

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS PRESENTES
EM JARDINS DE FUNGOS DE *Acromyrmex balzani* (EMERY, 1890)
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

PATRÍCIA BATISTA DE OLIVEIRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2020

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS PRESENTES
EM JARDINS DE FUNGOS DE *Acromyrmex balzani* (EMERY, 1890)
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

PATRÍCIA BATISTA DE OLIVEIRA

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

Orientador: Prof. Dr. Richard Ian Samuels

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FEVEREIRO - 2020

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

O48	Oliveira, Patrícia Batista de.
<p>ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS PRESENTES EM JARDINS DE FUNGOS DE <i>Acromyrmex balzani</i> (EMERY, 1890) (HYMENOPTERA : FORMICIDAE) / Patrícia Batista de Oliveira. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2020.</p>	
<p>50 f. : il. Bibliografia: 30 - 39.</p>	
<p>Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2020. Orientador: Richard Ian Samuels.</p>	
<p>1. Formigas. 2. Microrganismos. 3. Material vegetal. 4. Diversidade . 5. Antagonismo . I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.</p>	
<p>CDD - 630</p>	

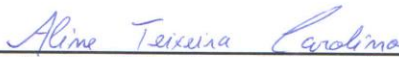
ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS PRESENTES
EM JARDINS DE FUNGOS DE *Acromyrmex balzani* (EMERY, 1890)
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE)

PATRICIA BATISTA DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestra em Produção Vegetal.

Aprovado em 19 de fevereiro de 2020

Comissão Examinadora



Dr^a. Aline Teixeira Carolino (D.Sc. Produção Vegetal) – UENF (Coorientadora)



Dr^a. Denise Dolores Oliveira Moreira (D.Sc. Produção Vegetal) – UENF



Prof. Dr. Milton Erthal Jr. (D.Sc. Produção Vegetal) – IFF



Prof. Richard Ian Samuels (Ph.D. Patologia de Insetos) – UENF
(Orientador)

DEDICO

A DEUS,

Por sempre guiar meus passos, permitindo que eu chegasse até aqui.

A MINHA FAMÍLIA,

Minha mãe Maria e minhas irmãs que dignamente me apresentaram a importância da família, e o caminho da persistência e da honestidade.

A TODOS OS VERDADEIROS AMIGOS,

Que apesar da distância ou falta de contato contínuo, sempre seremos amigos, independente de tempo ou distância.

“Ninguém caminha sem aprender a caminhar, sem aprender a fazer o caminho caminhando, refazendo e retocando o sonho pelo qual se pôs a caminhar.”
(Paulo Freire)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre guiar meus passos, permitindo que mesmo nas adversidades mais uma etapa em minha vida se cumprisse, fazendo da capacidade que me foi concedida um instrumento para crescer, aprender e ensinar.

A minha querida mãe, a quem dedico esta dissertação, a maior amiga que esta vida me deu, pelo apoio incondicional e pelos valores que sempre me transmitiu, entre os quais a força para nunca desistir de lutar.

As minhas irmãs Solange e Valéria, pela força, incentivo, ajuda e principalmente pelo grande apoio na minha jornada acadêmica, pois sem elas talvez eu não estivesse chegado onde estou.

A minha parceira de laboratório, e agora da vida, Thais Berçot. Agradeço pelo companheirismo, por toda a ajuda durante estes dois anos, pela paciência e ajuda em todos os momentos, desde que cheguei em Campos. Serei eternamente grata, você tem o meu eterno amor.

A minha coorientadora e amiga Aline Teixeira. Obrigada pelo incansável apoio, orientação, sabedoria, experiência e disponibilidade manifestadas. Sem a sua colaboração, confiança, paciência e persistência, nunca teria sido possível concluir tudo isso sozinha.

Pela minha segunda mãe que o mestrado me proporcionou, Denise Moreira. Obrigada por todo o conhecimento compartilhado, disponibilidades manifestadas, todos os conselhos e incentivos, pelos momentos de lazer. Por toda a orientação durante o projeto, sobretudo, pela amizade. Serei eternamente grata. Sem a sua colaboração tudo isso provavelmente um caminho mais difícil.

Agradeço à Veronica por toda disposição em ajudar com a minha pesquisa, se fazendo presente em todas as coletas realizadas.

A minha companheira e amiga Thais Moraes. Obrigada por todos os momentos felizes e tristes que passamos juntas, por dividir o nosso apê que é uma casa meio louca, mas é o nosso canto que, de alguma forma, sempre lembrarei com todo amor e carinho. Obrigada por tudo, serei eternamente grata.

A minha amiga e companheira Carol, que tive o prazer de conhecer no mestrado. Obrigada por todos os momentos vividos, pelos dias felizes e por segurar minha mão quando achava que não aguentaria mais. Serei eternamente grata por todo apoio e dedicação.

Agradeço a minha irmã e amiga Mayara, que mesmo com toda distância sempre esteve disposta a ouvir e me entender, principalmente nos momentos que achava que não aguentaria.

Aos meus amigos Victor Ventura, Thaís Marchiorri, Jéfica, Thaís Chequer e Livia, independente da distância, tempo ou falta de contato contínuo, sempre seremos amigos.

Aos amigos que me proporcionaram momentos maravilhosos e que tive o prazer de conhecer, Otalício, Thiago, Gabriella e Leandro.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e ao Laboratório de Entomologia e Fitopatologia.

Agradeço à FAPERJ, pela concessão da bolsa de estudos e pelo financiamento da pesquisa.

Um agradecimento mais que especial, ao meu orientador Richard Ian Samuels por todo o conhecimento compartilhado, por toda a orientação durante o projeto.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Formigas Cortadeiras	3
2.2. Formiga cortadeira <i>Acromyrmex balzani</i>	4
2.3. Associação Formiga Fungo	5
2.4. Leveduras nos jardins de fungo de formigas cortadeiras	5
2.5. Associação entre microrganismos e ninhos de formigas Attini.....	6
2.6. Controle de formigas cortadeiras	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. Coletas do fungo simbiote em campo	10
3.2. Isolamento de leveduras	11
3.3. Caracterização das leveduras através de método de Gram.....	12
3.4. Teste bioquímico para identificação das leveduras	13
3.5. Bioensaios de antagonismo de leveduras contra fungos patogênicos	13
3.6. Origens das leveduras utilizadas	14

3.7. Análises dos dados.....	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

RESUMO

OLIVEIRA, Patrícia Batista. M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Fevereiro de 2020; Isolamento e caracterização de leveduras presentes em jardins de fungos de *Acromyrmex balzani* (Emery, 1890) (Hymenoptera Formicidae). Orientador: Prof. Richard Ian Samuels. Coorientadora: Dr.^a Aline Teixeira Carolino

As formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* mantêm uma associação mutualística com o fungo basidiomiceto *Leucoagaricus gongylophorus*, cultivado para alimento, o qual é responsável pela produção de enzimas que degradam o material vegetal transportado para o interior dos ninhos. Além do fungo mutualista, uma ampla microbiota constituída por fungos filamentosos, bactérias e leveduras, estão associados aos ninhos e também contribui para a degradação dos tecidos vegetais. O presente trabalho objetivou conhecer a diversidade de leveduras encontradas em ninhos de *Acromyrmex balzani* no município de Campos dos Goytacazes – RJ, e conhecer o papel desses microrganismos através de testes de antagonismo frente aos fungos patogênicos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e *Escovopsis* sp. Foram coletadas amostras de leveduras de 25 ninhos. As leveduras foram identificadas em dois gêneros (*Cândida* e *Rhodotorula*), com cinco espécies diferentes; *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cândida famata*, “Sp1” e “Sp2”. Nos ensaios foram obtidos isolados de leveduras que foram submetidos ao teste de antagonismo com os fungos patogênicos. Os resultados mostraram que todos os fungos foram significativamente inibidos pelas leveduras. Não houve efeito negativo no crescimento das leveduras *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa* e “Sp1”, quando expostas aos fungos *B. bassiana*,

Escovopsis e *M. anisopliae*. Entretanto, o crescimento dos isolados obtidos foram significativamente reduzidos quando expostos aos fungos. Os resultados mostraram que existe uma diversidade de leveduras presentes em ninhos de *A. balzani*. Dentre as espécies identificadas no presente estudo, a maioria apresentou a capacidade de inibir o fungo parasita de jardins de formigas cortadeiras *Escovopsis* sp. e os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae*. O ineditismo do presente trabalho é que ele apresenta o primeiro relato de associação da espécie *Cândida famata* com jardins de fungos de *A. balzani*.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Patrícia Batista. M.Sc., North Fluminense State University – Darcy Ribeiro. February 2020; Isolation and characterization of yeasts present in gardens of fungus of *Acromyrmex balzani* (Emery, 1890) (Hymenoptera: Formicidae). Advisor: Prof. Richard Ian Samuels. Co-advisor: Dr.^a Aline Teixeira Carolino.

Leaf-cutting ants of the genera *Atta* and *Acromyrmex* maintain a mutualistic association with the basidiomycete fungus *Leucoagaricus gongylophorus*, which is cultivate as a food source and is responsible for the production of extracellular enzymes that degrade the plant material transported into the nests. In addition to the mutualistic fungus, a range of microorganisms consisting of filamentous fungi, bacteria and yeasts are associated with nests, which can also contribute to the degradation of plant tissues. The work aimed to investigate the diversity of yeasts present in nests of *Acromyrmex balzani* in the municipality of Campos dos Goytacazes - RJ and to study the possible role of these microorganisms in the defence of ant nests using antagonism tests against the pathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Escovopsis* sp. Samples of yeasts from 25 nests were collected. Yeasts of two genera (*Cândida* and *Rhodotorula*), with five different species; *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cândida famata*, "Sp1" and "Sp2" were isolated. Antagonism bioassays using nine isolates were performed against the three pathogenic fungi. In the antagonism tests, all fungi were significantly inhibited by the yeasts. There was no effect on the growth of yeasts L1, L2, L6 and L9 when exposed to the pathogenic fungi. However, the growth of yeasts L3, L4, L5, L7, L8 and L9 was significantly reduced when exposed to the pathogenic fungi. These results show the diversity of yeasts present in nests of *A. balzani*. Among

the species identified here, most have the ability to inhibit the parasitic fungus of leaf-cutting ants *Escovopsis* sp. and entomopathogenic fungi *B. bassiana* and *M. anisopliae*. The novelty of this work is that it presents the first report of the association of the species *Cândida famata* with fungus gardens of *A. balzani*.

1. INTRODUÇÃO

As leveduras desempenham um papel importante na estabilidade de muitos ecossistemas (Lachance e Starmer, 1998). Esses microrganismos estão presentes em abundância na natureza, e são encontrados frequentemente em associação com uma ampla variedade de insetos (Vega e Dowd, 2005). Alguns insetos, portanto, podem abrigar leveduras em algumas partes do corpo como, pernas e exoesqueleto (Ganter, 2006). Diversos tipos de interações por levedura-inseto têm sido descritos até o momento (Vega e Dowd, 2005).

Uma dessas interações é a associação de leveduras com ninhos de formigas cultivadoras de fungo (Rodrigues et al., 2009). A tribo Attini, que engloba as formigas cortadeiras, são formigas que utilizam a degradação de materiais vegetais frescos para cultivar o fungo mutualista (*Leucoagaricus gongylophorus*) do qual se alimentam (Nickele et al., 2013). As cortadeiras pertencem aos gêneros *Atta* (saúvas) e *Acromyrmex* (quenquéns).

Essa interação se dá ao fato de que, além do fungo mutualista, as colônias de formigas Attini abrigam uma comunidade diversificada de microrganismos, incluindo leveduras (Youngsteadt, 2008), que são frequentemente isoladas de ninhos de formigas do gênero *Atta* e *Acromyrmex* (Carreiro et al., 2004; Pagnocca et al., 2008). Esses microrganismos também são encontrados em depósitos do material descartado pelas formigas (Carreiro et al., 1997). No entanto, leveduras também são encontradas na matéria orgânica dentro dos ninhos de formigas cortadeiras. Alguns estudos sobre o papel desses microrganismos presentes nos ninhos de formigas Attini, têm demonstrado que essas leveduras podem estar relacionadas à degradação dos substratos coletados pelas formigas (Arcuri et al., 2014; Melo, 2014).

Pouco se sabe sobre a diversidade e a função das leveduras presentes nos ninhos de formigas da tribo Attini. Acredita-se que, de modo geral, as leveduras podem estar atuando de forma positiva nesses ambientes, visto que algumas espécies de leveduras têm se destacado na produção de diferentes enzimas hidrolíticas, capazes de degradar substratos presentes no material vegetal (Arcuri et al., 2014). Logo, mantém-se um campo aberto para explorar as funções desses microrganismos nos ninhos.

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo estudar a diversidade de leveduras isoladas de ninhos de *Acromyrmex balzani*, e o possível papel das leveduras na proteção dos ninhos contra fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* e o fungo parasita do jardim *Escovopsis* sp.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Formigas Cortadeiras

As formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, são caracterizadas como herbívoros dominantes da região Neotropical, e consideradas pragas importantes quando atacam plantas cultivadas (Hölldobler; Wilson, 1990). As formigas são insetos dominantes no mundo, tendo um maior número de espécies nos Trópicos (Fernández, 2003). Atualmente, elas compreendem quase 300 gêneros e 20 subfamílias, além de 70 gêneros conhecidos de fósseis (Jaime, 2010).

No Brasil as cortadeiras estão disseminadas e presentes em todos os estados, sendo uma preocupação constante nas mais diversas culturas econômicas do agronegócio, por causar grandes danos as produções, atacando plantas de todas as idades (Della Lucia; Araújo, 2000). As cortadeiras são encontradas tanto em área rural, quanto no ambiente urbano. Em cidades, essas pragas cortam plantas de pomares, jardins, praças e parques. Na área rural, acarretam danos em diferentes culturas, podendo dificultar o início de uma nova plantação (Forti; Ramos, 2002).

Os danos que essas formigas causam podem ser observados em um curto prazo de 24 horas. Nesse intervalo uma pequena colônia de cortadeiras desfolharia uma árvore inteira ou boa parte dela (Lima et al., 2001). As cortadeiras são consideradas uma das principais pragas agrícolas no Brasil, provocando prejuízos diretos e indiretos (Della Lucia e Souza 2011). Elas causam uma redução na quantidade de folhas, e isso acaba impactando o desenvolvimento das plantas, reduzindo sua frutificação e, conseqüentemente, a produção. É importante ressaltar

que esses insetos exibem preferência por espécies e plantas cultivadas, tais como: citros, eucalipto, milho e cana-de-açúcar (Krüger et al., 2010).

Essa espécie possui o hábito de cortar material vegetal e transportá-lo para os formigueiros, proporcionando substrato para o desenvolvimento do seu fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*, o qual é a principal fonte de alimento das larvas e das rainhas (Della Lucia et al., 2011). Essa simbiose gerou adaptações de interdependência que permitiu o desenvolvimento e manutenção desta relação através do hábito micófago, realizado pelas formigas (Bacci et al., 1995; Siqueira et al., 1998; Silva et al., 2006).

Schultz e Brady (2008), usando análises filogenéticas e moleculares, confirmaram que o hábito micófago teve origem há aproximadamente 50 milhões de anos na América do Sul. Tanto o fungo quanto as formigas são favorecidos com a relação simbiótica: o fungo fornece alimento para as formigas, e estas, por sua vez, fornecem substrato para o desenvolvimento do fungo e proteção contra parasitas ou competidores (Mueller, 2002).

2.2. Formiga cortadeira *Acromyrmex balzani*

No Brasil existem 20 espécies e 9 subespécies aceitas do gênero *Acromyrmex*, cujos ninhos podem ser encontrados em todo o território nacional. A distribuição geográfica, juntamente com a frequência e a densidade desse gênero, está diretamente ligada a fatores ambientais como: o tipo de solo, o tipo de vegetação e precipitação média anual (Della Lucia, 1993).

A espécie *Acromyrmex balzani* é específica em cortar fragmentos de monocotiledônea, em especial gramíneas (Melo, 2014). Desta forma, esta espécie pode causar grande impacto econômico em áreas de pastagens e cultivos de cana-de-açúcar, uma vez que causam danos severos às culturas, devido ao comportamento de corte para coleta de material vegetal para o cultivo de seu fungo simbiote (Della Lucia e Vilela, 1993).

A nidificação ocorre em locais abertos, ensolarados, e em solos de pouca umidade (Andrade, 1991). Seus ninhos são caracterizados por uma torre construída de fragmentos de palhas e outros resíduos vegetais (Pimenta et al., 2007). Próximo a essas torres encontram-se montículos de terra em formato semicircular, e ao lado dos montículos fica o lixo trazido do interior dos ninhos (Silva et al., 2010).

Pimenta *et al.* (2007) verificaram que os ninhos dessa formiga apresentam quatro ou cinco câmaras, sempre superpostas, com profundidade máxima de 95 cm, e o fungo se desenvolve sobre pedaços de gramíneas não muito recortadas. A rainha dessa espécie geralmente é encontrada na última câmara de fungo. Um ninho já estabelecido pode ter uma população que oscila de 337 a 2.832 indivíduos.

2.3. Associação Formiga Fungo

É definida como mutualismo uma interação benéfica, recíproca entre diferentes organismos. Estima-se que de 15 a 20% dos insetos vivem em simbiose com microrganismos (Buchner, 1965; Borsaux-eude e Gross, 2000). A associação formiga-fungo é muito antiga, datando de 45-60 milhões de anos (Müller *et al.*, 2001).

Como já referido, as cortadeiras são caracterizadas por cultivarem jardins de fungo nas câmaras de seus ninhos. Esses jardins representam sua principal fonte de alimento numa relação de mutualismo obrigatória, onde o fungo é utilizado como principal recurso alimentar para as rainhas, larvas e operárias, que em retribuição, fornecem ao fungo substratos para seu crescimento e proteção (Nickele *et al.*, 2013).

O simbionte raramente produz a estrutura de reprodução sexuada (basidioma) necessária para identificação clássica (Rodrigues, 2009). Em casos raros de aparecimento dessa estrutura, o fungo foi identificado como *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer, 1986; Pagnocca *et al.*, 2001). Sua principal característica morfológica é a presença de gongilídeos, estruturas formadas na extremidade das hifas que contêm nutrientes, utilizados na alimentação dos indivíduos (Simões, 2018). Um estudo realizado por Müller *et al.* (2010) indica que todas as formigas cortadeiras cultivam apenas uma espécie de fungo mutualista e, em cada colônia, existe apenas uma única linhagem do fungo.

2.4. Leveduras nos jardins de fungo de formigas cortadeiras

O aparecimento de leveduras associadas às formigas cortadeiras ou seus jardins, tem sido relatado por vários autores. Estudos realizados por Craven *et al.*

(1970) demonstraram grandes quantidades de leveduras nos jardins de fungos das formigas cortadeiras *Atta cephalotes* e *Acromyrmex octospinosus*. Nos estudos de Viela *et al.* (1983), foram relatadas presença de diferentes espécies de leveduras em ninhos de *A. sexdens rubropilosa* e *A. laevigata*, as quais foram identificadas como sendo dos gêneros *Cândida*, *Rhodotorula* e *Kloeckera*.

Em seus estudos, Pagnocca *et al.* (1996) encontraram leveduras em jardins de fungo, depósito de lixo e em ninhos de laboratório de *Atta sexdens rubropilosa*, sugerindo que várias partes dos ninhos seriam ambientes propícios para esse grupo de microrganismos. Carreiro *et al.* (1997), realizaram um dos primeiros estudos sistemáticos de leveduras em jardins, investigando as leveduras de ninhos de laboratório de *A. sexdens rubropilosa*.

Carreiro *et al.* (1997) isolaram leveduras dos jardins de 19 ninhos, dos depósitos de lixo, do tegumento das formigas, das folhas que as operárias coletavam e do fundo das câmaras onde ficam os jardins de fungos para fim de identificação desses microrganismos. Os autores encontraram sete gêneros de leveduras em jardins de formigas cortadeiras e no material descartado pelas colônias, incluindo uma ampla distribuição do gênero *Cândida*. Eles propuseram que as leveduras podem ser introduzidas nos ninhos pelas próprias operárias, que podem adquiri-las no contato com os diversos tipos de materiais vegetais no ato de forragear.

2.5. Associação entre microrganismos e ninhos de formigas Attini

O jardim de fungo das formigas Attini pode ser considerado um microambiente que abriga uma diversa comunidade de microrganismos (Youngsteadt, 2008). Além do fungo simbiote, fungos do gênero *Escovopsis* e vários gêneros de actinomicetos, por exemplo, são frequentemente encontrados em ninhos de formigas da tribo Attini (Currie *et al.*, 1999).

Currie *et al.* (2003) relataram que os fungos do gênero *Escovopsis* são parasitas especializados da ordem Ascomycota, isolados de jardins e lixeiras de formigas da tribo Attini. Esse microrganismo gera um grande impacto no desenvolvimento dos jardins de fungo cultivado pelas formigas e, conseqüentemente, podem matar o ninho. Entretanto, existem muitos relatos de

outros fungos, leveduras e bactérias presentes nos jardins desses insetos (Van Borm et al., 2002; Rodrigues et al., 2005).

Por muito tempo esses microrganismos foram considerados contaminantes da fungicultura das formigas Attini (Currie, 2003). Apesar de relatar a presença desses microrganismos, poucos foram os estudos que investigaram o papel deles na simbiose. Assim, é possível que tanto bactérias e leveduras, quanto outros fungos encontrados nesse ambiente, exerçam funções específicas, como a digestão do substrato vegetal nos jardins de fungos, produção de nutrientes essenciais para as formigas, ou mesmo a produção de substâncias que atuem no controle de microrganismos indesejáveis à cultura do fungo simbiote (Mueller et al., 2005).

Bactérias do gênero *Burkholderia*, isoladas de jardins de fungos de *Atta sexdens rubropilosa* são capazes de produzir antifúngicos que inibem a germinação de esporos de *Metarhizium anisopliae* e *Escovopsis* sp. (Santos et al., 2004). Não se sabe detalhes da associação dessa bactéria com as formigas, pois somente foi encontrada em uma espécie de formiga cortadeira, porém, estudos como de Santos sugerem que existam nas colônias das Attini, vários microrganismos a serem estudados, bem como muitas interações do tipo microrganismo-microrganismo e microrganismo-inseto, a serem caracterizadas.

Com isso, a busca por microrganismos presentes nos ninhos das formigas resultou na descrição de duas novas espécies de leveduras: *Cryptococcus haglerorum* (Middelhoven et al., 2003) e *Sympodiomyces attinorum* (Carreiro et al., 2004). Foi demonstrado que as leveduras, bem como bactérias isoladas de ninhos de laboratório de *A. sexdens rubropilosa*, hidrolisam os polissacarídeos presentes no material vegetal dos jardins de fungos (Carreiro, 2000). Desse modo, foi sugerido que tais microrganismos provavelmente auxiliem o fungo simbiote na degradação das folhas, facilitando seu acesso aos nutrientes presentes dentro do material vegetal.

2.6. Controle de formigas cortadeiras

Na agricultura brasileira e mundial, o controle químico é o método mais utilizado para combate de pragas, seja para médios ou grandes produtores. Este método consiste em aplicações de produtos químicos (inseticidas, fungicidas,

bactericidas), cujo objetivo é reduzir a população de pragas e doenças de plantas, reduzindo a perda na produtividade, gerando um ganho econômico para o produtor (Moreira et al., 2002).

Em relação às formigas cortadeiras, isso não é diferente e o seu controle é frequentemente realizado por meio de controle químico (Buratto et al., 2012). Esses produtos são aplicados diretamente em seus ninhos, nas formulações em pó, líquida, ou na forma de iscas granuladas, colocadas nas proximidades das colônias. Ressalta-se que a forma mais usada são as iscas tóxicas granuladas (Giesel, 2007; Bueno, 2013).

A excessiva aplicação de produtos químicos, no entanto, tornou-se um grande problema para o meio ambiente, já que este método tem consequências a longo prazo, e seus efeitos sobre o ecossistema podem ser irreversíveis (Veiga et al., 2006). A aplicação de produtos químicos pode ser prejudicial de diversas formas: afetando organismos não alvo, prejudicando saúde humana, podendo contaminar o solo e os sistemas hídricos, resultando em uma degradação ambiental que teria como consequência prejuízos eminentes (Veiga et al., 2006).

Não obstante, as formigas cortadeiras continuam desafiando todos os esforços planejados para minimizar seus danos (Leal et al., 2014). Tem-se desenvolvido produtos químicos cada vez mais potentes e especializados, e equipamentos cada vez mais sofisticados, mas a situação permanece quase inalterada (Jung et al., 2013). Entretanto, o uso de estratégias de controle biológico poderia ser um alternativo viável para o manejo de pragas.

O princípio básico do controle biológico é a ação de parasitoides, predadores ou patógenos, que têm a função de manter a densidade de outros organismos mais baixa, do que seria na sua ausência (Valicente, 1989). Trata-se de um método de controle natural, cujo objetivo é utilizar inimigos naturais de controle que, ao contrário do uso químico, é inofensivo ao meio ambiente e à saúde humana (Carvalho, 1970).

Já é consenso que o controle biológico não acompanhou o desenvolvimento de outros métodos de controle, principalmente o químico. Isso ocorre porque a maior parte dos recursos mundiais dirigidos para o controle de pragas foi direcionado para o estudo de métodos que fornecessem resultados imediatos, com soluções rápidas, independente da obrigatoriedade de reaplicações periódicas,

contrastando com a vantagem do controle biológico que, uma vez adotado, poderia trazer solução permanente (Valicente, 1989).

Entretanto, nas últimas décadas, o controle biológico tem recebido a atenção dos pesquisadores, principalmente devido aos movimentos, a nível mundial, de preservação do meio ambiente. Diante deste contexto, salienta-se que um maior entendimento das interações entre as formigas e a microbiota dos ninhos poderia ser útil no planejamento do controle biológico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coletas do fungo simbiote em campo

Para o presente estudo foram colhidos vinte e cinco ninhos de *A. balzani*, em um total de sete coletas, no município de Campos dos Goytacazes, RJ - Brasil (Latitude: -21.7545 e Longitude: -41.3244). Os ninhos foram coletados ao longo de quatro meses, sendo a primeira coleta em Junho de 2019, e última coleta Setembro de 2019.

As coletas foram realizadas em três locais diferentes: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Escola Técnica Agrícola e o Instituto Federal Fluminense (IFF) - Campus Guarus, todas as sedes estão localizadas no norte do estado do Rio de Janeiro.

Para a coleta do fungo simbiote, as colônias de *A. balzani* foram escavadas até atingir a panela de fungo. As amostras do jardim de fungo (Figura 1) e do material de descarte (Figura 2) foram coletadas e estocadas em recipientes estéreis, e acondicionadas em caixas térmicas contendo bolsas de gelo, evitando, assim, a perda da umidade, e interrompendo o desenvolvimento de outros microrganismos. As amostras coletadas foram transportadas para o laboratório e processadas para isolamento das leveduras, num prazo máximo de até 24 h após a coleta.



Figura 1. Amostras de jardim de fungo coletadas (Seta vermelha indicando o fungo simbiote).



Figura 2. Amostra do material de descarte (Quadrado vermelho indicando o material de descarte coletado).

3.2. Isolamento de leveduras

Foram realizadas diluições em série com 0,5 g do jardim de fungo e 0,5 g do material de descarte, em 5mL de Tween 0,5%, agitadas em vórtex por 5 minutos (Figura 3). Alíquotas de 100 μ L da última diluição de 10^{-3} foram semeadas em triplicata em placas de Petri contendo o meio de isolamento YMA (0,3% extrato de malte; 0,3% extrato de levedura; 0,5% peptona; 2,0% ágar e H_2O), suplementados com 0,01% de cloranfenicol, e ajustada para pH 4,0. As placas foram incubadas em BOD 20 °C em escotofase e monitoradas diariamente.

As colônias que apresentaram diferentes morfotipos foram coletadas logo após o crescimento nas placas, purificadas e mantidas em meio BDA (Batata; Dextrose; Ágar e H_2O). O material foi armazenado em geladeira a ± 4 °C.

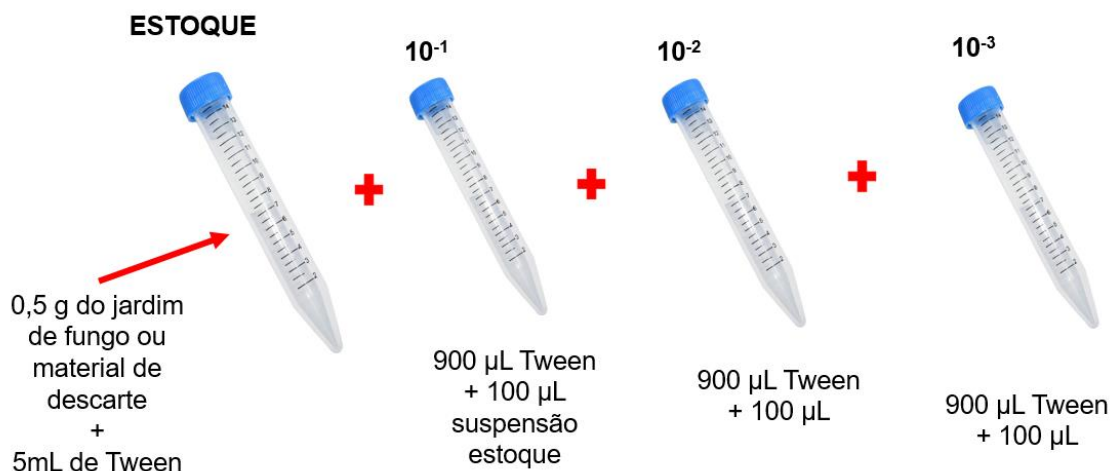


Figura 3. Representação das diluições em série realizadas com o material de descarte e jardim de fungo.

3.3. Caracterização das leveduras através de método de Gram

As leveduras foram detectadas através da coloração de Gram (ref.). Foi realizado o esfregaço com violeta-de-metila, deixando agir por aproximadamente 15 segundos. Em seguida foi adicionado igual quantidade de água sobre a lâmina coberta com violeta-de-metila, deixando agir por mais 45 segundos. O corante foi escorrido e lavado em um filete de água corrente, cobrindo a lâmina com lugol diluído (1/20), deixando agir por aproximadamente 1 minuto.

Na sequência, escorreu-se o lugol, lavando-o com um filete de água corrente, adicionando álcool etílico (99,5° GL) sobre a lâmina, descorando-a até que não se desprendesse mais corante. Subsequentemente, a lâmina foi lavada novamente com um filete de água corrente, coberta com o corante safranina, deixando-o agir por aproximadamente 30 segundos. Novamente foi realizada lavagem com um filete de água corrente e deixado a secar ao ar livre, ou suavemente, com o auxílio de um papel de filtro limpo. Foi colocada uma gota de óleo de imersão sobre o esfregaço, e realizada leitura com microscópio, usando objetiva de imersão (x100). As leveduras, por norma, apresentaram-se na forma unicelular (células individuais).

3.4. Teste bioquímico para identificação das leveduras

As leveduras foram submetidas aos testes bioquímicos através do cartão anaero-card ANC – Vitek 2 (*bioMérieux, Marcy-L'Etoile, France*), um sistema fechado, constituído por provas bioquímicas e enzimáticas miniaturizadas, que identifica com mais precisão o gênero e a espécie do microrganismo isolado. Existem mais de 300 possibilidades de microrganismos cadastrados no banco de dados. Leva-se um período de 24 a 48 horas para finalizar a identificação das amostras nos testes bioquímicos.

3.5. Bioensaios de antagonismo de leveduras contra fungos patogênicos

Foi testado o potencial inibitório das leveduras em confronto com os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, e o fungo parasita *Escovopsis* sp. Os bioensaios de confronto seguiram uma versão adaptada da montagem experimental utilizada por Rodrigues et al. (2009). Após o crescimento em meio YMA, as leveduras foram cultivadas em meio BDA por 3 dias, a 25 °C, antes dos experimentos.

As placas com meio BDA foram divididas em quatro faixas em formato de cruz. Três leveduras foram inoculadas individualmente no tamanho 0,5 cm na lateral da placa de Petri, e uma das laterais foi deixada sem inoculação (controle) (Figura 4).

As placas foram inoculadas com leveduras três dias antes da inoculação dos fungos patogênicos. Após esse período, os fungos escolhidos para teste foram inoculados no tamanho 0,5 cm, no centro da placa de Petri. Foram realizadas, com auxílio de uma régua, as medidas diárias em centímetros, do crescimento dos fungos e leveduras. Também foram realizados 30 confrontos com os nove isolados, pertencentes as 5 espécies de leveduras, perfazendo um total de 10 repetições para cada tratamento com fungo.

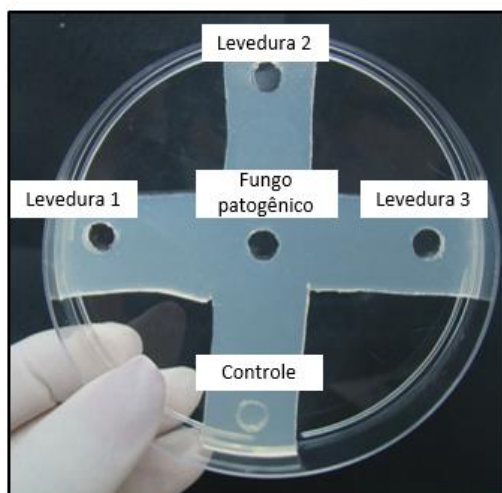


Figura 4. Placa de Petri com meio BDA dividida em formato de cruz, usada nos testes de confronto.

3.6. Origens das leveduras utilizadas

Os isolados das leveduras utilizadas tiveram origem de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1. Espécies e origem das leveduras encontradas em ninhos de *Acromyrmex balzani*.

Espécie	Isolado	Origem
<i>Rhodotorula glutinis</i>	L1	Ninho de <i>Acromyrmex balzani</i>
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	L2	Ninho de <i>Acromyrmex balzani</i>
<i>Cândida famata</i>	L3	Ninho de <i>Acromyrmex balzani</i>
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	L4	Material de descarte <i>Acromyrmex balzani</i>
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	L5	Ninho de <i>Acromyrmex balzani</i>
“Sp1”	L6	Ninho de <i>Acromyrmex balzani</i>
<i>Rhodotorula glutinis</i>	L7	Ninho de <i>Acromyrmex balzani</i>
“Sp2”	L8	Ninho de <i>Acromyrmex balzani</i>
<i>Rhodotorula glutinis</i>	L9	Ninho de <i>Acromyrmex balzani</i>
Número total de espécies	5	
Número total de isolados	9	

3.7. Análises dos dados

Os dados de crescimento dos fungos e das leveduras foram submetidos à análise de variância (ANOVA). O teste de agrupamento Scott Knott ($P = 5\%$) foi utilizado para comparar o crescimento dos fungos na presença das leveduras, e o teste Tukey ($P = 5\%$) foi utilizado para comparar o crescimento das leveduras na presença dos fungos. As análises foram feitas utilizando-se o programa estatístico SigmaPlot 12.5. O gráfico indicando os números de amostragens de leveduras encontradas nas referentes coletas foi confeccionado no programa *Microsoft Office Excel*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 9 leveduras foram isoladas dos 25 ninhos de *A. balzani* coletados. Todos os isolados estão depositados na coleção do Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (LEF) da Universidade Estadual do Norte Fluminense. Um total de 5 espécies, de 2 gêneros, foram identificados sendo gênero *Cândida* (ascomiceta) e gênero *Rhodotorula* (basidiomiceta).

Os resultados encontrados no presente estudo corroboram com várias pesquisas que relatam a presença de leveduras em ninhos de formigas da tribo Attini (Carreiro et al., 2004, Rodrigues et al., 2009; Pagnocca *et al.*, 2008, 2010; Mendes et al., 2012). Os isolados L6 e L8 não foram identificados de acordo com os testes bioquímicos, e, portanto, foram denominados “Sp1” e “Sp2”.

As espécies predominantes nos ninhos foram: *Rhodotorula glutinis* (33%), *Rhodotorula mucilaginosa* (22%), seguido de *Cândida famata* (11%), “Sp1” (11%) e “Sp2” (11%). A espécie *Rhodotorula mucilaginosa* (11%) também foi encontrada no material de descarte. Entre os três locais coletados, na Escola Técnica Agrícola nenhuma levedura foi isolada, sendo a UENF o local onde mais se obteve leveduras (4), seguido do IFF Guarus, com um isolado coletado (Tabela 2).

Tabela 2. Leveduras isoladas de jardim de fungo e material de descarte da formiga cortadeira *Acromyrmex balzani* nos locais diferentes. Leveduras isoladas de jardim de fungo (JF); Leveduras isoladas de material de descarte (MD).

Espécie	Isolado	JF	MD	Local de coleta
<i>Rhodotorula glutinis</i>	L1	1	0	UENF
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	L2	1	0	UENF
<i>Cândida famata</i>	L3	1	0	UENF
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	L4	0	1	UENF
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	L5	1	0	IFF Guarus
“Sp1”	L6	1	0	UENF
<i>Rhodotorula glutinis</i>	L7	1	0	UENF
“Sp2”	L8	1	0	UENF
<i>Rhodotorula glutinis</i>	L9	1	0	UENF
Número total de isolados	9	8	1	
Número total de espécies	5	5	1	

Em relação à essa diversidade de espécies, observou-se que o jardim de fungo apresentou uma maior diversidade quando comparado com o material de descarte (Tabela 2). Verificando a diversidade de leveduras nos três locais de coleta, percebeu-se que na UENF a diversidade foi maior (Tabela 2). Esse resultado pode estar relacionado com as diferentes espécies de gramíneas encontrada em cada local, por exemplo, *Paspalum notatum* UENF, *Tifton 85* Escola Técnica Agrícola e *Zoysia japonica* no IFF Guarus.

Melo (2014) afirma que os diferentes tipos de gramíneas podem alterar a diversidade das leveduras encontradas em ninhos de *A. balzani*. Fato também observado por Moraes et al. (1995) e Pimenta et al. (2009), que em seus estudos sugerem que a diversidade de leveduras é alta em locais preservados. De acordo com os autores, provavelmente este resultado é devido a uma maior diversidade de fontes de alimentos em florestas primárias do que em áreas perturbadas, onde o habitat é mais homogêneo.

As espécies *Rhodotorula glutinis*, *Cândida famata*, “Sp1” e “Sp2” foram encontradas apenas nos jardins do fungo. Já a espécie *Rhodotorula mucilaginosa* foi encontrada tanto nos jardins de fungo como no material de descarte. Estudos apontam que o comportamento de forrageamento das operárias de formigas

cortadeiras explica a presença da maioria das leveduras encontradas nos jardins de fungo, pois elas podem estar no filoplano do material vegetal fresco coletado pelas operárias. Este é considerado um nicho que abriga uma diversidade de microrganismos, entre eles muitas espécies de leveduras (Fonseca e Inácio, 2006).

Fonseca e Inácio (2006) observaram que na filosfera há predominância de basidiomicetos. Essas leveduras também vêm sendo encontradas no interior de ninhos de formigas cortadeiras, assim como nos estudos de Pagnocca e colaboradores (2011), que relataram a prevalência de leveduras basidiomicetas em ninhos de formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*. Tal descoberta confirma a observação de Rodrigues et al. (2009) e Mendes et al. (2012), de que nos jardins de fungos de formigas cortadeiras predominam leveduras basidiomicetas, e que isso provavelmente é decorrência do material foliar carregado para o interior dos ninhos pelas formigas forrageadoras.

O gênero *Rhodotorula* foi predominante nos ninhos de *A. balzani*, representando 66% do total de isolados obtidos, e tem sido recorrente o isolamento de leveduras deste gênero em jardim de fungo das formigas Attini (Melo, 2014; Mendes et al., 2012; Rodrigues et al., 2009). As leveduras pertencentes ao gênero *Rhodotorula* apresentam ampla distribuição geográfica e podem ser encontradas nos mais diferentes habitats.

As espécies *Rhodotorula mucilaginosa* e *Rhodotorula glutinis*, ambas representadas nesse estudo por três isolados cada, têm sido associadas aos ninhos de formigas da tribo Attini (Carreiro et al., 1997; Pagnocca et al., 2008; Rodrigues, 2009).

O estudo realizado por Melo (2014), demonstrou que a maior parte das leveduras isoladas eram da espécie *Rhodotorula mucilaginosa*, encontradas em material de descarte, o que não foi o caso do presente estudo, cuja maior parte das leveduras isoladas dessa espécie esteve presente no jardim de fungo, e apenas um isolado foi encontrado no material de descarte.

Considerando que a maior ocorrência das espécies dessa levedura ocorreu no interior dos ninhos, isso pode ser justificado levando em conta algumas explicações sugeridas por Rodrigues et al. (2009), tais como: a população de leveduras no jardim de fungos depende da entrada de leveduras com substratos vegetais específicos durante os diferentes períodos do ano ou dos diferentes habitats; a idade ou a saúde do jardim também podem influenciar a população de

leveduras; e as leveduras podem habitar os jardins de fungo em alguns períodos do ciclo anual de cultivo.

Já o segundo gênero de levedura encontrado no interior do jardim de fungo, o gênero *Cândida*, também tem relatos em ninhos de formigas Attini (Pagnocca et al., 2010). De acordo com Santos (2015), foi encontrada levedura do gênero *Cândida* no interior do jardim de formigas Attini. Este resultado difere do encontrado por Pagnocca et al. (2010) que relataram um isolado de *Cândida*, a partir do depósito de resíduos dos ninhos. As espécies deste gênero são encontradas também em diversos tipos de frutos (Prada e Pagnocca, 1997), além de outros ambientes, como descrito no trabalho de Loureiro et al. (2005), que isolaram este gênero do solo e da água do mar de duas praias de Olinda-PE.

Embora as espécies do gênero *Cândida* sejam encontradas em abundância em outros habitats e em associação com ninhos de formigas, a espécie *Cândida famata* tem seu primeiro relato de associação com jardins de fungos de formigas *Acromyrmex balzani* descrito neste trabalho.

Quanto ao número de coletas realizadas, o estudo mostra que se fossem realizadas mais coletas, o gráfico de amostragem (Figura 5) talvez atingiria o efeito platô. Portanto, a realização de futuras coletas nesses locais seria relevante.

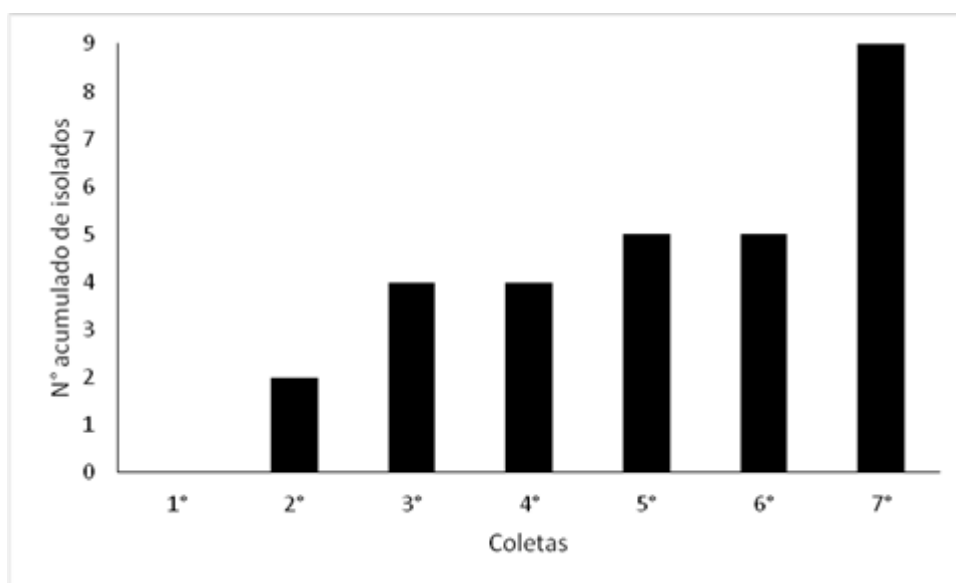


Figura 5. Número acumulado de isolados de leveduras em ninhos de *A. balzani* encontradas em todos os locais de coleta no município de Campos dos Goytacazes.

A maioria dos isolados testados tiveram ação antagônica em relação ao crescimento dos fungos utilizados nos testes de confronto, e esses efeitos foram estatisticamente significativos. *Escovopsis* sp. foi significativamente inibido pelas leveduras ($F_{9,90} = 9,48$; $p < 0,001$).

O maior crescimento de *Escovopsis* sp. ocorreu no tratamento controle e o menor na presença dos isolados L3 (*C. famata*), L4 (*R. mucilaginosa*) e L8 ("Sp2"). Quando *Escovopsis* sp. foi exposto aos isolados L1, L2, L5, L6, L7 e L9 o seu crescimento foi menor que ocorrido no controle, porém, foi maior que o crescimento observado quando confrontado com L3, L4 e L8 (Figura 6 e 7).

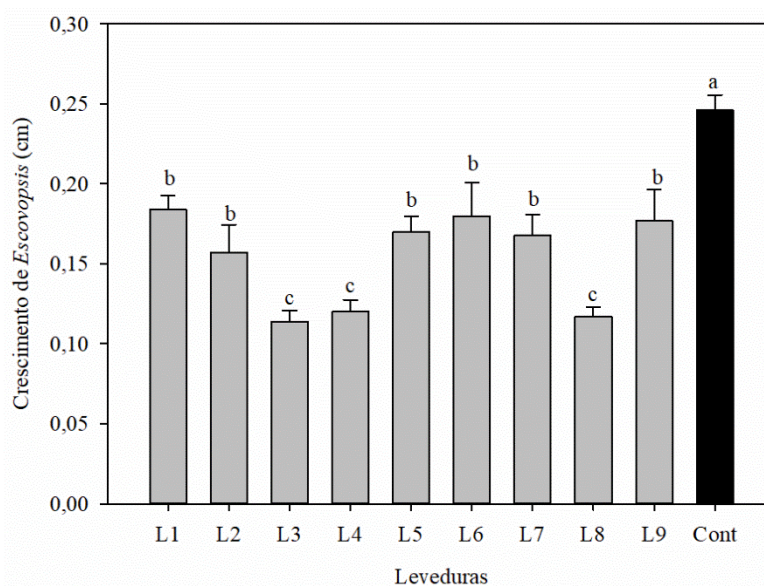


Figura 6. Crescimento (cm média \pm EP) do fungo *Escovopsis* sp. em relação as leveduras em testes de confronto. Cont. (controle). Médias seguidas por mesmas letras são iguais entre si pelo teste Scott Knott ($P < 0,05$).

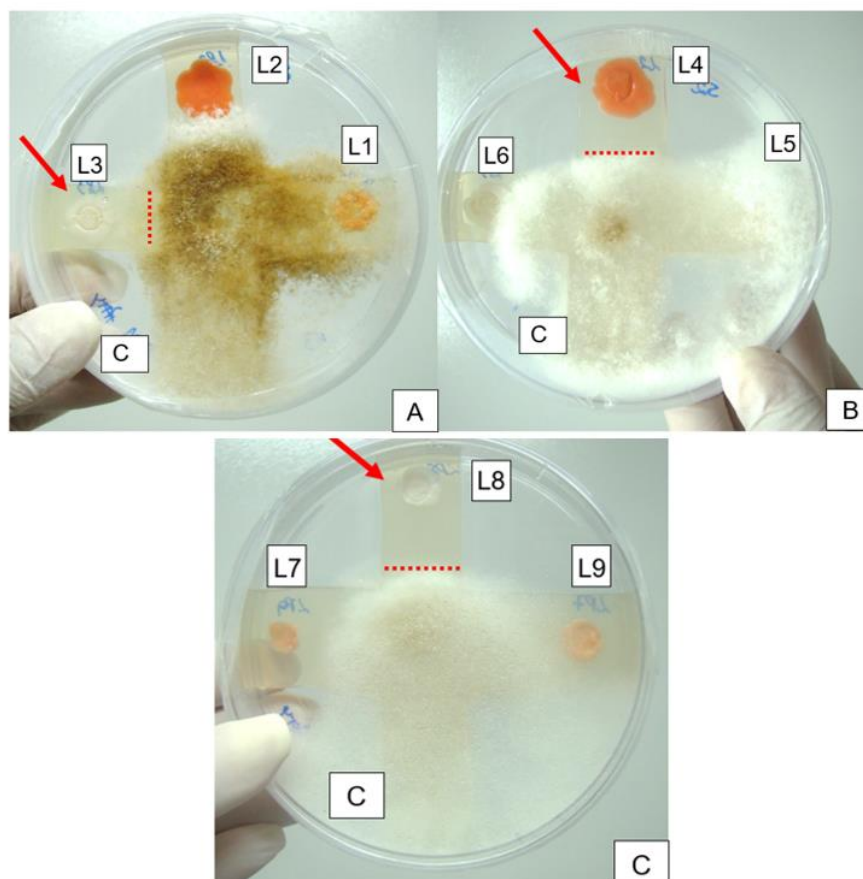


Figura 7. Antagonismo de leveduras em relação ao parasita do jardim de fungo de formigas cortadeiras *Escovopsis* sp. Leveduras testadas: L1 (*R. glutinis*) L2 (*R. mucilaginosa*) L3 (*C. famata*) e C (Controle) (A). L4 (*R. mucilaginosa*) L5 (*R. mucilaginosa*) L6 ("Sp1") e C (Controle) (B). L7 (*R. glutinis*) L8 ("Sp2") L9 (*R. glutinis*) e C (Controle) (C). Linha pontilhada mostrando até onde o fungo cresceu. Seta vermelha indicando as leveduras que apresentaram repelência/inibição.

O *Escovopsis* também é inibido por bactérias do gênero *Burkholderia* encontrada em ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* (Santos et al., 2004). Sabe-se que o *Escovopsis* é um parasita do fungo simbiote das Attine, a ação da bactéria pode estar relacionada ao fator de proteção da colônia.

Contudo, o fato de *Escovopsis* poder ser inibido por uma variedade de microrganismos, incluindo bactérias e leveduras, expande a visão sobre a coevolução deste fungo no mutualismo antimicrobiano, uma vez que esses microrganismos presentes em ninhos de formigas podem contribuir sinergicamente na defesa contra o parasita do jardim, e isso pode ser particularmente benéfico para formigas cortadeiras (Santos et al., 2004).

O fungo entomopatogênico *B. bassiana* apresentou crescimento significativamente afetado pelas leveduras ($F_{9,90} = 11,07$; $p < 0,001$), obtendo o maior crescimento no tratamento controle e o menor na presença dos isolados L3, L5, L6 e L8.

Desta forma, *B. bassiana* quando exposto aos isolados L1, L2, L4, L7 e L9, apresentou menor crescimento que o controle, porém, foi maior que o crescimento observado em L3, L5, L6 e L8 (Figuras 8 e 9).

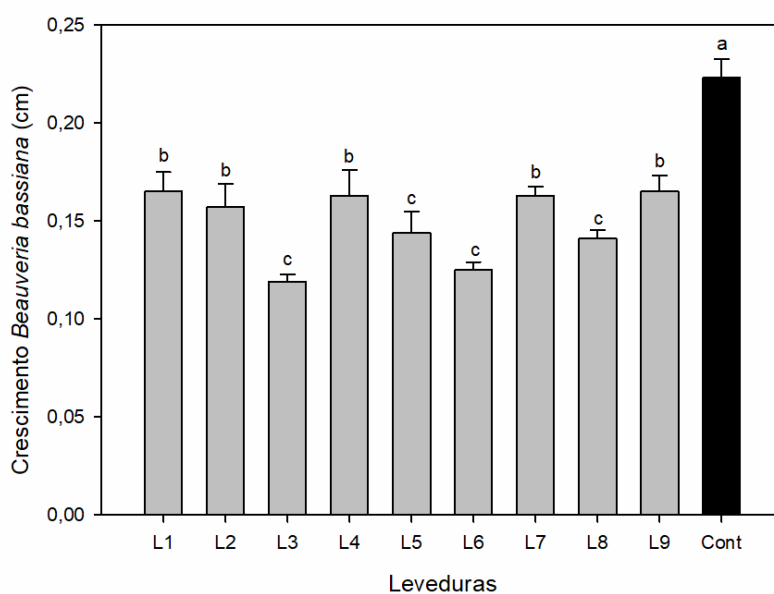


Figura 8. Crescimento do fungo *Beauveria bassiana* (cm média \pm EP) em relação os confrontos com leveduras. Cont. (controle). Médias seguidas por mesmas letras são iguais entre si pelo teste Scott Knott ($P < 0,05$).

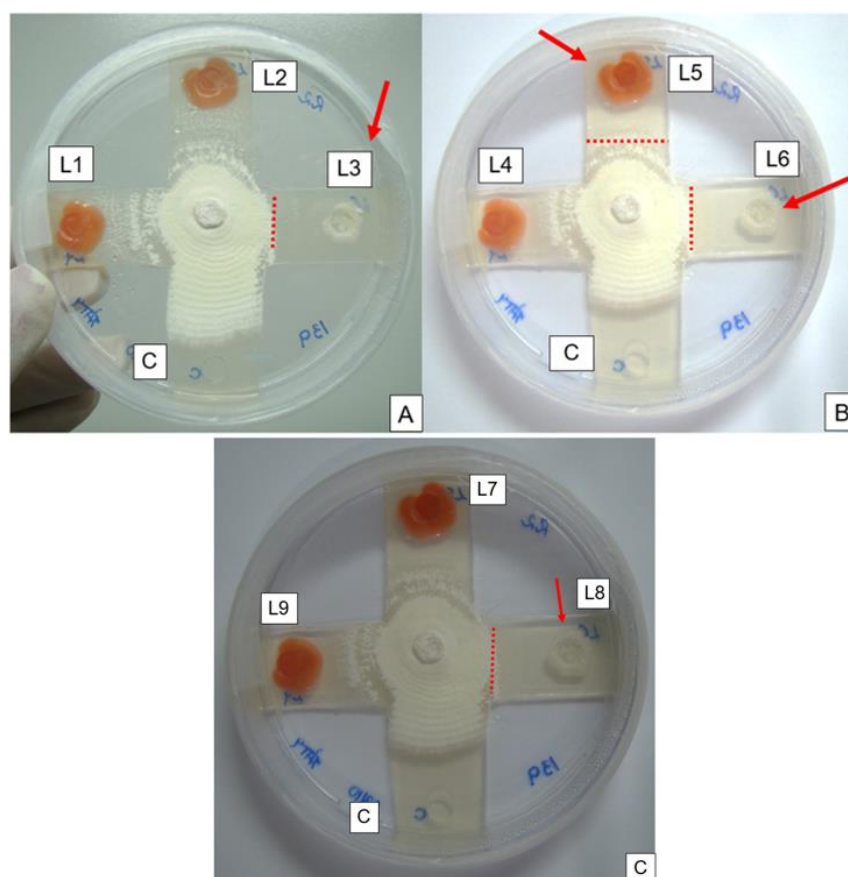


Figura 9. Antagonismo de leveduras em confronto com o agente patogénico do jardim de fungo de formigas cortadeiras *Beauveria bassiana*. Levedura testada L1 (*R. glutinis*) e L2 (*R. mucilaginosa*) L3 (*C. famata*) (A). L4 (*R. mucilaginosa*) L5 (*R. mucilaginosa*) L6 (“Sp1”) e C (Controle) (B). L7 (*R. glutinis*) L8 (“Sp2”) L9 (*R. glutinis*) e C (Controle) (C). Linha pontilhada mostrando até onde o fungo cresceu. Seta vermelha indicando as leveduras que apresentaram repelência.

O crescimento do fungo *M. anisopliae* foi significativamente afetado pelas leveduras ($F_{9,90} = 26,86$; $p < 0,001$). *M. anisopliae* apresentou o maior crescimento no tratamento controle e o menor crescimento na presença dos isolados L3, L6 e L8.

Quando *M. anisopliae* foi exposto aos isolados L1, L2, L4, L5, L7 e L9, seu crescimento foi menor que ocorrido no controle, porém, foi maior que o crescimento observado em L3, L6 e L8 (Figuras 10 e 11).

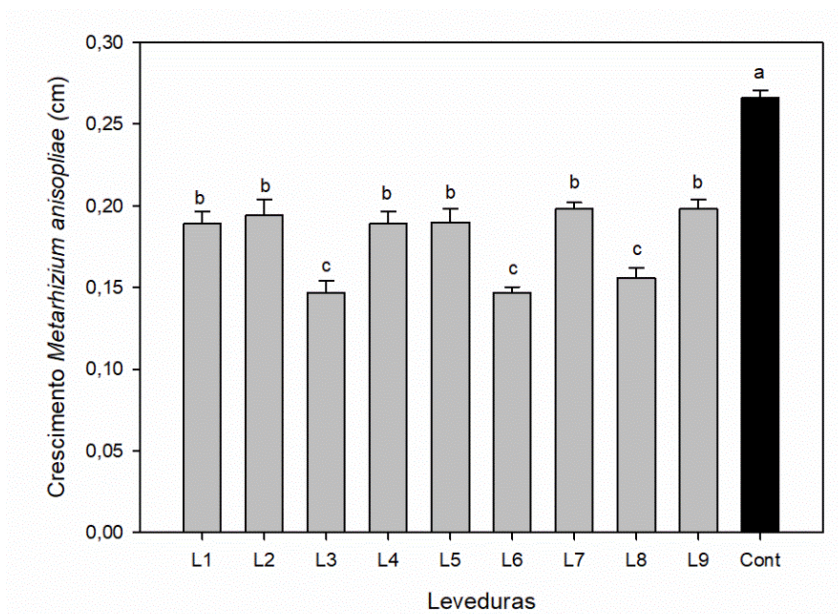


Figura 10. Crescimento do fungo *Metarhizium anisopliae* (cm média \pm EP) em confronto com as leveduras. Cont. (controle). Médias seguidas por mesmas letras são iguais entre si pelo teste Scott Knott ($P < 0,05$).

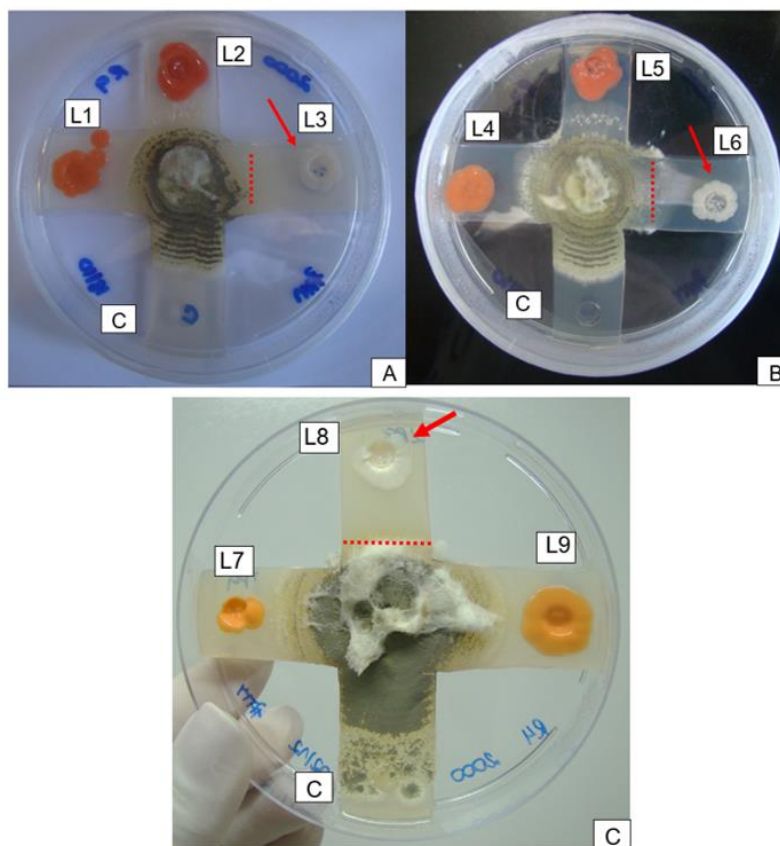


Figura 11. Antagonismo de leveduras em confronto com o fungo *Metarhizium anisopliae*. Levedura inoculada em L1 (*R. glutinis*) e L2 (*R. mucilaginosa*) L3 (*C. famata*) (A). L4 (*R. mucilaginosa*) L5 (*R. mucilaginosa*) L6 (“Sp1”) e C (Controle) (B). L7 (*R. glutinis*) L8 (“Sp2”) L9 (*R. glutinis*) e C (Controle) (C). Linha pontilhada mostrando até onde o fungo cresceu. Seta vermelha indicando as leveduras que apresentaram repelência/inibição.

Os resultados de inibição dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* pelas leveduras do gênero *Cândida* e *Rhodotorula* podem ser vistos como uma proteção das formigas contra infecção por fungos entomopatogênicos. A repelência das leveduras frente a esses fungos, para esses dois gêneros, foi significativa (Figura 9 e 11). Rodrigues et al. (2009), trabalhando com teste de antagonismo com o fungo *B. bassiana*, perceberam repelência por leveduras isoladas de ninhos de *A. texana*.

Os resultados obtidos no presente trabalho podem estar relacionados com o fato de que fungos entomopatogênicos têm como característica causar doenças em insetos, resultando na morte do hospedeiro. As leveduras que repeliram o crescimento do fungo podem ser benéficas para o formigueiro apresentando função de defesa contra patógenos.

Mattoso *et al.* (2012) verificaram a associação benéfica da bactéria *Pseudonocardia* com formigas *Acromyrmex subterraneus subterraneus*, utilizando o fungo *M. anisopliae* para verificar a ação defensiva da bactéria, que funciona como um escudo protetor das formigas. Os autores testaram em laboratório a aplicação do antibiótico gentamicina, a fim de reduzir a população das bactérias protetoras e, assim, aumentar a mortalidade das formigas. A remoção do biofilme bacteriano do tegumento com antibióticos aumentou significativamente a suscetibilidade das formigas à infecção por *M. anisopliae*.

Não houve diferença de crescimento das leveduras L1 ($F_{2,27} = 2,08$; $p = 0,14$), L2 ($F_{2,27} = 3,34$; $p = 0,050$), L6 ($F_{2,27} = 3,18$; $p = 0,057$) e L9 ($F_{2,27} = 1,76$; $p = 0,19$) quando expostas aos fungos *B. bassiana*, *Escovopsis* sp e *M. anisopliae*. Por outro lado, o crescimento das leveduras L3 ($F_{2,27} = 9,53$; $p < 0,001$), L4 ($F_{2,27} = 12,95$; $p < 0,001$), L5 ($F_{2,27} = 6,006$; $p = 0,007$), L7 ($F_{2,27} = 6,62$; $p = 0,005$), L8 ($F_{2,27} = 13,16$; $p < 0,001$) e L9 ($F_{2,27} = 1,76$; $p = 0,19$), diferiram quando expostas aos mesmos fungos.

As leveduras L4 e L8 tiveram um crescimento semelhante, na presença do fungo *Escovopsis* sp o crescimento foi menor para ambas, em comparação com crescimento ocorrido na presença de *B. bassiana* e *M. anisopliae*. As leveduras L3 e L7 apresentaram maior crescimento na presença de *M. anisopliae*, e menor crescimento quando foram expostas a *B. bassiana*, *Escovopsis* sp. Já para L5 um menor crescimento ocorreu quando foi exposta ao fungo *B. bassiana*, e maior na presença de *M. anisopliae* (Figura 12).

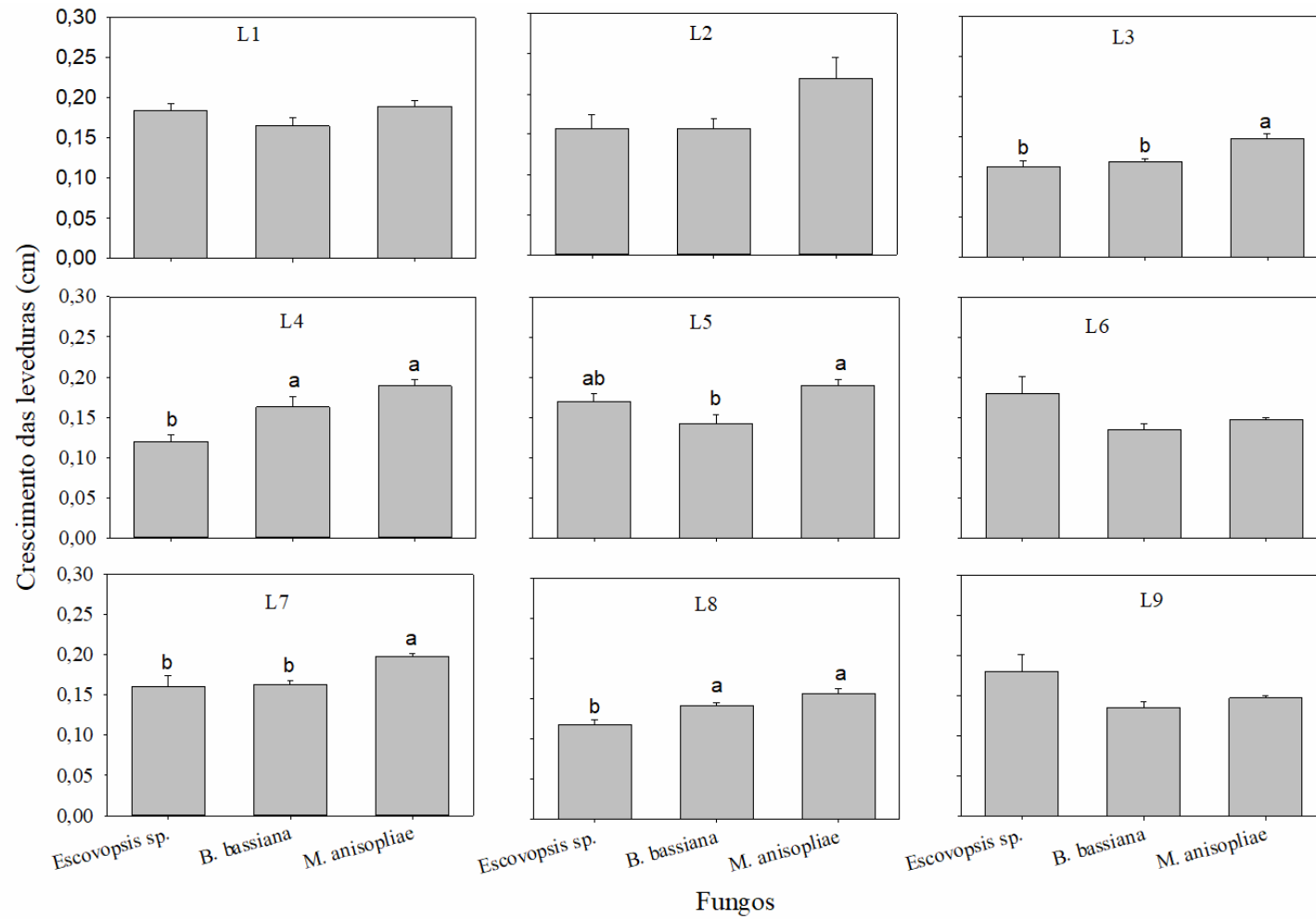


Figura 12. Crescimento (cm médio \pm EP) de leveduras em meio de cultivo (BDA) na presença dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae* e *Escovopsis sp.* Médias seguidas por mesma letra são estatisticamente iguais pelo teste Tukey (P < 0,05).

O fato de espécies iguais apresentarem resultados opostos em relação ao crescimento das leveduras, é explicado pela característica de cada isolado, podendo, portanto, um isolado ser mais virulento que o outro. Nesse sentido, os resultados da presente pesquisa corroboram Bocchese et al. (2003), que em seus estudos com virulência e atividade enzimática *Pyrenophora chaetomioides*, observaram que diferentes isolados apresentavam diferenças em sua virulência.

Ressalta-se que a produção de enzimas durante o crescimento das leveduras também pode ter interferido no seu crescimento, considerando fatores como; alterações no pH, competição e exploração de nutrientes, gasto de energia, entre outros (Rodrigues et al., 2009). Porém, este estudo não investiga atividade enzimática das leveduras, mas essa investigação se faz necessária, visando melhor entender a atividade metabólica das leveduras encontradas nos ninhos dessas formigas.

O jardim de fungo da formiga *A. balzani* pode apresentar espécies de leveduras ainda não descritas como a *Cândida famata*, abrigando, assim, uma comunidade diversa desses microrganismos. As origens dessas leveduras podem estar associadas ao material vegetal coletado pelas formigas operárias, que utilizam este substrato para cultivar o fungo mutualista.

Dentre as espécies identificadas no presente estudo, observou-se que a maioria apresenta a capacidade de repelir o fungo parasita *Escovopsis* sp. e os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Assim, são necessário estudos futuros para melhor entendimento dessas leveduras, e até mesmo para entender se seu crescimento está relacionado com liberações de enzimas ou compostos antifúngicos.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Alguns estudos têm registrado a composição da comunidade de leveduras nos ninhos de formigas Attini. Nesta pesquisa, procurou-se conhecer a diversidade de leveduras presente nos ninhos da formiga cortadeira *A. balzani*, coletadas em três locais diferentes. *A. balzani* é uma formiga considerada praga, principalmente de pastagens, e este estudo pode contribuir com pesquisas futuras cujo foco seja controle biológico desses insetos.

A partir dos resultados da presente pesquisa sobre o isolamento de leveduras nos ninhos de *A. balzani* presume-se que a origem dessas leveduras está associada ao material vegetal coletado pelas formigas operárias, que utilizam este substrato para cultivar o fungo mutualista. Observou-se a predominância de leveduras basidiomicetas nos ninhos e, possivelmente, esta ocorrência se deu devido à dominância de leveduras deste grupo na filosfera.

Vale ressaltar que este trabalho apresenta o primeiro relato da espécie *Cândida famata* em associação com jardins de fungos de formigas *A. balzani*. Em relação ao teste de antagonismos realizado, a maioria das espécies identificadas apresenta a capacidade de repelir o fungo parasita do jardim *Escovopsis* sp., além dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, M.L. (1991) Bionomia e Distribuição Geográfica do Gênero *Acromyrmex* Mayr, 1865 (Hymenoptera: Formicidae) no Estado de São Paulo, Brasil. 1991. 120p. Tese (Doutorado em Zoologia) – Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho – UNESP, Botucatu.
- Angelis, C.; Serzedello, A.; De angelis, D.F. (1983) Yeasts found in gardens of *Atta sexdens rubropilosa* and *Atta laevigata*. *Naturalia*, São Paulo, (8):149-151.
- Arcuri, S.L.; Pagnocca, F.C.; Da Paixão Melo, W.G.; Nagamoto, N.S.; Komura, D.L.; Rodrigues, A. (2014) Yeasts found on an ephemeral reproductive caste of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106 (3): 475-487.
- Bacci, J.R.M.; Ribeiro, S.B.; Casarotto, M.E.F.; Pagnocca, F.C. (1995) Biopolymer-degrading bacteria from nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, (28): 79–82.
- Borsaux-eude, C., Gross, R. (2000) New insights into symbiotic associations between ants and bacteria. *Research in Microbiology*, (151): 513-519.
- Buchner, P. (1965) Endosymbiosis of animals with plant microorganisms. Interscience, New York.

- Bueno, F.C. (2013) Seleção de ingredientes ativos para o desenvolvimento de iscas tóxicas para o controle de formigas-cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae). Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- Buratto, D.A., Cardoso, J.T., Rolim, F.A., Reis Filho, W. (2012) Avaliação dos danos causados por formigas-cortadeiras do gênero *Acromyrmex* (Hymenoptera) aos plantios de *Pinus taeda* no planalto sul-catarinense. *Floresta*, 42(4): 683-690.
- Caldato, N. (2010) Biologia de *Acromyrmex balzani* Emery, 1890 (Hymenoptera, Formicidae). Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu. 28-35, 92 p.
- Carreiro, S.C. (2000) Pesquisa do fator Killer e análise da degradação de polissacarídeos vegetais por leveduras associadas aos ninhos de *Atta sexdens*. 2000. 153 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- Carreiro, S. C.; Pagnocca, F. C.; Bacci Júnior, M.; Lachance, M-A.; Bueno, O. C.; Hebling; M. J. A.; Ruivo, C. C. C.; Rosa, C. A. (2004) *Sympodiomyces attinorum* sp. nov., a yeast species associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. London. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(5): 1891-1894.
- Carreiro, S.C.; Pagnocca, F.C.; Bacci, M.; Lachance, M.A.; Bueno, O.C.; Hebling, M.J.A.; Ruivo, C.C.C.; Rosa, C.A. (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.
- Carreiro, S.C.; Pagnocca, F.C.; Bueno, O.C.; Bacci, M.; Hebling, M.J.A.; Silva, O.A. (1997) Yeast associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908. *Antonie van Leeuwenhoek*, (71): 243-248.

- Carreiro, S.C.; Pagnocca, F.C.; Bacci, M.J.R.; Lachance, M.A.; Bueno, O.C.; Hebling, M.J.A.; Ruivo, C.C.C.; Rosa, C.A. (2004) *Sympodiomyces attinorum* sp. nov., a yeast species associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. Reading. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(5): 1891-1894.
- Carvalho, R.P.L. (1970) Danos, flutuação da população, controle e comportamento de *Spodoptera frugiperda* (IE. Smith, 1797) e susceptibilidade de diferentes genótipos de milho, em condições de campo. Piracicaba, ESALQ USP, *Tese de Doutorado*. 170p.
- Craven, S.E.; Dix, M.W.; Michaels, G.E. (1970) Attine fungus gardens contains yeasts. *Science*, 169(3941): 184- 186.
- Currie, C.R.; Mueller, U.G.; Malloch, D. (1999) The agricultural pathology of ant fungus gardens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, USA*. (96): 7998-8002.
- Currie, C.R.; Scott, J.A.; Summerbell, R.C.; Malloch, D. (2003) Corrigendum: Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *London. Nature*, (423): 461p.
- Della Lucia, T.M.C. (2011) Formigas cortadeiras: da bioecologia ao manejo. da UFV. Viçosa, Brazil.
- Della Lucia, T.M.C.; Araújo, M.S. (2000) Formigas cortadeiras: Atualidades no combate. *Manejo Integrado–Doenças, Pragas e Plantas Daninhas*, 26-31.
- Della lucia, T.M.C.; Moreira, D.D.O. (1993) Caracterização dos ninhos. In: Della Lucia, T.M.C. *As formigas-cortadeiras*. Viçosa, MG: Sociedade de investigações florestais. (8): 84-105.

- Della Lucia, T.M.C.; Vilela, E.F. (1993) Métodos atuais de controle e perspectivas
In: Della Lucia, T.M.C (org.) As formigas cortadeiras, Viçosa: *Editora folha de Viçosa*, 131-150.
- Fernández, F. (2003) Introducción a las hormigas de la región Neotropical. Bogotá-COL: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt, 29-44.
- Fonseca, A.; Inácio, J. (2006) Phylloplane Yeasts. In: Rosa, C.A.; Gabor, P. (Eds.)
The yeast handbook: biodiversity and ecophysiology of yeasts. Berlin:
Springer-Verlag, 263-302.
- Forti, L.C.; Ramos, V.M. (2002) Controle de formigas-cortadeiras. In: Congresso Brasileiro de Entomologia. Resumos, 19º Congresso Brasileiro de Entomologia.
- Ganter, P.F. (2006) Yeast and Invertebrate Associations, p. 302-370. In C.A. Rosa & G. Péter (eds.), Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts: The Yeast Handbook. 1 ed., Germany. *Springer Press*, 579p.
- Giesel, A. (2007) Preparados homeopáticos, iscas fitoterápicas, conhecimento popular e estudo do comportamento para o manejo das formigas cortadeiras no Planalto Serrano Catarinense. Dissertação (Mestre em Produção Vegetal) - Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC. Lages.
- Hölldobler, B.; Wilson, E.O. (1990) The ants. Cambridge: Harvard University,. 732p.
- Jaime, N.G. (2010) Levantamentos Mirmecofaunísticos em três Ambientes Antrópicos nos Estados de Goiás e Tocantins, Brasil. Tese (Doutorado)- Universidade Federal de Goiás, 131p.
- Jung, P.H.; Silveir, A.A.C.D.; Nieri, E.M.; Potrich, M.; Silva, E.R.L.D.; Refatti, M. (2013) Atividade Inseticida de *Eugenia uniflora* L. e *Melia azedarach* L. sobre *Atta laevigata* Smith. *Floresta e Ambiente*, 20(2): 191-196.

- Krüger, L.R.; Loeck, A.E.; Grützmacher, D.D. (2010) Influência do cultivo de Eucaliptos sobre a comunidade de formigas cortadeiras nas regiões sul e campanha do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Current Agricultural Science and Technology*, (16):1-4.
- Kurtzman, C.P.; Fell, J.W.; Boekhout, T. (2011) The yeasts, a taxonomic study. 15. ed. Amsterdam: *Elsevier*, (3).
- Lachance, M.A.; Starmer, W.T.; Rosa, C.A.; Bowles, J.M.; Baker, J.S.F.; Jazen, D.H. (2001) Biogeography of the yeasts of ephemeral flowers and their insects. Amsterdam. *FEMS Yeast Research*, 1(1): 1-8.
- Lachance, M.A.; Starmer, W.T. (1998) Ecology and yeasts. In: The Yeasts. *Elsevier*, p. 21-30.
- Leal, I.R.; Wirth, R.; Tabarelli, M. (2014). The multiple impacts of leaf-cutting ants and their novel ecological role in human-modified neotropical forests. *Biotropica*, 46(5): 516-528.
- Lima, C.A.; Della Lucia, T.M.C.; Silva, N.A. (2001) Formigas-cortadeiras: biologia e controle, Viçosa, MG: UFV/DBG. Pró-reitora de Extensão e Cultura. *Boletim de Extensão*, 28p.
- Little, A.E.F.; Currie, C.R. (2007) Symbiotic complexity: Discovery of a fifth symbiont in the attine ant-microbe symbiosis. *Biology Letters*, (3): 501-504.
- Loureiro, S.T.A.; Cavalcanti, M.A.Q.; Neves, R.P.; Passavante, J.Z.O. (2005) Yeast isolated from sand and sea water in beaches of Olinda, Pernambuco State, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, (36): 333-337.
- Mckenna, D.D.; Farrell, B.D. (2006) Tropical forests are both evolutionary cradles and museums of leaf beetle diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(29): 10947-10951.

- Melo, W.G.P. (2014) Leveduras isoladas de ninhos de *Acromyrmex balzani* (Hymenoptera: Formicidae) de áreas de cerrado do estado de Tocantins. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro, São Paulo. 164p.
- Melo, W.G.P. (2014) Leveduras isoladas de ninhos de *Acromyrmex balzani* (Hymenoptera: Formicidae) de áreas de cerrado do estado de Tocantins. 2014. 164 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro, São Paulo.
- Mendes, T.D.; Rodrigues, A.; Dayo-Owoyemi, I.; Marson, F.A.L.; Pagnocca, F.C. (2012) Generation of nutrients and detoxification: possible roles of yeasts in leaf-cutting ant nests. *Insects*, 3(1): 228-245.
- Middelhoven, W.J.; Fonseca, A.; Carreiro, S.C.; Pagnocca, F.C.; Bueno, O.C. (2003) *Cryptococcus haglerorum*, sp. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast isolated from nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 83(2): 167-174.
- Morais, P.B.; Martins, M.B.; Klaczko, L.B., Mendonça-Hagler, L.C., Hagler, A.N. (1995) Yeast succession in the Amazon fruit *Parahancornia amapa* as resource partitioning among *Drosophila spp.* *Applied and Environmental Microbiology*, 61(12):4251-4257.
- Moreira, J.C.; Jacob, S.C.; Peres, F., Lima, J.S.; Meyer, A.; Oliveira-Silva, J.J. (2002) Avaliação 122 integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. *Rev C S Col*, 7(2):299-311.

- Mueller, U.G. (2002) Ant versus fungus versus mutualism: Ant-cultivar conflict and the deconstruction of the attine ant-fungus symbiosis. *American Naturalist*, (160): 67-98.
- Mueller, U.G.; Scott, J.J.; Ishak, H.D.; Rodrigues, A. (2010) Monoculture of leafcutter ant gardens. *PLoS ONE*, 5(9).
- Mueller, U.G.; Gerardo, N.M.; Aanen, D.K.; Six, D.L.; Schultz, T.R. (2005) The evolution of agriculture in insects. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, (36):563-595.
- Mueller, U.G.; Schultz, T.R.; Currie, C.R.; Adams, R.M.M.; Malloch, D. (2001) The origin of the attine ant-fungus mutualism. *Quarterly Review of Biology*, 76(2):169-197.
- Nickele, M.A.; Pie, M.R.; Reis Filho, W.; Penteado, S.D.R.C. (2013) Formigas cultivadoras de fungos: estado da arte e direcionamento para pesquisas futuras. *Pesquisa Florestal Brasileira*, 33(73): 53-72.
- Pagnocca, F.C.; Carreiro, S.C.; Bueno, O.C.; Hebling, M.J.; Da Silva, O.A. (1996) Microbiological changes in the nests of leaf-cutting ants fed on sesame leaves. *Journal of Applied Entomology*, 120(5):317-320.
- Pagnocca, F.C.; Rodrigues, A.; Nagamoto, N.S.; Bacci Júnior, M. (2008) Yeasts and filamentous fungi carried by the gynes of leaf-cutting ants. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 94(4): 517-526.
- Pagnocca, F.C.; Bacci, M.Jr.; Fungaro, M.H.; Bueno, O.C.; Hebling, M.J.; Sant'anna, A.; Capelari, M. (2001) Rapd analysis of the sexual state and sterile mycelium of the fungus cultivated by leaf-cutting ant *Acromyrmex hispidus fallax*. *Mycological Research*, 105(2): 173-176.

- Pagnocca, F.C.; Rodrigues, A.; Bacci, J.R.M. (2010) Micro-organismos associados às formigas cortadeiras. In: Della-Lucia, T.M.C. Formigas cortadeiras. Viçosa: UF.
- Phaff, H.J.; Starmer, W.T. (1987) Yeasts associated with plants, insects and soil. In: Rose A.H., Harrison, J. (Ed) *The Yeasts. Academic Press*, (1): 123- 180.
- Pimenta, L.B.; Araújo, M.S.; Lima, R.; Silva, J.M.S.; Naves, V.G.O. (2007) Dinâmica de forrageamento e caracterização de colônias de *Acromyrmex balzani* (Emery, 1890) (Hymenoptera: Formicidae) em ambiente de cerrado goiano. *Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal*, (9):1-12.
- Pimenta, R.S.; Alves, P.D.D.; Almeida, G.M.F.; Silva, J.M.F.; Morais, P.B.; Corrêa, J.R.A.; Rosa, C.A. (2009) Yeast communities in two Atlantic rain forest fragments in southeast Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(1):90-95.
- Prada, G.M.M.; Pagnocca, F.C. (1997) Ascomycetous yeast associated with naturally occurring fruits in a tropical rain forest. *Folia Microbiol*, 42(1): 39-46.
- Rodrigues, A.; Cable, R.N.; Mueller, U.G.; Bacci, M.J.R.; Pagnocca, F.C. (2009) Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungus garden pathogens of leaf-cutting ants. *Antonie van Leeuwenhoek*, (96):331-342.
- Rodrigues, A.; Pagnocca, F.C.; Bacci, M.Jr.; Hebling, M.J.A.; Bueno, O.C.; Penning, L.H. (2005) Variability of non-mutualistic fungi associated with *Atta sexdens* *ubropilosa* nests. *Folia Microbiologica*, 50(5):421-425.
- Roth, F.J.; Ahearn, D.G.; Fell, J.W.; Meyers, S.P.; Meyer, A.A. (1962) Ecology and taxonomy of yeasts isolated from various marine substrates. *Limnology and Oceanography*, 7(2):178-185.
- Santos, A.V.; Dillon, R.J.; Dillon, V.M.; Reynolds, S.E.; Samuels, R.I. (2004) Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* *rubropilosa*. *FEMS Microbiology Letters*,

239(2):319-323.

- Silva, A., Bacci, M., Pagnocca, F. C., Bueno, O. C., Hebling, M. J. (2006) Production of polysaccharidases in different carbon sources by *Leucoagaricus gongylophorus* Möller (Singer), the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens linnaeus*. *Curr Microbiology*, (53):68–71.
- Silva, O.A. (1996) Microbiological changes in the nests of leaf-cutting ants fed on sesame leaves. *Journal of Applied Entomology*, 120(5):317-320.
- Silva, K.S.; Castellani, M.A.; Forti, L.C.; Moreira, A.A.; Lemos, O.L.; Carneiro, R.C.S.; Khouri, C.R.; Ribeiro, A.E.L. (2010) Architecture of nests of *Acromyrmex* (Moellerius) *balzani* (Formicidae: Myrmicini: Attini) in pasture. *Pes Apl Agrotecnol*, (3):107-116.
- Simões, L.P. (2018) Revisão sobre aplicações biotecnológicas de enzimas produzidas pelo fungo *Leucoagaricus gongylophorus* Singer (Moller) (Leucocoprinae: Agaricaceae) cultivado por formigas cortadeiras.
- Singer, R. (1986) The Agaricales in modern taxonomy. 4th ed. Koeltz Scientific Books: Germany, 981p.
- Siqueira, C.G.; Bacci, M.; Pagnocca, F.C.; Bueno, O.C.; Hebling, M.J. (1998) Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. *Applied and Environmental Microbiology*, (64): 4820-4822.
- Suh, S.O.; Marshall, C.J.; Mchugh, J.V.; Blackwell, M. (2003) Wood ingestion by passalid beetles in the presence of xylose-fermenting gut yeasts. *Molecular Ecology*, 12(11): 3137-3145.
- Teixeira, A.C.P.; Marini, M.M.; Nicoli, J.R.; Antonini, Y.; Martins, R.P.; Lachance, M.A.; Rosa, C.A. (2003) *Starmerella meliponinorum* sp.nov., a novel ascomycetous yeast species associated with stingless bees. London,

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53(1):339-343.

Tortora, G.J.; Funke, B.R.; Case, C.L; Microbiologia. 8ª edição. (1989) Porto Valicente, F.R. Levantamento dos inimigos naturais de *Spodoptera frugiperda* em diferentes regiões do Estado de Minas Gerais. *Anais SOC. Entomol. Bras.* 18:119-130.

Valicente, F.R. (1989) Levantamento dos inimigos naturais de *Spodoptera frugiperda* em diferentes regiões do Estado de Minas Gerais. *Anais SOC. Entomol. Bras.* (18):119-130.

Van Borm, S.; Billen, J.; Boomsma, J.J. (2002) The diversity of microorganisms associated with *Acromyrmex* leafcutter ants. *BMC Evolutionary Biology*, 2(1):1-11.

Vega, F.E.; Dowd, P.F. (2005) The role of yeasts as insect endosymbionts. *Insect-Fungal Associations: Ecology and Evolution.*, New York. *Oxford University Press*, p.211-243.

Veiga, M.M.; Silva, D.M.; Veiga, L.B.E.; Faria, M.V.C. (2006) Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. Rio de Janeiro. *Caderno de Saúde Pública*, 22(11):2391-2399.

Youngsteadt, E. (2008) All that makes fungus gardens grow. *Science*, 320(5879):1006-1007.