinorum* sp. nov, a yeast species associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:1891–1894. doi: 10.1099/ijs.0.63200-0

Currie CR, Stuart AE (2001) Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. *Proc R Soc B Biol Sci* 268:1033–1039. doi: 10.1098/rspb.2001.1605

Diehl-Fleig E, Rocha ES da (1998) Escolha de solo por fêmeas de *Acromyrmex striatus* (Roger) (Hymenoptera: Formicidae) para construção do ninho. *An da Soc Entomológica do Bras* 27:41-45.

Embrapa Solos (2013) Sistema brasileiro de classificação de solos. Rio Janeiro: Centro Nacional de Pesquisa em Solos. 353pp.

Gouttefarde R, Bon R, Fourcassie V, et al (2017) Investigating termite nest thermodynamics using a quick-look method and the heat equation. *bioRxiv* 161075. doi: dx.doi.org/10.1101/161075.

Hart AG, Ratnieks FLW (2002) Waste management in the leaf-cutting ant *Atta colombica*. *Behav Ecol* 13:224–231

Inward D, Beccaloni G, Eggleton P (2007) Death of an order: a comprehensive molecular phylogenetic study confirms that termites are eusocial cockroaches. *Biol Lett* 3:331–335

Karlik J, Epps MJ, Dunn RR, Penick CA (2016) Life inside an acorn: How microclimate and microbes influence nest organization in *Temnothorax* ants. *Ethology* 122:790–797

Katariya L, Ramesh PB, Gopalappa T, et al (2017) Fungus-farming termites selectively bury weedy fungi that smell different from crop fungi. *J Chem Ecol* 43:986–995. doi: 10.1007/s10886-017-0902-4

- Michereff SJ, Andrade D, Menezes M (2005) Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais. Recife: Universidade Federal e Rural de Pernambuco. 398pp.
- Mueller UG, Gerardo NM, Aanen DK, et al (2005) The evolution of agriculture in insects. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 36:563–595
- Nascimento MO, Almeida Sarmiento R, Santos GR, et al (2017) Antagonism of *Trichoderma* isolates against *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. *J Basic Microbiol* 57:699–704
- Perna A, Theraulaz G (2017) When social behaviour is moulded in clay: on growth and form of social insect nests. *J Exp Biol* 220:83–91
- Pinto-Tomás AA, Anderson MA, Suen G, et al (2009) Symbiotic nitrogen fixation in the fungus gardens of leaf-cutter ants. *Science* 326:1120–1123
- Santos AV, Dillon RJ, Dillon VM, et al (2004) Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *FEMS Microbiol Lett* 239:319–323
- Schultz TR, Brady SG (2008) Major evolutionary transitions in ant agriculture. *Proc Natl Acad Sci* 105:5435–5440
- Scott JJ, Budsberg KJ, Suen G, et al (2010) Microbial community structure of leaf-cutter ant fungus gardens and refuse dumps. *PLoS One* 5:e9922
- Somera AF, Lima AM, dos Santos-Neto AJ, et al (2015) Leaf-cutter ant fungus gardens are biphasic mixed microbial bioreactors that convert plant biomass to polyols with biotechnological applications. *Appl Environ Microbiol* 81:4525–4535
- Sosa-Calvo J, Jesovnik A, Okonski E, Schultz TR (2015) Locating, collecting, and maintaining colonies of fungus-farming ants (Hymenoptera: Myrmicinae: Attini). *Sociobiology* 62:300–320
- Sun Q, Zhou X (2013) Corpse management in social insects. *Int J Biol Sci* 9:313–321. doi: 10.7150/ijbs.5781

- Van Borm S, Billen J, Boomsma JJ (2002) The diversity of microorganisms associated with *Acromyrmex* leafcutter ants. *BMC Evol Biol* 2:9
- Van Gils H, Gaigl A, Gómez LE (2010) The relationship between soil variables and leafcutter ant (*Atta sexdens*) nest distribution in the Colombian Amazon. *Insectes Soc* 57:487–494
- Van Gils H, Vanderwoude C (2012) Leafcutter ant (*Atta sexdens*) (Hymenoptera: formicidae) nest distribution responds to canopy removal and changes in microclimate in the southern colombian amazon. *Florida Entomol* 95:914–921
- Vasconcelos HL, Vieira-Neto EHM, Mundim FM, Bruna EM (2006) Roads alter the colonization dynamics of a keystone herbivore in: Neotropical savannas. *Biotropica* 38:661–665
- Véle A, Holuša J (2017) Microclimatic conditions of *Lasius flavus* ant mounds. *Int J Biometeorol* 61:957–961

CAPÍTULO 2 – Actinobactérias do solo inibem fungos associados às colônias de formigas-cortadeiras

- Sugestão de periódico para publicação: Current Microbiology

Resumo

A complexidade de interações que há entre os microrganismos do solo é pouco compreendida devido à sua grande diversidade, aos encontros aleatórios que ocorrem entre eles e ao pouco conhecimento que há sobre o papel que cada táxon desempenha em uma teia alimentar. Uma vez que as colônias de formigas-cortadeiras estão intimamente relacionando com a microbiota do solo, esse trabalho objetivou isolar e identificar actinobactérias de solos de câmaras de jardim de fungo de *A. sexdens* e avaliar o efeito inibitório desses isolados sobre fungos patogênicos e ao fungo simbionte dessas formigas. Foram sequenciados o gene 16S rRNA de nove actinobactérias, sendo seis do gênero *Streptomyces*, dois do gênero *Nocardia* e um do gênero *Kitasatospora*. Foi verificado que dois *Streptomyces* sp. e um de *Kitasatospora* sp. inibiram não só o fungo *Escovopsis* sp., como também o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e o fungo antagonista do cultivar simbionte de cortadeiras *Trichoderma* aff. *strigosellum*. Uma vez que não existem evidências de cultivo de actinobactérias na cutícula de operárias do gênero *Atta*, é possível que essas operárias estabeleçam simbiose temporária adaptativa com microrganismos do solo produtores de substâncias antifúngicas e antibióticas e que vivem em alguma parte de seu ninho ou mesmo no interior do seu corpo. Pode-se hipotetizar que os fungos patogênicos para colônias de formigas-cortadeiras presentes no solo adjacente ao ninho, apesar de constituírem um risco, são controlados pelas secreções produzidas pelas operárias, bem como de metabólitos de algumas actinobactérias.

Palavras-chave: antagonismo, *Streptomyces*, *Escovopsis* e *Atta*.

Abstract

The complexity of interactions among soil microorganisms is poorly understood due to their great diversity, their random encounters in nature and the scarce knowledge on the role that each taxon plays in a food web. Considerer the colonies of leaf-cutting ants are closely related to the soil microorganism, this work aimed to isolate and to identify soil actinobacteria from nest chambers and to evaluate the in inhibitory effects on fungi associated with the leaf-cutting ants colonies of *Atta sexdens*. The 16S rRNA genes of nine actinobacteria were sequenced and, six belonged to the genus *Streptomyces*, two to the genus *Nocardia* and one of the genus *Kitasatospora* sp. It was determined that two *Streptomyces* sp. and one of *Kitasatospora* sp. not only inhibited the fungus *Escovopsis* sp., but also inhibited the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and the fungus antagonist of the cultivar symbiont of leaf cutters *Trichoderma* aff. *strigoselum*. Since there is no evidence of the presence of actinobacteria on the cuticle of workers of the genus *Atta*, it is possible that these workers establish temporary adaptive symbiosis with soil microorganisms that produce of antifungal and antibiotic substances and that live in some part of the nest or even inside the workers body. It can be hypothesized that the fungi pathogenic to the of leaf-cutters colonies and that occur in soil adjacent to the nest, although not constituting a risk, can be controlled by secretions produced by the workers and by metabolites of some actinobacteria.

Keywords: *Streptomyces*, antagonism, *Escovopsis* and *Attina*.

Introdução

O solo abriga grande quantidade de biomassa microbiana, aprox. 65% dela é encontrada nos primeiros 25 centímetros do perfil do solo [1]. A competição entre esses microrganismos pode ser uma forma de biocontrole ou, também, o motivo dos fracassos de programas de inoculação de organismos benéficos no solo de agroecossistemas. Como resposta à intensa competição pelos mesmos recursos, os organismos envolvidos nessas interações desenvolveram adaptações defensivas, sejam elas comportamentais, morfológicas ou bioquímicas [2]. A complexidade de interações entre os microrganismos do solo é pouco compreendida devido a sua grande diversidade, aos encontros aleatórios que ocorrem entre eles e ao pouco conhecimento que há sobre o papel que cada táxon desempenha em uma teia alimentar [3].

Alguns atributos físico-químicos do solo - como textura, pH, umidade e teor de matéria orgânica - podem influenciar na densidade e variedade da microbiota do solo. Em geral, os fungos são predominantes em solos ácidos e desta forma sofrem menor competição com bactérias e actinobactérias que preferem regiões mais alcalinas a neutras [4, 5]. Os ninhos de formigas-cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae) são construídos no subsolo e, assim, estão sujeitos às condições específicas que esse espaço apresenta. A microbiota do solo exerce papel direto nas colônias de cortadeiras e são capazes até de limitar o desenvolvimento e a sobrevivência das mesmas [6], como é o caso de fungos entomopatogênicos (e.g. *Metarhizium anisopliae* Metsch.), antagonistas (e.g. *Trichoderma* spp. - Ascomycota: Hypocreaceae) e parasitas do fungo simbiote de cortadeiras *Leucoagaricus gongylophorus* (Basidiomycota: Agaricales) (e.g. gênero *Escovopsis* - Ascomycota: Hypocreaceae). Em contrapartida, essas formigas podem recrutar microrganismos produtores de substâncias antimicrobianas que estão no solo e cultivá-las em seu jardim de fungo [7].

Esporos de *M. anisopliae* estão dispersos no solo e quando entram em contato com a cutícula do inseto e nele encontram condições ideais de germinação, provocam infecção no inseto. Esse fungo provoca a morte do inseto e, após colonizar seu corpo, produz esporos que são dispersos no meio ambiente [8, 9]. Os fungos do gênero *Trichoderma* são micoparasitas facultativos e antagônicos de *L. gongylophorus*, sendo

que o grau do antagonismo vai depender da espécie de *Trichoderma* utilizada e das condições do meio em que estão se desenvolvendo [10, 11]. Fungos do gênero *Escovopsis* são considerados parasitas especializados do fungo cultivado pelas formigas-cortadeiras [12]. Foi observado que o genoma desses fungos sofreu mudanças durante a evolução que lhes permitiram adaptar-se ao estilo de vida de micoparasita [13].

As colônias de formigas-cortadeiras são eficientes na prevenção de infecção por patógenos devido à combinação de comportamento higiênico aliado à complexidade de sua organização social. Elas utilizam substâncias antifúngicas e antibióticas secretadas principalmente pelas glândulas metapleurais e mandibulares [14], estabelecem associação com actinobactérias produtoras de substâncias antimicrobianas [15] e apresentam, também, o hábito de afastar seus resíduos das câmaras de cultivo do fungo simbiote mutualista [16–18]. No jardim de fungos de *Atta sexdens* foi detectada a presença de bactérias produtoras de substâncias antimicrobianas [7, 19], porém, apenas um trabalho relata o sucesso no isolamento de actinobactérias da cutícula de formigas do gênero *Atta* [20].

Uma vez que as colônias de formigas-cortadeiras estão em contato com a microbiota do solo, esse trabalho objetivou isolar e identificar actinobactérias de solos de câmaras de jardim de fungo de *A. sexdens* e avaliar o efeito inibitório desses isolados sobre fungos patogênicos e ao fungo simbiote dessas formigas.

Material e métodos

Isolamento de microrganismos

Foi realizada bioprospecção de isolados de actinobactérias em 21 amostras de solos de câmara de jardim de fungos, das quais oito eram provenientes de colônias que se desenvolveram em contato com solo de área com ninhos de cortadeiras e 13 de solos de colônias que se desenvolveram em contato com solo de área sem ninhos. Para isso, efetuou-se a diluição decimal em série das amostras de solo, em que uma alíquota de 1g foi diluída em 9 mL de solução salina 0,9% (p/v) estéril e agitada em vórtex por 10 minutos. Foram transferidos 0,1 mL da solução de solo para os meios de cultura. Dois meios de cultura seletivos foram utilizados para aumentar a detecção

dos microrganismos: (1) meio Ágar Amido-Caseína composto de amido solúvel 10 g/L, caseína hidrolisada 0,3 g/L, KNO₃ 2,0 g/L, NaCl 2,0 g/L, K₂HPO₄ 2,0 g/L, MgSO₄.7H₂O 0,05 g/L, CaCO₃ 0,02 g/L, FeSO₄.7H₂O 0,01 g/L, ágar 18,0 g/L, em pH 7,0 e (2) meio BDA + 1% de amido, ambos com antifúngico Fluconazol 150 mg/L e pH 6,5. As placas foram mantidas em escotofase total em temperatura de 26 ± 1 °C e no décimo dia foram quantificadas as unidades formadoras de colônias por grama de solo (UFC.g⁻¹). As UFC de actinobactérias mais frequentes e que apresentavam certo grau de inibição de outros isolados bacterianos foram repicadas para o crescimento isolado e livre de contaminantes em placas de Petri contendo meio BDA + 1% de amido.

Os fungos utilizados foram obtidos no Laboratório de Controle Microbiano de insetos, sendo que *Trichoderma aff. strigosellum* foi isolado de solo de área de fragmento de floresta de cerrado *stricto sensu* [10], *Escovopsis* sp. (LESF 1110, Central de Recursos Microbianos da UNESP, CRM-UNESP) foi isolado do lixo de colônias de *Acromyrmex balzani*, *Metarhizium anisopliae* foi isolado de larvas de *Tenebrio molitor* e *Leucoagaricus gongylophorus* foi isolado de colônias de *A. sexdens* mantidas no laboratório da Universidade Federal do Tocantins, *Campus* de Gurupi.

Identificação de actinobactérias - Obtenção do DNA total e PCR

O DNA total das culturas puras bacterianas obtidas foi extraído utilizando o Kit comercial *FastDNA™ SPIN KIT* (MP Biomedicals) conforme recomendações do fabricante. A qualidade, concentração e a pureza do DNA obtido foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% e por espectrofotometria (NanoDrop 2000c Spectrophotometer, Thermo Scientific). Todos os DNA obtidos foram padronizados para a concentração de uso de 25 ng/μL.

A reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para a amplificação da região do gene rRNA 16S de ~640 pares de bases foi realizada em termociclador Mastercycler®, Eppendorf, utilizando os *primers* S-C-Act-235-a-S-20 5'-CGCGGCCTATCAGCTTGTTG-3' e S-C-Act-878-a-A-19 5'-CCGTACTCCCCAGGCGGGG-3', específicos para actinobactérias [21]. Com as seguintes condições de reação: 0,2 μM de cada *primer*, 200 μM da solução de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 1X tampão da enzima *Go Taq* DNA polimerase, 1,25U da enzima *Go Taq* DNA polimerase e 25ng de DNA de cada cultura pura em um volume final de

50 µL. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial de 95 °C por 4 min, seguido por desnaturação a 95 °C por 1 min, anelamento a 62 °C por 45 s e extensão a 72 °C por 40 s, com estes três últimos passos repetidos 35 vezes e extensão final 72 °C por 7 min. Após o término das reações, cinco µL do produto da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2% (50 min a 90 V) [21, 22] para verificação da presença de amplicons.

Sequenciamento e construção de árvore filogenética

Os amplicons obtidos para cada isolado foram enviados para purificação e sequenciamento. As sequências obtidas foram editadas e analisadas utilizando o *Sequencher* 5.4 e, posteriormente, as sequências foram alinhadas pelo programa *BLAST* disponível no site do NCBI-Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e sequências de referências disponíveis no *GenBank* (NCBI - *National Center for Biotechnology Information, USA*) foram utilizadas para o alinhamento. A árvore filogenética foi construída utilizando o *software* MEGA7 [23].

A inferência filogenética foi realizada utilizando o método Neighbor-Joining de agrupamento. Os ramos da árvore filogenética foram construídos com base no agrupamento após 1000 repetições (*bootstrap* igual a 1000) e as distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Kimura 2-parâmetros. Como grupo externo foi utilizada a sequência do gene rRNA 16S, correspondente à espécie *Coriobacterium glomerans* (NR_026170.1 – NCBI), pertencente ao Filo Actinobacteria e à família Coriobacteriales. Para confirmar a classificação das sequências obtidas, elas foram comparadas com as sequências depositadas no projeto de banco de dados ribossômicos (<http://rdp.cme.msu.edu/>).

Teste de inibição

O teste de inibição pareado foi realizado com nove isolados de actinobactérias e quatro isolados fúngicos, sendo seis repetições cada um. Foram escolhidos os isolados bacterianos que apresentavam frequência acima de 15% e/ou que exibiam coloração no meio de cultura, devido à secreção de metabólitos. Discos de seis mm de diâmetro de actinobactérias foram colocados em placas de Petri contendo meio BDA + 1% amido. Essas placas permaneceram na incubadora por 10 dias devido ao

crescimento lento de actinobactérias. Após esse prazo foram colocados discos de seis mm de diâmetro do fungo, a três cm de distância do disco de actinobactéria e o crescimento do fungo foi medido após 10 dias de incubação. O controle foi realizado com disco do fungo crescendo pareado com outro disco do mesmo fungo.

Para o teste de inibição por produção de compostos voláteis, foram selecionados os isolados bacterianos mais eficientes em inibir o crescimento dos fungos no teste pareado. Semelhantemente ao teste pareado, os discos de seis mm de diâmetro de actinobactérias foram colocados em placas de Petri contendo meio BDA + 1% de amido. As placas permaneceram na incubadora por 10 dias para o crescimento das actinobactérias. Após 10 dias foram colocados discos de seis mm de diâmetro do fungo em outra placa de Petri contendo meio BDA + 1% de amido. A seguir as placas foram unidas e vedadas com parafilm® de forma que a actinobactéria e o fungo não mantivessem contato físico. As placas sempre foram mantidas em incubadora com temperatura de 26 ± 1 °C e em escotofase total.

Para medir a taxa de inibição da actinobactéria sobre o fungo no teste de crescimento pareado e sob efeito de voláteis, foi calculada a eficiência de crescimento micelial de cada isolado fúngico, sendo dividido o diâmetro médio final pelo diâmetro médio inicial $C_1 = DF/DI$. Em cada teste de pareamento foi calculada a eficiência de crescimento do fungo (G). Por fim, o crescimento relativo do fungo (RG) na presença da actinobactéria foi apresentado por $CR = G/G_1$. A taxa de inibição de cada fungo foi calculada com base no controle do mesmo fungo [24].

Análise estatística

Os valores médios de $UFC.g^{-1}$ de actinobactérias dos dois solos e as médias do crescimento relativo de cada isolado fúngico pareado e com efeito de compostos voláteis, na presença dos isolados de actinobactérias, foram comparadas usando ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey. As análises estatísticas foram realizadas no software Action Stat versão 3.4.124.1308 (www.portaction.com.br), com nível de significância de 5 %.

Resultados

Isolamento de microrganismos

O número médio de actinobactérias no solo de câmara de colônias desenvolvidas em solo com ninhos foi maior que em colônias que se desenvolveram em solo sem ninhos ($F_{1,19} = 7,89$); $p = <0,01$, apresentando $17,9 \times 10^4$ e $7,2 \times 10^4$ UFC.g⁻¹ de solo de actinobactérias respectivamente. A partir da repicagem dos isolados bacterianos mais frequentes e/ou relevantes foi quantificado um total de 97 morfotipos. A origem dos nove isolados selecionados para identificação e teste de inibição está descrita na tabela 1.

Tabela 1. Origem das actinobactérias isoladas de solos de câmaras de jardim de fungo de colônias de *Atta sexdens* em laboratório.

Actinobactérias	Origem	Grupo
M.4-1	Solo de área sem ninhos	<i>Streptomyces</i> sp.
M.8-9		<i>Nocardia</i> sp.
M.9-10		<i>Streptomyces</i> sp.
M.4-15		<i>Streptomyces</i> sp.
M.2-10		<i>Kitasatospora</i> sp.
N.7-2	Solo de área com ninhos	<i>Nocardia</i> sp.
N.6-3		<i>Streptomyces</i> sp.
N.3-11		<i>Streptomyces</i> sp.
N.6-8		<i>Streptomyces</i> sp.

Identificação de actinobactérias - Obtenção do DNA total e PCR

O método de extração de DNA total dos nove isolados de actinobactérias foi eficaz e o produto da PCR analisado em gel de agarose 1,2% mostrou a presença dos amplicons com aproximadamente 640 pares de bases (Figura 1).

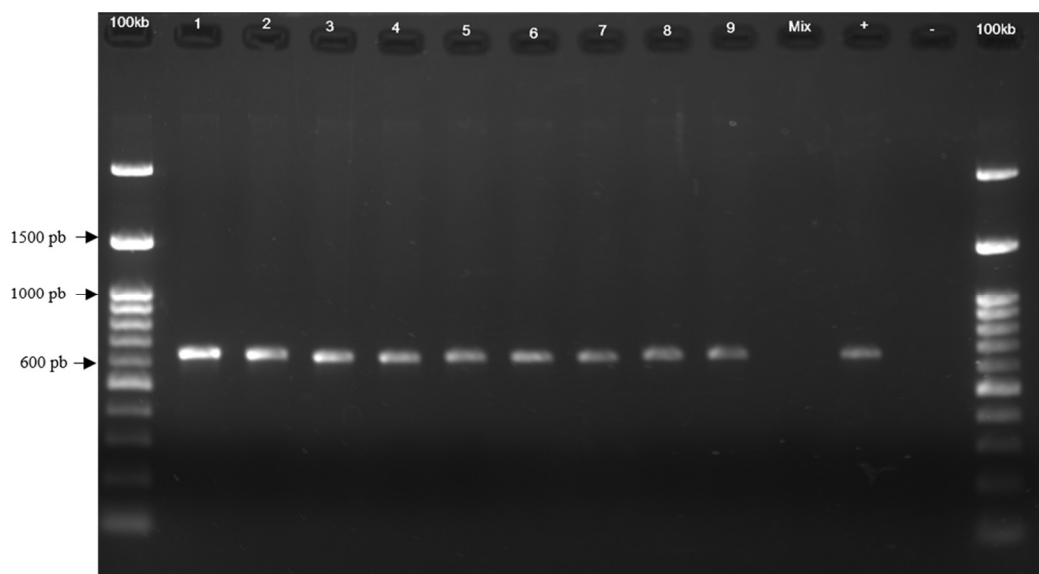


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 1,2% do produto da reação de PCR realizada com os *primers* específicos para actinobactérias, fragmento de ~640 pares de base. Marcador 1kb DNA *ladder* – KASVI; 1: N.6-3; 2: M.8-9; 3: M.4-15; 4: M.7-2; 5: M;4-1; 6: N.3-11; 7: N.6-8; 8: M.2-10 e 9: M.9-10. Mix: amostra sem DNA; +: controle positivo (*Streptomyces rochei* – INCQS 00320); -: controle negativo, *Escherichia coli* (Bacterioteca do Laboratório de Genética Molecular de Bactérias - UFV).

Sequenciamento e construção de árvore filogenética

A construção da árvore filogenética com a sequência do gene 16S rRNA dos nove isolados de actinobactérias mostrou que M.4-1, M.9-10, N.6-3, N.6-8, M.4-15 e N.3-11 pertencem ao gênero *Streptomyces*, M.8-9 e M.7-2 pertencem ao gênero *Nocardia* e M.2-10 pertence ao gênero *Kitasatospora* (Figura 2). A partir da utilização da ferramenta de classificação no projeto de banco de dados ribossômicos (RDP) foi confirmada a classificação encontrada acima, apresentando 95% de confiança para os isolados do gênero *Nocardia* e *Streptomyces* e 84% de confiança para o gênero *Kitasatospora*.

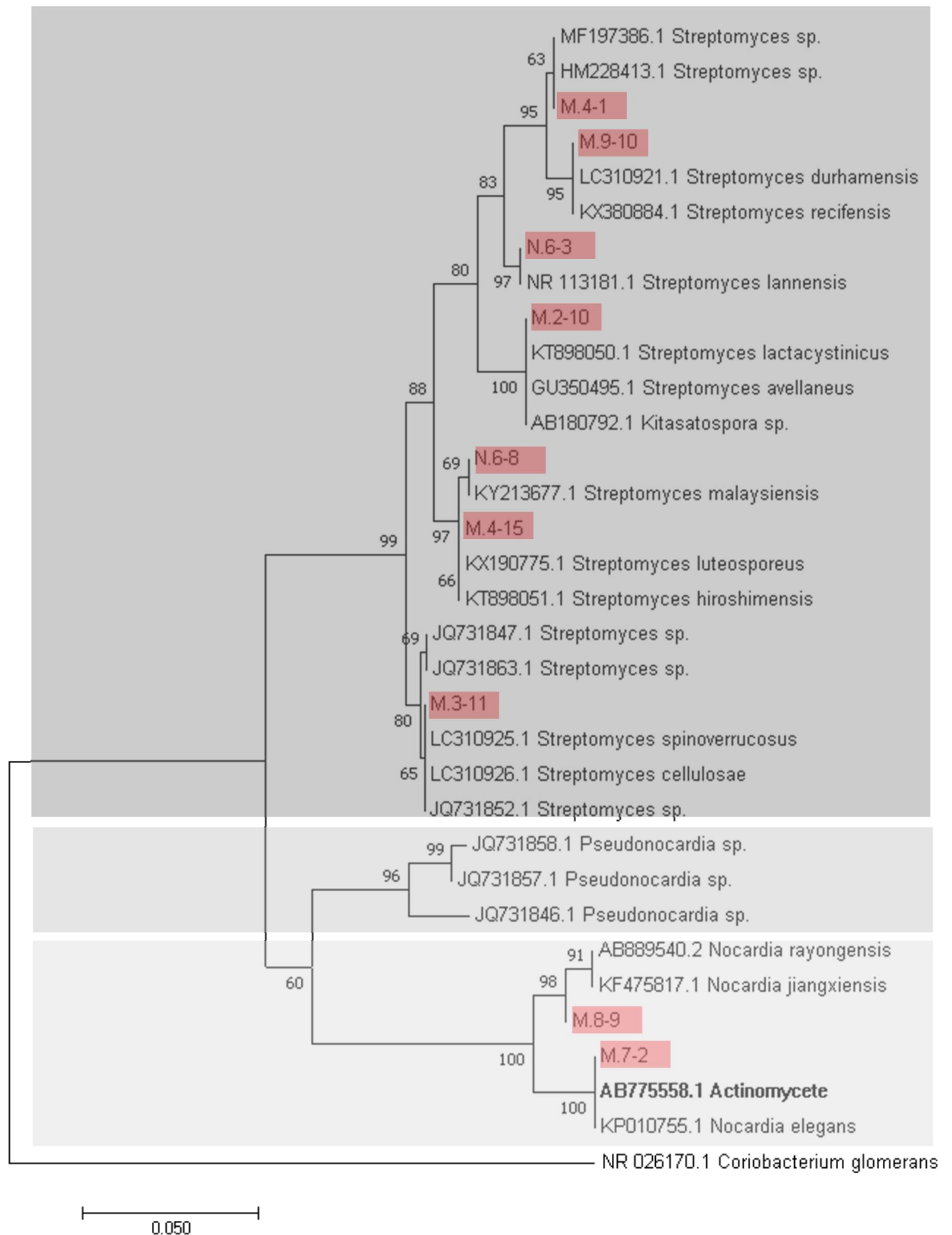


Figura 2. Análise filogenética construída a partir das sequências do gene 16s rRNA dos nove isolados de actinobactérias selecionados.

Teste de inibição

Os isolados bacterianos N.6-3, N.3-11, M.4-1 e M.9-10 não inibiram o crescimento dos fungos testados. Os isolados bacterianos N.7-2 e M.8-9 foram capazes de inibir apenas *L. gongylophorus*, 13% e 19% de grau de inibição, respectivamente (Tabela 2). Os isolados bacterianos N.6-8 e M.2-10 inibiram os três isolados fúngicos patogênicos para colônias de formigas-cortadeiras. O isolado bacteriano N.6-8 se destacou por ser capaz de inibir o crescimento pareado dos fungos testados e ainda apresentou intensa produção de metabólitos secundários no meio de cultura (Figura 3).

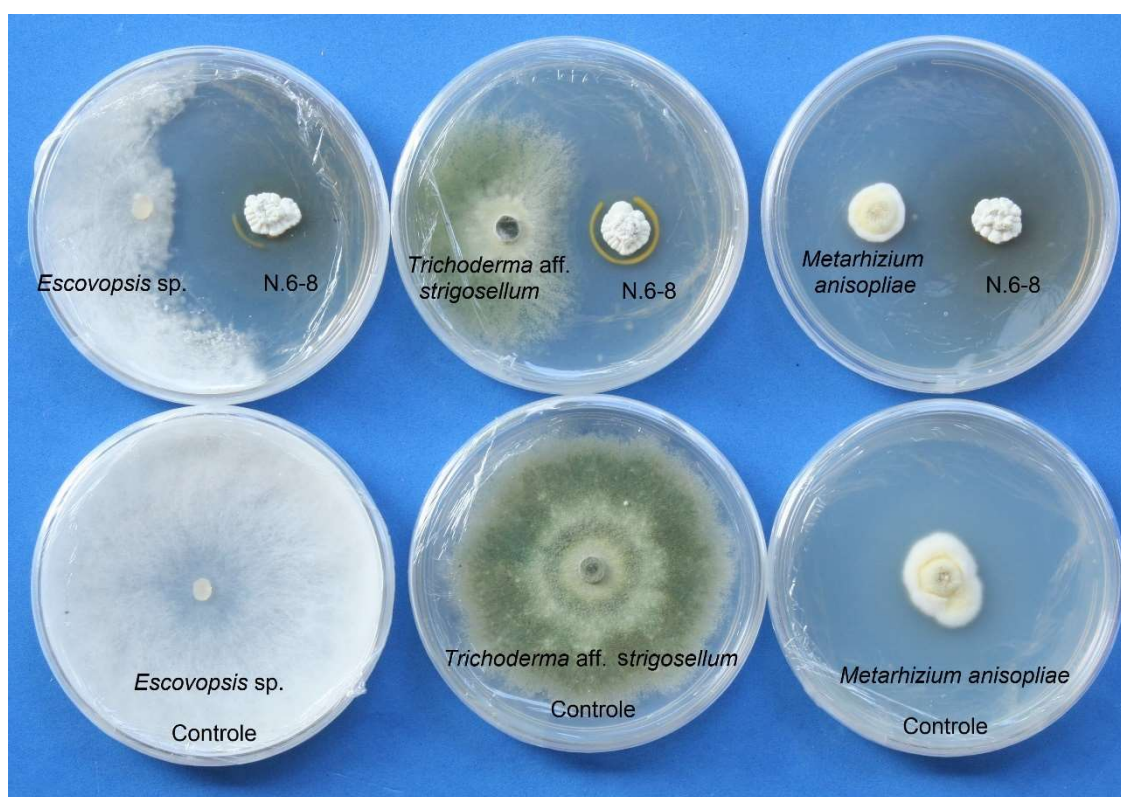


Figura 3. Efeito inibitório da actinobactéria N.6-8 sobre o crescimento do fungo *Escovopsis* sp., *Trichoderma* aff. *strigosellum* e *Metarhizium anisopliae*, com produção de metabólitos secundários no meio de cultura.

Tabela 2. Crescimento (em mm \pm desvio padrão) e taxa de inibição de *Escovopsis* sp., *Metarhizium anisopliae*, *Trichoderma* sp. e *Leucoagaricus gongylophorus*, após dez dias pareado com diferentes isolados de actinobactérias.

Actinobacteria	ID	FD	G	RG	Inibição de Crescimento ^a
<i>Metarhizium anisopliae</i>			CV (%)= 15.1		
Controle	6 ± 0	37.0 ± 1.83	6.17 ^{G1}	1.00a	0%
N.7-2	6 ± 0	35.7 ± 0.98	5.94	0.96a	4%
N.6-3	6 ± 0	34.0 ± 1.39	5.80	0.94ab	6%
M.4-1	6 ± 0	32.9 ± 0.97	5.61	0.91ab	9%
M.8-9	6 ± 0	33.3 ± 0.95	5.54	0.89abc	11%
N.3-11	6 ± 0	32.6 ± 3.38	5.44	0.88abc	12%
M.9-10	6 ± 0	31.37 ± 0.65	5.36	0,87abc	13%
M.4-15	6 ± 0	30.3 ± 1.66	5.08	0.82bc	18%
M.2-10	6 ± 0	28.0 ± 6.21	4.81	0,78c	22%
N.6-8	6 ± 0	23.2 ± 0.37	3.87	0.63d	37%
<i>Trichoderma aff. strigosellum</i>			CV (%)= 29.5		
Controle	6 ± 0	84.0 ± 0	14.00 ^{G1}	1.00a	0%
M.8-9	6 ± 0	84.0 ± 0	14.00	1.00a	0%
N.7-2	6 ± 0	84.0 ± 0	14.00	1.00a	0%
N.3-11	6 ± 0	84.0 ± 0	14.00	1.00a	0%
N.6-3	6 ± 0	84.0 ± 0	14.00	1.00a	0%
M.9-10	6 ± 0	84.0 ± 0	14.00	1.00a	0%
M.4-1	6 ± 0	84.0 ± 0	14.00	1.00a	0%
N.6-8	6 ± 0	46.4 ± 0.52	7.70	0.55b	45%
M.2-10	6 ± 0	45.9 ± 1.30	7.65	0.55b	45%
M.4-15	6 ± 0	36.2 ± 1.13	6.00	0.43c	57%
<i>Escovopsis sp.</i>			CV (%)= 25		
Controle	6 ± 0	84.0 ± 0	14.00 ^{G1}	1.00a	0%
M.8-9	6 ± 0	84.0 ± 0	14.00	1.00a	0%
N.7-2	6 ± 0	84.0 ± 0	14.00	1.00a	0%
N.3-11	6 ± 0	84.0 ± 0	14.00	1.00a	0%
M.4-15	6 ± 0	84.0 ± 0	14.00	1.00a	0%
M.4-1	6 ± 0	84.0 ± 0	14.00	1.00a	0%
M.9-10	6 ± 0	84.0 ± 0	14.00	1.00a	0%

N.6-3	6 ± 0	84.0 ± 0	14.00	1.00a	0%
M.2-10	6 ± 0	67.43 ± 25.66	11.24	0.80b	20%
N.6-8	6 ± 0	34.0 ± 1.50	5.50	0.39b	61%
<i>Leucoagaricus gongylophorus</i>			CV (%)= 13.7		
Controle	6 ± 0	10.5 ± 0.60	1.76 ^{G1}	1.00a	0%
N.3-11	6 ± 0	10.8 ± 0.50	1.80	1.00a	0%
M.9-10	6 ± 0	10.4 ± 0.24	1.73	0.98ab	2%
M.2-10	6 ± 0	9.7 ± 0.68	1.62	0.92abc	8%
N.6-3	6 ± 0	9.7 ± 1.61	1.61	0.92abc	8%
M.4-1	6 ± 0	9.4 ± 0.46	1.56	0.89abc	11%
N.7-2	6 ± 0	9.2 ± 0.60	1.53	0.87bc	13%
M.8-9	6 ± 0	8.6 ± 0.92	1.43	0.81cd	19%
N.6-8	6 ± 0	8.6 ± 0.32	1.43	0.81cd	19%
M.4-15	6 ± 0	7.6 ± 0.37	1.26	0.72d	28%

ID: Diâmetro Inicial; FD: Diâmetro Final; G: Eficiência de crescimento do fungo na presença da actinobactéria; G= FD/ID; RG: Crescimento relativo na presença de actinobactéria RG= G/G₁; G₁: Eficiência de crescimento o fungo (Controle);
^aPorcentagem de inibição de crescimento do fungo. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

Dos três isolados bacterianos que apresentaram maior capacidade de inibir os fungos testados em crescimento pareado, apenas o isolado M.2-10 inibiu com efeito de voláteis o crescimento de *Trichoderma* aff. *strigosellum* e *L. gongylophorus* em 18,8% e 8% respectivamente (Tabela 3).

O fungo *Escovopsis* sp. foi inibido pelos isolados N.6-8 e M.2-10, chegando a ser inibido em 61% do seu crescimento quando foi pareado com o isolado N.6-8 (*Streptomyces* sp.). Entretanto, em teste de inibição de crescimento com efeito de voláteis, nenhum isolado bacteriano inibiu *Escovopsis* sp.

Tabela 3. Crescimento (em mm \pm desvio padrão) e taxa de inibição de *Escovopsis* sp., *Metarhizium anisopliae*, *Trichoderma* sp. e *Leucoagaricus gongylophorus*, após dez dias sob efeito de voláteis de três isolados de actinobactérias.

Actinobactéria	ID	FD	G	RG	Inibição de Crescimento ^a
<i>Metarhizium anisopliae</i>		CV (%)=5.6			
Controle	6 \pm 0	38.17 \pm 0.68	6.36 ^{G1}	1.00a	0%
N.6-8	6 \pm 0	39.67 \pm 2.02	6.61	1.04a	0%
M.2-10	6 \pm 0	38.83 \pm 0.26	6.47	1,04a	0%
M.4-15	6 \pm 0	37.83 \pm 3.64	6.31	0.99a	1%
<i>Trichoderma</i> aff. <i>strigosellum</i>		CV (%)= 9.7			
Controle	6 \pm 0	63.0 \pm 0	10.50 ^{G1}	1.00a	0%
N.6-8	6 \pm 0	46.4 \pm 0.52	7.70	0.94a	6%
M.4-15	6 \pm 0	60.33 \pm 2.46	10.06	0.96a	4.2%
M.2-10	6 \pm 0	45.9 \pm 1.30	7.65	0.55b	18.8%
<i>Escovopsis</i> sp.		CV (%)= 0			
Controle	6 \pm 0	63.0 \pm 0	10.50	1.00a	0%
M.4-15	6 \pm 0	63.0 \pm 0	10.50	1.00a	0%
M.2-10	6 \pm 0	63.0 \pm 0	10.50	1.00a	0%
N.6-8	6 \pm 0	63.0 \pm 0	10.50	1.00a	0%
<i>Leucoagaricus gongylophorus</i>		CV (%)= 6.7			
Controle	6 \pm 0	18.03 \pm 0.19	3.01 ^{G1}	1.00a	0%
M.4-15	6 \pm 0	17.7 \pm 0.32	2.95	0.98a	2.8%
N.6-8	6 \pm 0	16.8 \pm 0.32	2.80	0.93ab	7.8%
M.2-10	6 \pm 0	16.0 \pm 1.67	2.66	0.92b	8%

ID: Diâmetro Inicial; FD: Diâmetro Final; G: Eficiência de crescimento do fungo na presença da actinobactéria; G= FD/ID; RG: Crescimento relativo na presença de actinobactéria RG= G/G₁; G₁: Eficiência de crescimento o fungo (Controle); ^aPorcentagem de inibição de crescimento do fungo. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

Discussão

Foi encontrada grande quantidade de actinobactérias no solo adjacente ao jardim de fungos das colônias de cortadeiras e, de acordo com alguns trabalhos, é sugerido que elas podem ser utilizadas a favor dessas formigas, uma vez que produzem compostos antifúngicos e antibióticos dentro da colônia [7, 25]. Dos nove isolados testados no presente estudo, dois de *Streptomyces* sp. e um de *Kitasatospora* sp. inibiram não só o fungo *Escovopsis* sp., como também o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e o fungo antagonista do cultivar simbiote de cortadeiras *Trichoderma* aff. *strigosellum*. É importante destacar que *Escovopsis* é um gênero de fungos parasitas especialistas de jardim de fungos de cortadeiras e actinobactérias do gênero *Streptomyces* e *Kitasatospora* podem ser encontradas facilmente em solos. É possível que essas bactérias, em associação com os compostos produzidos pelas glândulas metapleurais e mandibulares de formigas-cortadeiras, apresentem efeito sinérgico contra os fungos patogênicos. Ainda é difícil compreender claramente a dinâmica estabelecida pela relação de simbiose, termo aqui definido no seu sentido mais amplo e aplicado a uma multitude de relações [26], que há entre as formigas da subtribo Attina, actinobactérias, *L. gongylophorus* e *Escovopsis*. É percebido que as substâncias químicas produzidas pelas glândulas das formigas e também por actinobactérias podem ter ação generalista, ou seja, antagonizando o desenvolvimento de diversos fungos [14, 15, 27]. Desta forma, pode-se hipotetizar que os fungos patogênicos para colônias de formigas-cortadeiras presentes no solo adjacente ao ninho, apesar de constituírem um risco, são controlados pelas secreções das operárias bem como de secreções de algumas actinobactérias.

Alguns trabalhos reforçam o conceito de que as formigas-cortadeiras obtêm proteção de actinobactérias do solo, não apenas daquelas que são encontradas em sua cutícula ou no jardim de fungo. Em trabalho realizado com operárias de *Acromyrmex*, foi encontrada grande diversidade de actinobactérias; dentre elas várias dos gêneros *Streptomyces* e *Pseudonocardia* [25]. Em conjunto, essas actinobactérias produzem vários compostos antifúngicos e, assim, promovem a proteção da colônia contra infecção por *Escovopsis*, bem como contra outros fungos patogênicos. Tem sido hipotetizado que isolados de *Streptomyces* são

constantemente recrutados do solo, enquanto o gênero *Pseudonocardia* coevoluiu com as cortadeiras [25, 28]. Pouco se conhece sobre as actinobactérias associadas com a cutícula de operárias de formigas do gênero *Atta*. No entanto, é esperado que essas formigas consigam obter proteção contra diversos fungos a partir da diversidade microbiana do solo.

Na maioria das formigas da subtribo Attina, são encontradas actinobactérias em suas cutículas. Porém, em operárias do gênero *Atta*, a presença desses simbiontes é reduzida ou mesmo ausente e também não são encontradas estruturas morfológicas no seu exoesqueleto que sejam adaptadas ao desenvolvimento desses ectossimbiontes [20, 29]. Apesar de diversas tentativas de isolar actinobactérias em cutículas de operárias de *A. sexdens*, não foi obtido sucesso (observações pessoais). Uma vez que não existem evidências de cultivo de actinobactérias na cutícula de operárias do gênero *Atta*, é possível que essas operárias estabeleçam simbiose temporária adaptativa com microrganismos do solo produtores de substâncias antifúngicas e antibióticas e que vivem em alguma parte de seu ninho ou mesmo no interior do seu corpo.

As actinobactérias dos gêneros *Streptomyces*, *Nocardia* e *Kitasatospora* identificados nas amostras de solos de câmara de jardim de fungos são actinobactérias usualmente encontradas em solos, porém, somente o gênero *Streptomyces* e *Kitasatospora* têm sido associados às colônias de formigas-cortadeiras. A comparação dos isolados obtidos, por meio da árvore filogenética, com algumas sequências de *Streptomyces* obtidos de formigas do gênero *Atta* por Marsh et al. [20], demonstra que apenas o isolado N.3-11 apresenta similaridade com as sequências de *Streptomyces* isolados por esses autores supracitados.

Referências

1. Schadt CW, Classen AT (2007) Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry. Soil Sci Soc Am J 71:1420
2. Cardoso E, Tsai SM, Neves MCP (1992) Microbiologia do solo. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Campinas
3. Stamford, N. P., Stamford, T. L., Andrade, D. E. G. T., & Michereff SJ (2005)

- Microbiota dos solos tropicais. In: Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais. UFRPE, Recife
4. Michereff SJ, Andrade D, Menezes M (2005) Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais. Universidade Federal e Rural de Pernambuco, Recife
 5. Leite LFC, Araújo ASF (2007) Ecologia microbiana do solo. Embrapa Meio-Norte-Documents (INFOTECA-E) 24
 6. Araújo MS, Della Lucia TMC, Ribeiro GA, Kasuya MC. (2003) Impacto da queima controlada da cana-de-açúcar na nidificação e estabelecimento de colônias de *Atta bisphaerica* Forel (Hymenoptera: Formicidae). Neotrop Entomol 32:685–691 . doi: 10.1590/S1519-566X2003000400021
 7. Santos AV, Dillon RJ, Dillon VM, et al (2004) Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. FEMS Microbiol Lett 239:319–323
 8. Alves SB (1998) Controle microbiano de insetos. Fealq
 9. Shah PA, Pell JK (2003) Entomopathogenic fungi as biological control agents. Appl Microbiol Biotechnol 61:413–423
 10. Nascimento MO, Almeida Sarmiento R, Santos GR, et al (2017) Antagonism of *Trichoderma* isolates against *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. J Basic Microbiol 57:699–704
 11. Kredics L, Hatvani L, Naeimi S, et al (2014) Chapter 1 - Biodiversity of the Genus *Hypocrea/Trichoderma* in Different Habitats BT - Biotechnology and Biology of *Trichoderma*. Elsevier, Amsterdam, pp 3–24
 12. Reynolds HT, Currie CR (2004) Pathogenicity of *Escovopsis weberi*: the parasite of the attine ant-microbe symbiosis directly consumes the ant-cultivated fungus. Mycologia 96:955–959
 13. de Man TJB, Stajich JE, Kubicek CP, et al (2016) Small genome of the fungus

- Escovopsis weberi*, a specialized disease agent of ant agriculture. Proc Natl Acad Sci U S A 113:3567–3572 . doi: 10.1073/pnas.1518501113
14. Mendonça A de L, da Silva CE, de Mesquita FLT, et al (2009) Antimicrobial activities of components of the glandular secretions of leaf cutting ants of the genus *Atta*. Antonie Van Leeuwenhoek 95:295–303 . doi: 10.1007/s10482-009-9312-0
 15. Sen R, Ishak HD, Estrada D, et al (2009) Generalized antifungal activity and 454-screening of *Pseudonocardia* and *Amycolatopsis* bacteria in nests of fungus-growing ants. Proc Natl Acad Sci 106:17805–17810
 16. Hart AG, Ratrieks FLW (2002) Waste management in the leaf-cutting ant *Atta colombica*. Behav Ecol 13:224–231
 17. Farji-Brener AG, Elizalde L, Fernández-Marín H, Amador-Vargas S (2016) Social life and sanitary risks: evolutionary and current ecological conditions determine waste management in leaf-cutting ants. Proc R Soc B Biol Sci 283:
 18. Scott JJ, Budsberg KJ, Suen G, et al (2010) Microbial community structure of leaf-cutter ant fungus gardens and refuse dumps. PLoS One 5:e9922
 19. Aylward FO, Burnum KE, Scott JJ, et al (2012) Metagenomic and metaproteomic insights into bacterial communities in leaf-cutter ant fungus gardens. ISME J 6:1688
 20. Marsh SE, Poulsen M, Gorosito NB, et al (2013) Association between *Pseudonocardia* symbionts and *Atta* leaf-cutting ants suggested by improved isolation methods. Int Microbiol 16:17–25 . doi: 10.2436/20.1501.01.176
 21. Stach JEM, Maldonado LA, Ward AC, et al (2003) New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments. Environ Microbiol 5:828–841
 22. Bora N, Ward A (2015) Analyzing the Metagenome of Smear Cheese Flora Using Next Generation Sequencing Tools. 137–153

23. Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870–1874 . doi: 10.1093/molbev/msw054
24. Ortiz A, Orduz S (2001) *In vitro* evaluation of *Trichoderma* and *Gliocladium* antagonism against the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. *Mycopathologia* 150:53–60 . doi: 10.1023/A:1010843413085
25. Barke J, Seipke RF, Grüşchow S, et al (2010) A mixed community of actinomycetes produce multiple antibiotics for the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. *BMC Biol* 8:109 . doi: 10.1186/1741-7007-8-109
26. de Bary A (1879) De la symbiose. *Rev Int des Sci* 3:301–309
27. Vander Meer R (2012) Ant interactions with soil organisms and associated semiochemicals. *J Chem Ecol* 38:728–745 . doi: 10.1007/s10886-012-0140-8
28. Barke J, Seipke R, Yu D, Hutchings M (2011) A mutualistic microbiome: How do fungus-growing ants select their antibiotic-producing bacteria? *Commun Integr Biol* 4:41–43 . doi: 10.4161/cib.4.1.13552
29. Currie CR, Poulsen M, Mendenhall J, et al (2006) Coevolved crypts and exocrine glands support mutualistic bacteria in fungus-growing ants. *Science* 311:81–83 . doi: 10.1126/science.1119744

CAPÍTULO 3 – Colônias de *Atta sexdens* aceitam formulações granuladas de *Escovopsis* sp.

- Sugestão de periódico para publicação: Pesquisa Agropecuária Brasileira

Resumo

As formigas-cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae) cultivam o fungo simbiote mutualista *Leucoagaricus gongylophorus* (Basidiomycota: Agaricales) para sua nutrição. *Escovopsis* sp. é um gênero de fungo que se tornou parasita especializado do fungo simbiote cultivado pelas cortadeiras, porém ainda não é clara a forma de transmissão desse parasita para as colônias. O objetivo deste trabalho foi verificar a aceitação e incorporação de iscas contendo micélio de *Escovopsis* sp. em colônias de *Atta sexdens*. Verificou-se o transporte de iscas em todas as colônias do teste e, ainda, foi verificado que as colônias que receberam iscas com fungo gastaram menor tempo para que o primeiro grânulo de isca entrasse no jardim de fungo. Houve redução no peso do jardim de fungos das colônias que receberam iscas com *Escovopsis* sp., e aumento no peso do jardim de fungos de colônias que receberam tratamento controle. Pode-se concluir que a utilização de iscas com micélio de *Escovopsis* sp. misturado com polpa cítrica foi satisfatória para introduzir o fungo parasita no jardim de fungos de colônias de *Atta sexdens*.

Palavras-chaves: *Atta*, fungo parasita, bioformulações e formigas-cortadeiras.

Abstract

The leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) cultivate the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Basidiomycota: Agaricales) for their nutrition. *Escovopsis* sp. is a fungus that has become a specialized parasite of the symbiotic fungus cultivated by the cutters, but it is still unclear how this parasite is transmitted to the colonies. The objective of this work was to verify the acceptance and incorporation of baits containing mycelium of *Escovopsis* sp. in colonies of *Atta sexdens*. We verified the transport of baits in all the colonies of the test and also noticed that the colonies that received baits with fungus spent less time for the first bait granule to enter the fungus garden. There was a reduction in the weight of the fungus garden of the colonies that received baits with *Escovopsis* sp., and an increase in the weight of the fungus garden of colonies that received control treatment. We can conclude that the use of baits with mycelium of *Escovopsis* sp. mixed with citrus pulp was satisfactory to introduce the fungus parasite in the fungus garden of *A. sexdens* colonies.

Keywords: *Attina*, parasitic fungus, bioformulations and leaf-cutting ants.

Introdução

As formigas da subtribo *Attina* cultivam o fungo simbiote mutualista para sua nutrição. Essa associação fungo-inseto evoluiu até o ponto em que as formigas e o fungo mutualista não podem viver isoladamente (Mueller et al., 2005). As formigas-cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae) dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, conhecidas como saúvas e quenquéns respectivamente, transportam material vegetal fresco que serve de substrato para o fungo cultivado *Leucoagaricus gongylophorus* (Basidiomycota: Agaricales) (Della Lucia, 2011).

O fungo filamentososo do gênero *Escovopsis* sp. se tornou um parasita especializado do fungo simbiote cultivado pelas cortadeiras (Reynolds & Currie, 2004). Podemos encontrar modificações adaptativas em *Escovopsis* (por exemplo, genoma reduzido pela perda de genes envolvidos no metabolismo do material vegetal, quando comparado com parentes fúngicos próximos) comprovando assim que houve coevolução para se adaptar ao estilo de vida de micoparasitismo (de Man et al., 2016). O mecanismo de transmissão de *Escovopsis* para as colônias ainda não é bem compreendido. Em trabalho recente de Augustin et al. (2017) ficou claro que os esporos do parasita podem estar dormentes em meio aos rejeitos da colônia, tornando-se ativos quando entram em contato com *L. gongylophorus*.

Um patógeno quando entra na colônia de formigas-cortadeiras é identificado pelas operárias por causa da divisão do trabalho que há entre as diferentes castas morfológicas (Little et al., 2006; Griffiths & Hughes, 2010; Montoya-Lerma et al., 2012). Aliado a este comportamento social, é destacado também que a cavidade infrabucal das formigas funciona como um aparato capaz de filtrar e neutralizar partículas. Nesta cavidade, os esporos são armazenados sob a forma de "pellets" e são eliminados como rejeitos (Della Lucia, 2011). Desta forma, é um desafio introduzir microrganismos patogênicos na colônia, quando se trata de controle biológico aplicado.

A tentativa de introduzir esporos de *Escovopsis* sp. em colônias de *Atta* misturados com flocos de aveia e de arroz não foi bem sucedida, uma vez que não houve o transporte desses substratos contaminados para o jardim de fungos, sendo descartados pelas operárias (Zamunér, 2015). Entretanto, em ensaios que

camuflaram esporos de diferentes fungos entomopatogênicos em iscas com polpa cítrica, foram observados boa aceitação e pouca rejeição dessas iscas pelas operárias (Lopez & Orduz, 2003; Cardoso et al., 2012). Esporos de *Escovopsis* sp. são detectados e rejeitados por operárias de formigas-cortadeiras; assim, a introdução da forma micelial do fungo parasita pode ser mais eficiente, desta forma, o objetivo desse trabalho foi verificar a aceitação e incorporação de iscas contendo micélio de *Escovopsis* sp. em colônias de *Atta sexdens*.

Material e métodos

Crescimento massal de micélio de *Escovopsis* sp.

O fungo *Escovopsis* sp. (LESF 1110, Central de Recursos Microbianos da UNESP, CRM-UNESP), isolado do jardim de fungo de uma colônia *Acromyrmex balzani* coletada no *Campus* de Gurupi da Universidade Federal do Tocantins, foi cultivado em placa de Petri com meio de cultura batata dextrose ágar (BDA), pH 6,5, em temperatura de 25 ± 1 °C durante sete dias. Posteriormente, cinco discos com o micélio e esporos de *Escovopsis* sp. foram adicionados em 250 ml de meio de cultura nutritivo líquido estéril - caldo de batata e dextrose. O recipiente com o meio de cultura permaneceu em mesa agitadora magnética com agitação de 500 rpm em sala climatizada de 25 ± 2 °C, por 10 dias. Após o crescimento do micélio do fungo, o meio líquido misturado com hifas foi filtrado usando papel filtro qualitativo (Nº 40, Whatman®).

Preparo de iscas com polpa cítrica

Para a confecção das iscas com micélio fúngico, foram misturados: polpa cítrica (50%), farinha de trigo (30%) e micélio de *Escovopsis* sp. (20%). Para as iscas sem fungo (controle), foram misturadas: polpa cítrica (70%) e farinha de trigo (30%). A polpa cítrica foi previamente liofilizada e triturada para a obtenção de um pó fino. Os ingredientes foram misturados em misturador elétrico (Philips Walita®, modelo RI1364/0) juntamente com água para obter uma mistura pastosa. Essa mistura pastosa foi colocada em tubo com bico de 0,3 cm de diâmetro e pressionado para moldagem das iscas. Para a secagem, as iscas permaneceram sob ventilação

constante em temperatura de 15 ± 1 °C por 48hs. As iscas secas foram então cortadas do tamanho de 0,5 cm (Figura 1).



Figura 1. Iscas produzidas com mistura de polpa cítrica e farinha de trigo, com *Escovopsis* sp. e sem *Escovopsis* sp. (controle), que foram oferecidas para colônias de *A. sexdens*.

Fornecimento de iscas para colônias jovens de *Atta sexdens*

Foram utilizadas cinco colônias jovens de *A. sexdens* de aproximadamente cinco meses. O jardim de fungos estava sendo desenvolvido em pote plástico (10 cm de altura x 6 cm de diâmetro) com gesso no fundo e tampa com furos. O pote com o jardim de fungos foi colocado em outro conjunto de potes maiores, sendo potes (10 cm altura x 13 cm diâmetro) e conectados por um tubo de 2,5 cm de diâmetro (figura 2). Foram fornecidas diariamente folhas de *Acalypha wilkesiana* e flocos de cereais para as colônias e permaneceram em sala com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo (12 horas luz: 12 horas escuro). As colônias ficaram sem receber alimento por um período de 24 horas antes do fornecimento das iscas. Duas colônias receberam iscas com *Escovopsis* sp. e três colônias receberam iscas sem fungo (controle). Foram realizados três fornecimentos de iscas, sendo oferecidas 0,5 g de iscas em cada vez, com intervalo de sete dias, totalizando 21 dias de experimento. No dia do oferecimento da isca para as colônias foi verificada a viabilidade do fungo, sendo colocadas as iscas em placa de Petri com BDA contendo *L. gongylophorus* crescido previamente. Durante o fornecimento das iscas, foram anotados o tempo (em minutos) para a entrada da primeira isca no pote com jardim de fungos. Após 24 horas do oferecimento das iscas,

foram coletadas as iscas rejeitadas, ou seja, que não foram transportadas para o jardim de fungos. O lixo produzido pelas colônias foi coletado diariamente após o fornecimento das iscas durante sete dias. O desenvolvimento do jardim de fungo (massa fresca, em gramas) foi avaliado pesando-se o pote com o jardim de fungo no início e no final do experimento. O lixo produzido e as iscas rejeitadas foram previamente desidratados para serem pesados em balança analítica. Uma porção do lixo produzido de cada semana, após ser desidratado, foi colocado em placa de Petri com BDA contendo *L. gongylophorus* crescido previamente para verificar a presença de *Escovopsis* sp.



Figura 2. Conjunto de potes utilizados para o desenvolvimento de colônias de *A. sexdens* e fornecimento de iscas.

Resultados e discussão

Verificou-se o transporte de iscas em todas as colônias do teste e, ainda, percebe-se que as colônias que receberam iscas com fungo gastaram menor tempo para que o primeiro grânulo de isca entrasse no jardim de fungo, quando comparadas às colônias que receberam o tratamento controle (Tabela 1). Desta forma, ficou demonstrado que as iscas foram atrativas para as operárias. Outro fator importante que pode-se destacar é que, aparentemente, as operárias não conseguiram detectar a presença do patógeno na isca e fizeram a sua incorporação no jardim de fungos. Foi verificado o crescimento do fungo *Escovopsis* sp. nas amostras de iscas que foram colocadas em placas de Petri, comprovando assim a viabilidade do fungo no dia do experimento. Outros autores tentaram incorporar esporos de *Escovopsis* sp. em

colônias de cortadeiras por meio de pulverização do jardim de fungos e também aderidos a substratos utilizados para alimentação e perceberam que houve uma rápida detecção pelas formigas. Em colônias em que foram pulverizadas suspensão de esporos de *Escovopsis* em seu jardim de fungos, as operárias realizaram a poda das áreas infectadas (Currie, 2001) e em colônias que receberam cereais contaminados com esporos de *Escovopsis* houve o transporte do cereal contaminado diretamente para o descarte de lixo (Zamunér, 2015). Quando Zamunér (2015) forneceu iscas peletizadas com esporos de *Escovopsis*, verificou-se o carregamento normal e incorporação destas ao jardim de fungos, porém não houve alteração no crescimento do jardim de fungos, sendo então constatado que os esporos não germinaram em placas de Petri com meio de cultura.

Tabela 1. Tempo médio (em minutos) \pm desvio padrão para a entrada da primeira isca no pote com o jardim de fungos.

Colônia	1° Fornecimento	2° Fornecimento	3° Fornecimento	Tempo médio
1- Tratamento fungo	1,77	6,2	3,75	4,77 \pm 1,22
2- Tratamento fungo	5,28	8,13	3,5	
3- Tratamento controle	4,55	0,67	1,5	6,79 \pm 4,00
4- Tratamento controle	9,75	14,63	5,03	
5- Tratamento controle	8,87	12,58	3,53	

Após 21 dias do primeiro fornecimento de iscas e observação das colônias, foi verificado a redução no peso do jardim de fungos das colônias que receberam iscas com *Escovopsis* sp. (colônias 1 e 2), e aumento no peso do jardim de fungos de colônias que receberam tratamento controle (colônias 3, 4 e 5). Nas colônias 1 e 2 houve também maior produção de lixo que as colônias 3, 4 e 5. As colônias 1 e 2 apresentaram maior rejeição de iscas (Figura 3). A partir dessas observações, sugere-se que o fungo *Escovopsis* sp. presente na isca foi capaz de contaminar o jardim de fungos das colônias 1 e 2, causando assim prejuízo no desenvolvimento dessas colônias, chegando a reduzir o crescimento em 76,6% na colônia 1 e em 1,8 % na colônia 2. Conseqüentemente maiores quantidades de produção de lixo foram observadas nessas colônias que receberam o tratamento com fungo. Houve o

crescimento de *Escovopsis* sp. nas três amostras de lixo descartado pelas colônias 1 e 2, evidenciando assim a contaminação do fungo simbiote com o parasita.

Pode-se concluir que a utilização de iscas com micélio de *Escovopsis* sp. misturado com polpa cítrica foi satisfatório para introduzir esse fungo parasita no jardim de fungos de colônias de formigas-cortadeiras.

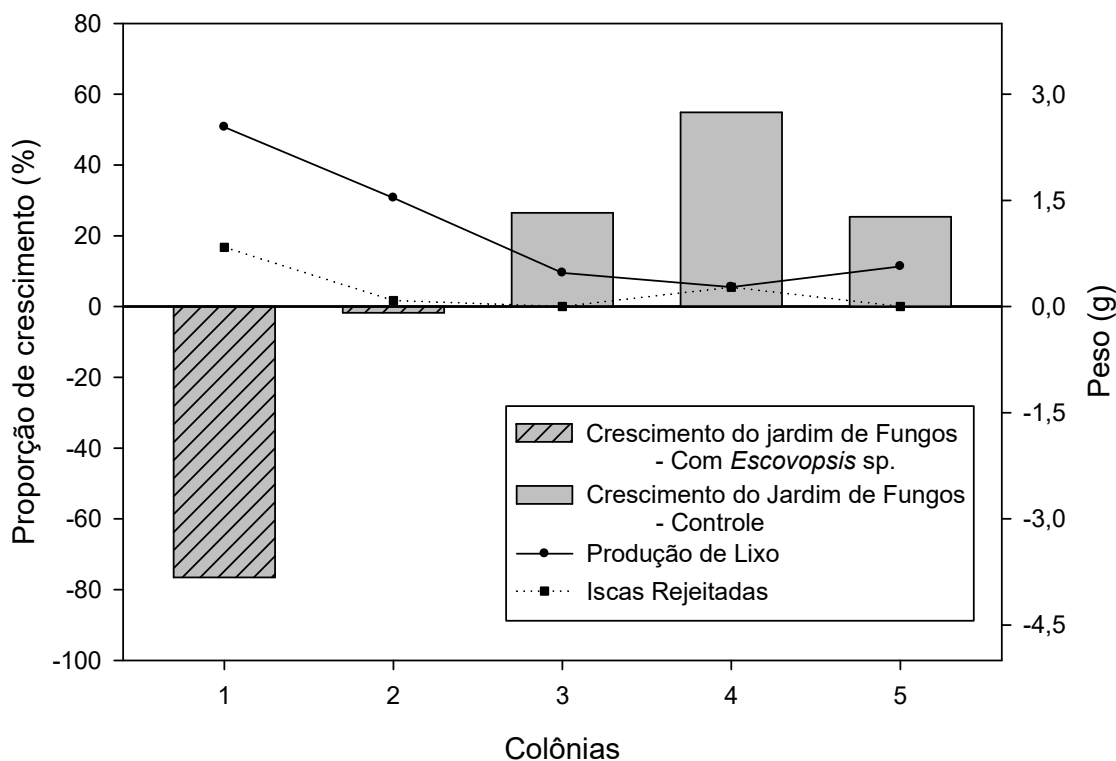


Figura 3. Proporção de crescimento do jardim de fungos, produção de lixo e iscas rejeitadas, após três fornecimentos de iscas com micélios de *Escovopsis* sp. (colônias 1 e 2) e iscas sem fungo (colônias 3, 4 e 5).

Referências

Augustin JO, Simões TG, Dijksterhuis J, Elliot SL & Evans HC (2017) Putting the waste out: a proposed mechanism for transmission of the mycoparasite *Escovopsis* between leafcutter ant colonies. Royal Society Open Science 4:161013.

Cardoso SRS, Nagamoto NS, Forti LC & Souza ES (2012) Carrying and Effect of Granulated Baits Formulated with Entomopathogenic Fungi among *Atta sexdens rubropilosa* Colonies (Hymenoptera: Formicidae). Sociobiology:681–689.

- Currie CR (2001) Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. *Oecologia* 128:99–106.
- Griffiths HM & Hughes WOH (2010) Hitchhiking and the removal of microbial contaminants by the leaf-cutting ant *Atta colombica*. *Ecological Entomology* 35:529–537.
- Little AEF, Murakami T, Mueller UG & Currie CR (2006) Defending against parasites: fungus-growing ants combine specialized behaviours and microbial symbionts to protect their fungus gardens. *Biology Letters* 2:12–16.
- Lopez E & Orduz S (2003) *Metarhizium anisopliae* and *Trichoderma viride* for control of nests of the fungus-growing ant, *Atta cephalotes*. *Biological Control* 27:194–200.
- Della Lucia TMC (2011) Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo. da UFV.
- de Man TJB, Stajich JE, Kubicek CP, Teiling C, Chenthamara K, Atanasova L, Druzhinina IS, Levenkova N, Birnbaum SSL, Barribeau SM, Bozick BA, Suen G, Currie CR & Gerardo NM (2016) Small genome of the fungus *Escovopsis weberi*, a specialized disease agent of ant agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113:3567–3572.
- Montoya-Lerma J, Giraldo-Echeverri C, Armbrrecht I, Farji-Brener A & Calle Z (2012) Leaf-cutting ants revisited: Towards rational management and control. *International Journal of Pest Management* 58:225–247.
- Mueller UG, Gerardo NM, Aanen DK, Six DL & Schultz TR (2005) The evolution of agriculture in insects. *Annual Review Ecology, Evolution, and Systematic* 36:563–595.
- Reynolds HT & Currie CR (2004) Pathogenicity of *Escovopsis weberi*: the parasite of the attine ant-microbe symbiosis directly consumes the ant-cultivated fungus. *Mycologia* 96:955–959.
- Zamunér CFC (2015) Biocontrole de formigas-cortadeiras utilizando o fungo *Escovopsis*. Universidade Estadual Paulista (UNESP).

CONCLUSÃO GERAL

Os resultados dos trabalhos apresentados apontam que as colônias incipientes de *Atta sexdens* estão submetidas à forte pressão seletiva de microrganismos do solo no momento da fundação. Após o surgimento da força operária, os mecanismos de defesa imune social garantem o desenvolvimento da colônia a despeito da presença de microrganismos patogênicos que estão presentes no solo do ninho.

Em solos de câmaras de jardim de fungos foram encontrados dois isolados de *Streptomyces* sp. e um de *Kitasatospora* sp. que inibiram não só o fungo *Escovopsis* sp., como também o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* e o fungo antagonista do cultivar simbiote de cortadeiras *Trichoderma* aff. *strigosellum*. Desta forma, pode-se hipotetizar que os fungos patogênicos para colônias de formigas-cortadeiras presentes no solo adjacente ao ninho, apesar de constituírem um risco, são controlados pelas secreções das operárias bem como de secreções de algumas actinobactérias.

Podemos concluir também que a utilização de iscas com micélio de *Escovopsis* sp. misturado com polpa cítrica foi satisfatório para introduzir esse fungo parasita no jardim de fungos de colônias de formigas-cortadeiras.