

DEISE FARIAS FREITAS

**EXIGÊNCIAS TÉRMICAS DO FUNGO CULTIVADO POR FORMIGAS
CORTADEIRAS DO GÊNERO *Acromyrmex* Mayr, 1865
(HYMENOPTERA, FORMICIDAE)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de conhecimento: Entomologia).

Orientador: Alci Enimar Loeck

Coorientadora: Daniela Isabel Brayer Pereira

Pelotas, 2010

Banca examinadora:

Dr. Alci Enimar Loeck (Orientador)

Dra. Cândida Renata Jacobsen de Farias

Dr. Flávio Roberto Mello Garcia

Dra. Patrícia da Silva Nascente

“Convenci-me de que a respeito da formiga, como em tudo quanto existe sobre a terra, nós, imaginando saber tudo, não sabemos quase nada, e que o pouco que aprendemos revela-nos principalmente o que nos falta aprender”.

MAETERLINCK

*Aos meus pais Antônio Luiz Rodrigues Freitas e
Irene Francisca Farias Freitas,
irmão Denilson pelo apoio e dedicação.*

Dedico e Ofereço

Agradecimentos

Este trabalho pode ser realizado graças a algumas instituições e pessoas, para as quais dou os meus sinceros agradecimentos:

Aos meus pais **Antônio** e **Irene** e meu irmão **Denilson**, em especial a minha **mãe Irene**, que desde o início da minha vida acreditou em mim, pelo apoio, torcida, assim como pelas horas e momentos de dedicação, paciência, conforto e, principalmente do amor dela por mim.

À Universidade Federal de Pelotas, em especial o Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel” (**FAEMUFPel**), pela oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPEs**) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. **Dr. Alci Enimar Loeck** pela valiosa orientação, consideração, confiança e amizade durante o curso e execução do trabalho, não poupando dedicação a minha formação profissional. Sob sua orientação tive a oportunidade de começar a conhecer o curioso mundo das formigas cortadeiras.

A todos os professores do Departamento de Fitossanidade da FAEM/UFPel, pelos ensinamentos transmitidos durante as disciplinas ministradas, em especial aos Profs. Drs. **Daniela Isabel Brayer Pereira** e **Mauro Silveira Garcia**, pela autorização do uso de suas dependências para a conclusão da dissertação.

Aos amigos de minha turma de mestrado (**Denise Moreira Vargas**, **Marcelo Perrone Ricalde** e **Michele Guimarães Donatti**) pela valiosa amizade,

companheirismo e compreensão, em todos os momentos do curso e aos demais colegas, pela amizade no decorrer do curso.

Ao **Dr. Alci Enimar Loeck**, **Msc. João Luis Osório Rosado**, **Msc. Marcelo Perrone Ricalde** e a **Msc. Michele Guimarães Donatti**, pela ajuda nas coletas.

As amigas de profissão **Michele Guimarães Donatti** e **Regina da Silva Borba**, por compartilhar comigo um pouco de seu vasto conhecimento sobre a vida das formigas.

Aos amigos **Msc. Marcelo Perrone Ricalde**, **Milton Fernando Cabezas**, **Deivid Magano** e **Rafael Gonçalves** pela ajuda extrema com a estatística da minha dissertação.

Aos meus parentes, primos, primas, e padrinhos por torcerem e sempre acreditarem no meu potencial, principalmente por entenderem minha ausência nas reuniões familiares.

Aos funcionários do Departamento de Fitossanidade da FAEM/UFPel, pelo apoio e dedicação, em especial aos amigos **Rosaria** e **Sergio Francisco Lima de Freitas**.

Ao **Gustavo** e **Patrícia**, pela gentileza em todos os momentos em que precisei da secretaria do curso.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta dissertação.

Resumo

FREITAS, Deise Farias. **Exigências térmicas do fungo cultivado por formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* Mayr, 1865 (Hymenoptera, Formicidae)**. 2010. 37f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS-Brasil.

As formigas cortadeiras, pertencentes à tribo Attini (Hymenoptera-Formicidae-Myrmicinae,) em especial o gênero *Acromyrmex*, situam-se entre as piores pragas da agricultura brasileira, pois cortam plantas e transportam pedaços para interior de seus ninhos. O material vegetal é usado para o cultivo do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer), do qual se alimentam. O trabalho teve como objetivo verificar a temperatura ideal para o crescimento e desenvolvimento do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*. Os fungos utilizados no trabalho provêm de três diferentes espécies de formigas cortadeiras, *Acromyrmex ambiguus* (Emery, 1887), *A. crassispinus* (Forel, 1909) e *A. heyeri* (Forel, 1899), fungos estes que foram isolados e repicados em placas de Petri, contendo meio de cultura SILVA-PINHATI et al. (2005). Como tratamentos foram utilizados seis temperaturas (15,18, 22, 25, 28 e 30 °C), onde se avaliou o halo de crescimento do fungo aos 63 dias após o seu estabelecimento no meio de cultura. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo que para cada temperatura foram feitas 20 repetições. Os dados foram analisados pelo programa MOBAE. O valor do limiar térmico inferior de desenvolvimento (Tb) para o fungo simbiote *L. gongylophorus* cultivado pela espécie *A. ambiguus*, foi de 16,22°C, para o período estudado, respectivamente, com limite térmico ótimo de desenvolvimento entre 19,39°C e 21,02°C.

O modelo adotado não se ajustou para os fungos cultivados por *A. crassispinus* e *A. heyeri* mostrando que as faixas de temperaturas adotadas não foram adequadas para aquelas espécies, evidenciando assim exigências térmicas diferentes.

Palavras-chave: Temperatura, *Leucoagaricus gongylophorus*, Insecta.

Abstract

FREITAS, Deise Farias. **Thermal requirements of fungi cultivated by leaf cutting ants of the genus *Acromyrmex* Mayr, 1865 (Hymenoptera, Formicidae).** 2010.37f. Dissertation (Master of Science) – Post Graduate Program in Phytosanitary. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS-Brasil.

Leaf-cutting ants belonging to Attini (Hymenoptera-Formicidae-Myrmicinae), especially the genus *Acromyrmex*, are among the worst pests of Brazilian agriculture, because plants and cut pieces to carry inside their nests. The plant material is used for growing *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer), from which they feed. The study aimed to determine the optimal temperature for growth and development of the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer). The fungi used in the study come from three different species of leaf cutting ants: *Acromyrmex ambiguus* (Emery, 1887), *Acromyrmex crassispinus* (Forel, 1909) and *Acromyrmex heyeri* (Forel, 1899), that these fungi were isolated and layered on Petri dishes containing culture medium SILVA-PINHATI et al. (2005). The treatments used were the temperatures 15, 18, 22, 25, 28 and 30°C, which evaluated the halo of growth of the fungus 63 days after its establishment in the culture medium. The experimental design was randomized, and for each temperature were 20 repetitions. Data were analyzed by the MOBAE program. The value of the lower development threshold temperature (Tb) for the symbiotic fungus *L. gongylophorus* cultivated by the species *A. ambiguus*, were 16.22°C, for the period studied with excellent development thermal threshold between 19.39°C and 21.02°C. The model adopted did not set the fungi cultivated by *A. crassispinus* and *A. heyeri*, showing that the temperature ranges adopted were not appropriate for those species, thus revealing different thermal requirements.

Keywords: Temperature, *Leucoagaricus gongylophorus*, Insecta

Lista de Figuras

- Figura 1 Cladograma com as relações filogenéticas da tribo Attini. Em verde os gêneros do grupo das Attini basais; em vermelho e azul o grupo das Attini derivadas; e em azul as formigas cortadeiras.....14
- Figura 2 Característica morfológica das espécies de formigas cortadeiras das quais foram obtidos os fungos *A. ambiguus* Emery, 1887 (A) *A. heyeri* Forel, 1899 (B) *A. crassispinus* Forel, 1909(C).....16
- Figura 3 A- Representação esquemática do ciclo sexual de um fungo basidiomiceto. B- representação esquemática da formação do basídio, a hifa especializada onde ocorre a meiose para a formação dos basidiósporos.....20
- Figura 4 Crescimento do fungo simbiote de *Acromyrmex ambiguus* Emery, 1887 (A) e *Acromyrmex crassispinus* Forel, 1909 (B) em meio de cultura YNBG, 30 dias de incubação a 25°C.....24
- Figura 5 Fungo simbiote cultivado por *Acromyrmex crassispinus* Forel, 1909 apresentando hifas contendo intumescências em suas extremidades, denominadas gongílideos (setas). Exame direto com azul de algodão de micélio com 30 dias de cultivo a 25°C (objetiva 400X).....24
- Figura 6 Duração (dias), velocidade de desenvolvimento (1/dias) e temperatura basal (Tb) de *Acromyrmex. Ambiguus* Emery, 1887.....25
- Figura 7 Crescimento micelial (mm) de *Acromyrmex crassispinus* Forel, 1909, durante 63 dias de avaliação, em temperaturas de 18, 22, 25 e 28°C, em laboratório.....27
- Figura 8 Crescimento micelial (mm) de *Acromyrmex heyeri* Forel, 1899, durante 63 dias de avaliação, em temperaturas de 18, 22, 25 e 28°C, em laboratório.....28

Sumário

1	Introdução geral.....	12
2	Revisão de literatura.....	15
2.1	As formigas que cultivam fungos.....	15
2.2	Gênero <i>Acromyrmex</i> Mayr, 1865.....	16
2.3	Fungo simbiote.....	17
2.4	Ciclo de vida dos fungos basidiomicetos.....	20
3	Metodologia geral.....	22
3.1	Local de estudo.....	22
3.2	Obtenção do fungo simbiote.....	22
3.3	Meio de cultura.....	23
3.4	Cultivo e isolamento do fungo simbiote.....	23
3.5	Influência da temperatura no crescimento do fungo simbiote.....	23
3.6	Análise estatística.....	24
4	Resultados e Discussão.....	25
4.1	Cultivo e Isolamento do fungo simbiote.....	25
4.2	Exigências térmicas do fungo simbiote cultivado por formigas cortadeiras do gênero <i>Acromyrmex</i> Mayr, 1865	27
4.3	Crescimento micelial <i>in vitro</i> do fungo simbiote cultivado por três espécies de formigas cortadeiras do gênero <i>Acromyrmex</i> Mayr, 1865 em diferentes temperaturas.....	28
5	Considerações gerais.....	31
6	Referências.....	32

1. Introdução geral

A tribo Attini (Subfamília Myrmicinae) é um clado de formigas compostas por cerca de 220 espécies (MULLER et al., 2005) distribuída em 13 gêneros (BRANDÃO & MAYHÉ-NUNES, 2001), todos obrigatoriamente dependentes do cultivo do fungo simbiote para sua alimentação e sobrevivência (MULLER et al., 2005). *Acromyrmex* Mayr, 1865 é um dos gêneros mais apomórficos dessa tribo, constituindo um clado popularmente conhecido como formigas cortadeiras, devido ao seu hábito de cortar flores e folhas para cultivar seus fungos (CURRIE, 2002).

O fungo cultivado pelas formigas cortadeiras da Tribo Attini pertence ao filo Basidiomycota, representado aproximadamente por 22.300 espécies. Apresentam estruturas típicas, como: basídio (responsável pela produção dos basidiósporos - esporos), parede celular com quitina e hifas com septos perfurados. A maioria possui vida livre (terrestres), poucos são simbióticos (líquens) ou parasitas, e algumas espécies ainda se adaptaram ao ambiente aquático. São representados pelos cogumelos comestíveis e venenosos, alguns fitopatógenos (ferrugens e carvões) e leveduras (FREDGARDSON, 2009). O fungo simbiote, *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer), produz hifas e gongilídeos que são tidos como a principal fonte de nutrientes para as formigas, especialmente para as larvas (QUINLAN; CHERRETT, 1979).

Grande parte da biomassa vegetal coletada não é de fato consumida diretamente pelas formigas, sendo usada como substrato para o desenvolvimento do fungo mutualístico, o qual, em troca oferece nutrientes para as colônias. O fungo cultivado constitui a única fonte de alimento para as larvas dessas formigas. Já os indivíduos adultos têm apenas parte de seu requerimento nutricional oriundo do fungo, sendo o restante obtido através da ingestão de seiva de vegetais durante a

manipulação do substrato (BASS; CHERRETT, 1995; MULLER et al., 2005). Em troca, o fungo recebe os cuidados empregados pelas formigas para o seu bom crescimento, como o fornecimento de um farto suprimento de substrato, proteção contra inimigos e propagação para as novas colônias (NASCIMENTO et al., 1996; CURRIE, 2002; CURRIE et al., 2003; MEHDIABADI et al., 2006).

Este fungo simbiote ainda não tem uma taxonomia claramente definida e aceita entre os especialistas, devido à ausência de frutificação sob condições de laboratório (BORBA et al., 2006). Além disso, eles apresentam baixa velocidade no crescimento e compartilham o substrato com diferentes microrganismos oportunistas, dificultando ainda mais as pesquisas realizadas (SILVA-PINHATI et al., 2005).

Tradicionalmente, a identificação de fungos baseia-se na morfologia dos órgãos reprodutivos. Para o fungo simbiote das formigas cortadeiras não se tem observado a produção de esporos ao nível de campo e de laboratório, e acredita-se que eles tenham se adaptado às diferentes condições de meio oferecidas pelas formigas (BORBA et al., 2007).

Vários trabalhos com extratos de plantas para verificar o efeito sobre o desenvolvimento do fungo simbiote também têm sido realizados. Borba et al. (2005) avaliaram o crescimento do fungo simbiote, *L. gongylophorus*, cultivado pela formiga *A. heyeri* Forel, 1899, em diferentes meios de cultura, sendo que o maior diâmetro e peso seco foram observados quando cultivado no meio de cultura contendo farelos de arroz e de trigo na sua composição.

Já em 2006, a mesma autora desenvolveu o fungo de *A. ambiguus* Emery, 1887, *A. crassispinus* Forel, 1909, *A. heyeri* Forel, 1889 e *A. lundi* (Guerin, 1838) em meios de cultura acrescidos de melão e de extratos de azevém (*Lolium multiflorum* Lam.), de tifa (*Typha angustifolia* L.) e de formiga (*Atta sexdens piriventris* Santschi, 1919). O meio de cultura desenvolvido por Pagnocca (glucose 10g, cloreto de sódio 5g, bacto peptona 5g, extrato de malte 10g, ágar 15g, água destilada 1000 ml) PAGNOCCA et al. (1990) mostrou-se o mais adequado para o desenvolvimento do fungo daquelas formigas. Esse resultado corrobora com aquele encontrado no trabalho de Loeck et al. (2004), no qual, avaliando quatro diferentes meios de cultura (Pagnocca, Murashige & Scoog, V₈ juice ágar e Celulose-asparagine) sobre o crescimento do fungo de *A. sexdens piriventris* e *A. heyeri*, observaram que, para ambas as espécies, o meio Pagnocca apresentou maior crescimento micelial.

Em continuidade a este trabalho, Borba et al. (2006), expuseram diferentes isolados de fungos de diferentes espécies de *Attini* oriundos de locais distintos à luz ultravioleta e realizou pareamentos entre os mesmos, para verificar a ocorrência de heterocariose. Neste trabalho pôde ser constatada a grande variabilidade na morfologia dos fungos cultivados por diferentes espécies de formigas e que, a exposição à radiação de luz UV, além de alterar a coloração e margem das colônias, produziu isolados mais dissimilares comparados aos não submetidos a esta condição. Estas análises foram realizadas ainda através da técnica de AFLP, que também verificou a diferença genética de isolados de fungos que foram pareados sugerindo a ocorrência de heterocariose.

O crescimento do fungo *in vitro* é muito lento. Apesar de existirem trabalhos sobre exigência nutricional (BORBA et al., 2006; BORBA et al., 2008 e LOECK et al., 2004) não existem trabalhos sobre sua exigência térmica, de maneira que os trabalhos vem sendo desenvolvidos em temperaturas em torno de 25°C (PAGNOCCA et al., 1990; LOECK et al., 2004; BORBA et al., 2006; SILVA-PINHATI et al., 2005). No entanto, para otimizar seu crescimento em laboratório torna-se importante conhecer a melhor temperatura, além de verificar se as exigências são as mesmas para os fungos cultivados pelas diferentes espécies de formigas.

O fungo simbiote das formigas cortadeiras possui crescimento muito lento em laboratório, dificultando a realização de pesquisas. Por este motivo, o trabalho foi realizado com o objetivo de verificar o efeito da temperatura sobre o crescimento e desenvolvimento de fungos cultivados por três espécies de formigas pertencentes ao gênero *Acromyrmex*: *A. ambiguus*, *A. crassispinus* e *A. heyeri* em meio de cultura YNBGC (SILVA-PINHATI et al., 2005) em condições de laboratório.

2. Revisão de literatura

2.1 As formigas que cultivam fungos

Entre mais de 9500 espécies de formigas existentes (Formicidae) (BOLTON, 1995) existem cerca de 22 espécies que cultivam fungos para a sua alimentação, todas descritas na tribo Attini (Subfamília Myrmicinae), formando um grupo monofilético (WETTERER et al., 1998; MULLER et al., 2005) abrangendo 13 gêneros (BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES, 2001) (Figura1).

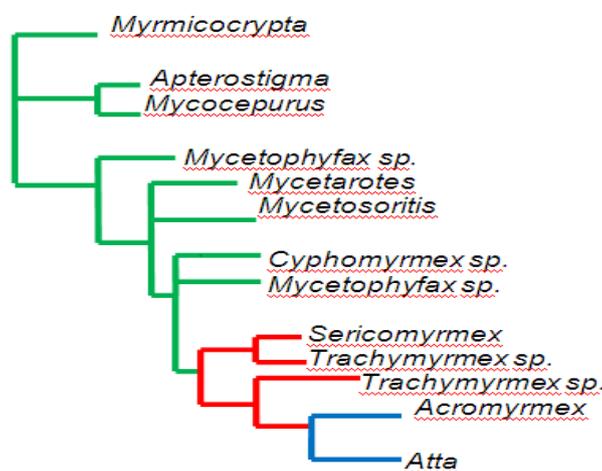


Figura 1. Cladograma com as relações filogenéticas da tribo Attini. Em verde os gêneros do grupo das Attini basais; em vermelho e azul o grupo das Attini derivadas; e em azul as formigas cortadeiras. Fonte: Villesen, 2001.

Formigas cortadeiras são aquelas que possuem o hábito de cortar as folhas e partes vegetais que servem de substrato para o crescimento de um fungo simbiote, a fim de garantirem a sua sobrevivência (FISHER et al., 1994; CARLOS, 2009). O material cortado é transportado para o interior do formigueiro, para uma

câmara destinada ao cultivo do fungo que serve de alimento para larvas e adultos (ANA, 2010). São os chamados “jardins de fungos” (PAGNOCCA et al., 2001). Elas causam grandes prejuízos à agricultura brasileira, pelo fato de atacarem praticamente todas as plantas cultivadas e estarem disseminadas por todo o território nacional, efetuando sua ação prejudicial durante todo o ano (LOECK, GRÜTZMACHER, 2001).

2.2 Gênero *Acromyrmex* Mayr, 1865

O gênero *Acromyrmex* de acordo com Mariconi (1970) é nativo da América do Sul, ocorrendo em quase todos os países do continente, encontrando-se amplamente distribuído no território brasileiro.

As formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* vulgarmente conhecidas como “quenquéns”, são pragas muito prejudiciais em diversas regiões do País. Atacam as lavouras e pomares, diminuindo a produção, pois cortam as folhas e enfraquecem as plantas (MARICONI, 1970; DELLA LUCIA, 1993).

Na região Sul do Rio Grande do Sul (RS), segundo Gusmão, Loeck (1999), são encontradas as seguintes espécies de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex*: *A. heyeri* Forel, 1899, *A. lundi* (Guerin, 1838), *A. ambiguus* Emery, 1887, *A. striatus* (Roger, 1863), *A. crassispinus* Forel, 1909, *A. laticeps* Emery, 1905 e *A. lobicornis* (Emery, 1887), sendo *A. heyeri*, *A. lundi* e *A. ambiguus*, predominantes no RS. Segundo a mesma autora, com exceção de *A. lobicornis*, as demais espécies apresentam ampla distribuição geográfica na região Sul do Estado.

O presente trabalho foi realizado com fungos cultivados por *A. ambiguus*, *A. heyeri* e *A. crassispinus* (Fig. 2), pela facilidade de obtenção dos fungos de seus ninhos.

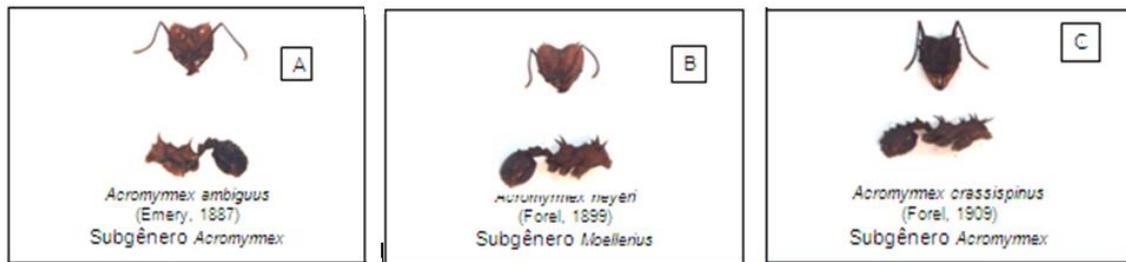


Figura 2. Característica morfológica das espécies de formigas cortadeiras das quais foram obtidos os fungos *A. ambiguus* Emery, 1887(A) *A. heyeri* Forel, 1899 (B) *A. crassispinus* Forel, 1909 (C), com detalhe do escapo antenal. Pelotas-RS, 2008. (GRUTZMACHER; LOECK, 2005).

2.3 Fungo simbiote

O fungo simbiote, *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer), cultivado pelas formigas cortadeiras da Tribo Attini pertence ao Filo Basidiomycota, representado aproximadamente por 22.300 espécies. O Filo Basidiomycota compreende todos os fungos que produzem basidiósporos, que é um meiósforo produzido em uma célula altamente especializada, o basídio. São predominantemente miceliais, embora possam ser unicelulares ou pseudomiceliais.

Os basidiomicetos caracterizam-se por apresentarem micélio constituído de hifas septadas que podem ser simples ou possuírem ansas ou septo dolipórico, estruturas características do grupo, os quais são utilizados na transferência de um dos núcleos após a divisão. As hifas caracterizam-se pela presença de quitina em suas paredes celulares e pela síntese de um sistema multienzimático para o aminoácido lisina (BERBEE; TAYLOR, 1992). Estes fungos possuem os basídios, que são estruturas reprodutivas, responsáveis pela produção dos esporos denominados basidiósporos, de origem sexuada. Os basídios podem se agrupar em um corpo de frutificação, constituindo o basidiocarpo conhecido como cogumelo (BONONI, 1998).

O fungo mutualista, *L. gongylophorus*, das formigas do gênero *Acromyrmex* produz, nas extremidades de suas hifas, intumescências chamadas de gongilídeos. Essas estruturas são consideradas elementos adaptativos à longa existência conjunta entre os fungos e as formigas destes gêneros. São formados por abundantes vacúolos ricos em nutrientes e servem como fonte de alimento para as formigas. Além do elevado valor nutricional, os gongilídeos se reúnem em conjuntos

chamados estáfilos o que facilita a coleta e o transporte desses “pacotes nutricionais” (MUELLER, 2002).

Segundo Vasconcelos e Fowler (1990) a associação simbiótica estabelecida entre as formigas e os fungos que cultivam, resulta no seu sucesso ecológico na natureza.

Este fungo simbionte ainda não tem uma taxonomia claramente definida e aceita entre os especialistas, devido à ausência de frutificação (BORBA et al., 2006). Além disso, eles apresentam baixa velocidade no crescimento e compartilham o substrato com diferentes microrganismos oportunistas, dificultando ainda mais as pesquisas realizadas (SILVA-PINHATI et al., 2005).

Na tentativa de superar as dificuldades da taxonomia tradicional foram realizadas descrições de estruturas do micélio por Angeli-papa e Eymé (1985) de *Atta sp.*, *Acromyrmex sp.* e *Trachymyrmex sp.*, e por Brancher (1993) do gênero *Acromyrmex* e estudos moleculares (CHAPELA et al., 1994; HINKLE et al., 1994 e MUELLER et al., 1998) cujos resultados serviram apenas para comprovar que os fungos cultivados pelos Attini são basidiomicetos.

Trabalhos realizados por Loeck et al. (2000) mostraram diferentes respostas dos fungos cultivados por diferentes espécies de *Atta* e *Acromyrmex*, em relação aos meios de cultivo e pH's, evidenciando um processo co-evolutivo entre fungo e formigas.

Vários trabalhos com extratos de plantas para verificar o efeito sobre o desenvolvimento do fungo simbionte também têm sido realizados (BORBA et al., 2006). Um estudo realizado com macerados de folhas de *Citrus spp.*, *Ligustrum spp.*, *Acalypha spp.*, *Eucalyptus spp.*, *Alchornea triplinervia* e *Melia spp.* adicionados ao meio de cultura mostrou que as plantas maceradas afetaram diretamente o desenvolvimento do fungo simbionte (CAMARGO et al., 2003). KHOURI et al. (2003), avaliaram o efeito de extratos de gramíneas forrageiras no crescimento do fungo simbionte de *Acromyrmex balzani* Emery 1890, concluíram que o capim tifton (*Cynodon dactylon* (L.) Pers) e o capim pangola (*Digitaria decumbens* Stent.) promoveram melhor crescimento do fungo. Outros trabalhos mostraram que extratos foliares de algumas espécies vegetais, como *Canavalia ensiformis* (L.) DC (fava-branca) e *Sesamum indicum* L. (gergelim), inibiram o desenvolvimento do fungo simbionte de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (RIBEIRO, 1994; TORKOMIAN, 1994).

Brancher (1993) analisou morfológicamente o fungo cultivado pelas formigas cortadeiras das espécies *A. ambiguus*, *A. heyeri* e *A. sexdens piriventris* e encontrou diferenças tanto no diâmetro como em comprimento das hifas infladas, entre os isolados das diferentes espécies, assim como entre isolados provenientes da mesma espécie de formiga.

Borba et al. (2005) avaliaram o crescimento do fungo simbiote *L. gongylophorus*, cultivado pela formiga *A. heyeri*, em diferentes meios de cultura, sendo que o maior diâmetro de crescimento e peso seco foi observado quando cultivado no meio de cultura contendo farelos de arroz e de trigo na sua composição.

Borba et al. (2006) verificaram o crescimento do fungo de *A. ambiguus*, *A. crassispinus*, *A. heyeri* e *A. lundii* em meios de cultura acrescidos de melão e de extratos de azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) e folhas de tifa (*Typha angustifolia* L.). O meio de cultura desenvolvido por Pagnocca et al. (1990) proporcionou melhor desenvolvimento do fungo daquelas formigas. Loeck et al. (2004) em seus estudos, avaliou quatro diferentes meios de cultura (Pagnocca, M&S, V₈ juice ágar e Celulose-asparagine) sobre o crescimento do fungo de *Atta sexdens piriventris* e *A. heyeri*, observaram que, para ambas as espécies, o meio Pagnocca apresentou maior crescimento micelial.

Em continuidade a este trabalho, Borba et al. (2006) expuseram isolado de fungos de diferentes attines oriundos de locais distintos do RS, à luz ultravioleta onde pode ser constatada a grande variabilidade na morfologia dos fungos cultivados por diferentes espécies de formigas e que a exposição à radiação de luz UV, além de alterar a coloração e margem das colônias, produziu isolados mais dissimilares comparados aos não submetidos a este teste.

A temperatura é um dos fatores abióticos mais importantes para o desenvolvimento dos fungos. Segundo Ferron (1978), a temperatura afeta o crescimento do micélio de fungos, enquanto outros autores relatam que a germinação dos conídios e esporos também são afetada por este fator (YENDOL, 1968; ALVES & NOGUEIRA, 1984).

Loureiro et al. (2002) realizaram o estudo do efeito de quatro temperaturas (22, 25, 28 e 31°C) e de três regimes de luz no desenvolvimento do fungo *Sporothrix insectorum* sendo avaliado o crescimento vegetativo, reprodutivo, produção e viabilidade do fungo, e verificou que o crescimento vegetativo do fungo, promovido pelas temperaturas de 22, 25 e 28°C, foi semelhante, proporcionando um maior

desenvolvimento do fungo quando comparadas ao fungo mantido à temperatura de 31°C. Porém, verificou-se que a produção de conídios foi maior a 28°C, enquanto que a temperatura de 31°C limitou o crescimento de micélio e reduziu drasticamente a viabilidade dos conídios.

Castro et al. (2006) avaliaram condições favoráveis ao desenvolvimento de cinco fungos xilófagos pertencentes à classe dos basidiomicetos do gênero *Panus spp.* Utilizaram meio de cultura e cinco temperaturas na faixa entre 25 a 40°C e observaram que a temperatura de 35°C, foi a melhor para todas as amostras, evidenciando que a velocidade do crescimento micelial das amostras foi maior em razão do aumento da temperatura.

O gênero de *Pleurotus* tem sua faixa ótima de crescimento entre 20 e 30°C, (BONONI; CAPELARI, 1985).

Sabendo-se que a temperatura influi, diretamente, no desenvolvimento micelial fúngico, estudos mais avançados sobre as condições térmicas são necessárias para otimizar o crescimento dos fungos cultivados por formigas cortadeiras *in vitro*.

2.4 Ciclo de vida dos fungos basidiomicetos

Segundo Alexopoulos et al. (1996), os “fungos verdadeiros” apresentam processos de reprodução sexuada em que a germinação de um esporo origina hifas constituídas por células dotadas de um único núcleo (monocarióticas), as quais constituem o micélio primário. O processo sexuada tem início com o encontro de dois micélios sexualmente compatíveis. Ao entrar em contato, as hifas se fundem (plasmogamia), originando hifas dicarióticas. Estas são constituídas por células com dois núcleos, cada um deles descendente de um núcleo de um dos micélios que se fundiram. Ao se dividir, as células fornecem um exemplar de cada um de seus núcleos a suas células-filhas, de modo que a condição dicariótica se mantém nas novas hifas formadas. O novo micélio constituído por hifas dicarióticas, conhecido como micélio secundário, cresce e se desenvolve. Os micélios secundários dicarióticos constituem a base predominante no ciclo de vida dos basidiomicetos. Certas espécies formam hifas especiais, que emergem do solo e forma o corpo de frutificação, chamado de basidiocarpo. Em determinada fase do ciclo, a célula terminal de certas hifas adquire a forma de uma clava e passa a ser denominada

basídio. Os dois núcleos do basídio fundem-se (cariogamia), originando um núcleo diplóide que, imediatamente, se divide por meiose e produz quatro núcleos haplóides (FIGURA 3a).

Enquanto a meiose ocorre, formam-se na superfície do basídio quatro protuberâncias em forma de dedos. Cada um dos núcleos haplóides gerados na meiose migra para o interior de uma dessas protuberâncias, a qual se isola do resto do basídio e desenvolve uma parede grossa e resistente, transformando-se em um basidiósporo. Os basidiósporos maduros desprendem-se do basídio e dispersam-se pelo ar. Ao encontrar condições favoráveis, o basidiósporo germina e origina um novo micélio primário, que repetirá o ciclo (FIGURA 3b).

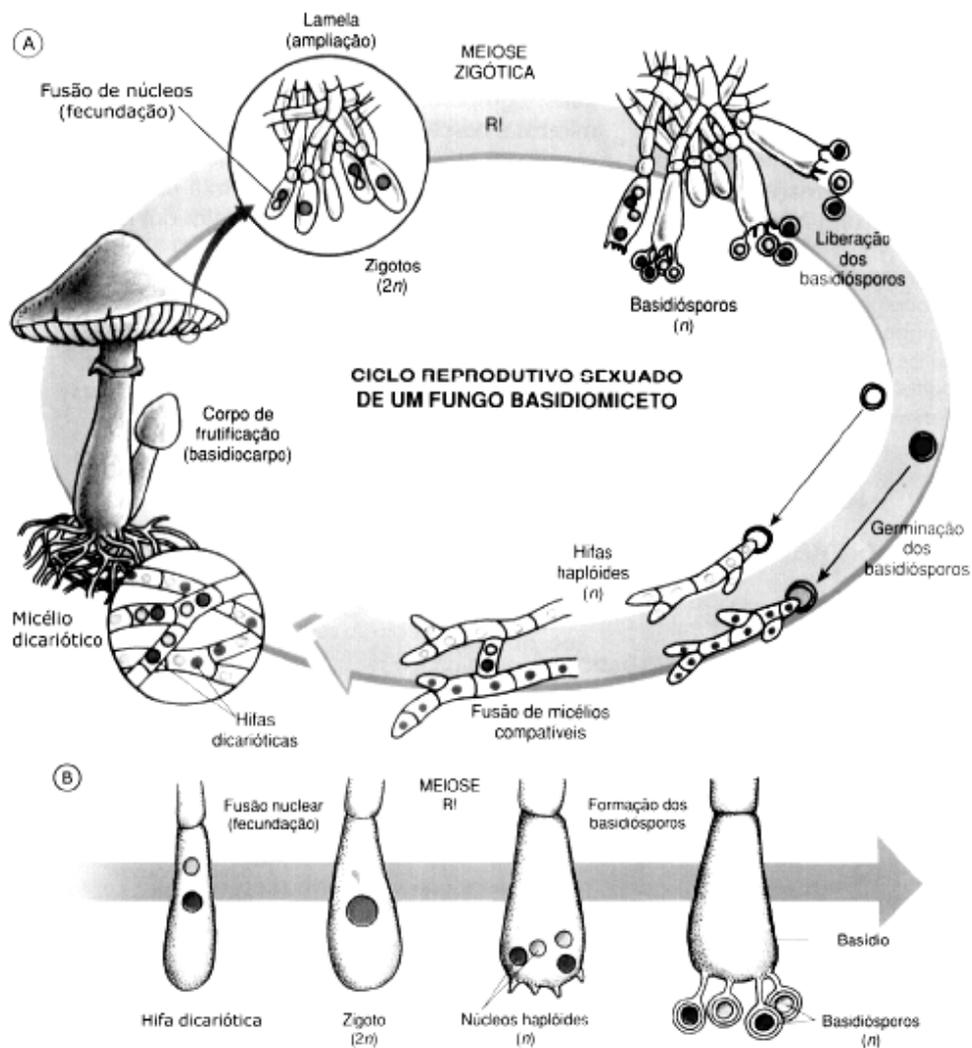


Figura 3. A- Representação esquemática do ciclo sexual de um fungo basidiomiceto. B- representação esquemática da formação do basídio, a hifa especializada onde ocorre a meiose para a formação dos basidiósporos. Adaptado de AGRIOS, 2002.

3. Metodologia geral

3.1 Local de estudo

O trabalho foi realizado no Laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (DEMP) do Instituto de Biologia (IB) e nos Laboratórios de Mirmecologia e Biologia de Insetos, ambos do Departamento de Fitossanidade (DFs) da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM), Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, RS.

3.2 Obtenção do fungo simbiote

O fungo foi coletado diretamente de ninhos de três espécies de formigas cortadeiras: *Acromyrmex ambiguus*, *A. crassispinus* e *A. heyeri*. A primeira espécie, juntamente com o fungo, foi coletada no município de Capão do Leão, RS, no campus da Universidade Federal de Pelotas, coordenadas 30°55'57,96" S e 51°49'17,55" O. As demais no município de Bagé, RS, na Chácara Dois Coqueiros possui área total de 25ha, localizada na BR 153, Km 3,5, coordenadas 31°21'03,26" S e 54° 06'52, 76" O. Os ninhos foram localizados e as amostras do jardim de fungo, juntamente com formigas, foram coletadas e transportadas, em caixa Gerbox, para o laboratório, sendo mantidos no escuro a 25°C e UR 80% por 48h, aguardando as formigas reorganizar e limpar a esponja de fungos para então iniciar o isolamento.

3.3 Meio de cultura

Os fungos foram inoculados sobre o meio Yeast Nitrogen Base Cloranfenicol Glicose (YNBGC), ágar constituído de Yeast Nitrogen Base (YNB, Difco 100697) suplementado com (gl-1) de glucose (Merck, 108342, Darmstadt, Germany), 5g; ágar-ágar (Merck, 101614), 17g; cloranfenicol (Sigma C-0378). Para a manutenção usou-se YNB glicose-ágar (YNBGC isto é, sem Cloranfenicol) (SILVA-PINHATI et. al., 2005). Todos os meios foram autoclavados por 20 minutos a 120°C.

3.4 Cultivo e isolamento do fungo simbiote

Pequenos fragmentos do micélio do fungo simbiote foram assepticamente transferidos para placas de Petri contendo o meio ágar YNBGC. Todas as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 25°C por 30 dias. Após esse período as colônias com características do fungo simbiote, foram repicadas para YNB glicose-ágar (sem cloranfenicol), ficando incubadas em estufa microbiológica a 25°C por 30 dias.

As colônias obtidas foram submetidas à avaliação micromorfológica, por meio de exame direto, entre lâmina e lamínula com corante azul de algodão para avaliação de estruturas características de basidiomicetos, assim como: hifas contendo em suas extremidades intumescências chamadas de gongilídeos e grampos de conexão.

3.5 Influência da temperatura no crescimento do fungo simbiote

O experimento foi realizado em câmaras climatizadas do tipo BOD, utilizando as temperaturas de 15, 18, 22, 25, 28 e 30°C. A partir das culturas dos fungos simbiotes mantidos em meio de cultura YNBG, blocos de 4 mm de diâmetro foram cortados, com o auxílio de um vazador, previamente esterilizado. Para cada um dos fungos simbiotes isolados das espécies *A. ambiguus*, *A. heyeri* e *A. crassispinus*, realizou-se 20 repetições por temperatura avaliada.

O crescimento micelial do fungo foi avaliado macroscopicamente com base no diâmetro da colônia. As medidas foram avaliadas em milímetros, em intervalos semanais, totalizando nove avaliações aos 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 e 63 dias após a inoculação.

3.6 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com fatorial AxBxC, sendo 3 espécies de formiga cortadeira x 6 temperaturas x 9 avaliações. A unidade experimental constou de uma placa, sendo 20 repetições por temperatura. A partir dos resultados obtidos, determinou-se o limite inferior de temperatura (Tb) que foram calculados pelo método da hipérbole, utilizando-se o software Mobae (HADDAD & PARRA, 1984).

4. Resultados e Discussão

4.1 Cultivo e isolamento do fungo simbiote

O estabelecimento do fungo simbiote no meio de cultura foi um processo bastante trabalhoso que exigiu uma série de tentativas antes de se conseguir obter culturas dos fungos mutualistas crescendo livres de agentes contaminantes. O micélio dos fungos isolados das três espécies de formigas avaliadas apresentou-se de aspecto algodinoso e branco (Figura 4). A presença de gongilídeos somente foi observada no fungo isolado de *Acromyrmex crassispinus* (Figura 5), caracterizando-se em *Leucoagaricus gongylophorus*. Os gongilídeos estão presentes no fungo simbiote das Attini dos gêneros apomórficos, sendo caracterizado pela capacidade de formar, em um dado momento do seu desenvolvimento, nas extremidades das hifas, intumescências semelhantes a uma bolsa contendo nutrientes, denominadas de gongilídeos (WEBER, 1972). Essas estruturas são consideradas elementos adaptativos à longa existência conjunta entre os fungos e as formigas deste gênero. Os gongilídeos são formados por abundantes vacúolos ricos em glicogênio, possuem em seu interior carboidratos, aminoácidos e pequena quantidade de lipídeos e servem como fonte de alimento para as larvas das Attini. Além do elevado valor nutricional, os gongilídeos se reúnem em conjuntos de hifas ou estáfilas que ficam distribuídas por toda a superfície da esponja de fungo o que facilita a coleta e transporte desses “pacotes nutricionais” pelas formigas (HOLDOBLER et al., 1990; MOHALI, 1998; MUELLER et al., 2001; MUELLER, 2002).

Outros autores também descreveram a presença dos gongilídeos em fungos cultivados por formigas do gênero *Acromyrmex* como: *A. crassispinus* (SILVA-PINHATI et

al., 2005; BORBA et al., 2007), sendo que este último autor cita a presença dos gongilídeos também em fungos cultivados por *A. lundii*. No entanto, a presença de gongilídeos é ressaltada ainda em fungos cultivados por formigas do gênero *Atta*, mais precisamente por *Atta sexdens rubropilosa* (TANIGUSHI, 2007; MIYASHIRA et al., 2010). Os grampos de conexão foram observados no fungo isolado da espécie *A. ambiguus* e *A. heyeri*, o que confirma a identificação como um basidiomiceto.

Silva-Pinhati et al. (2005) e Borba et al. (2007) em seus estudos isolaram basidiomicetos das espécies *A. crassispinus*, *A. ambiguus*, *A. heyeri* e *A. lundii* com características das colônias, similares às encontradas no presente estudo.

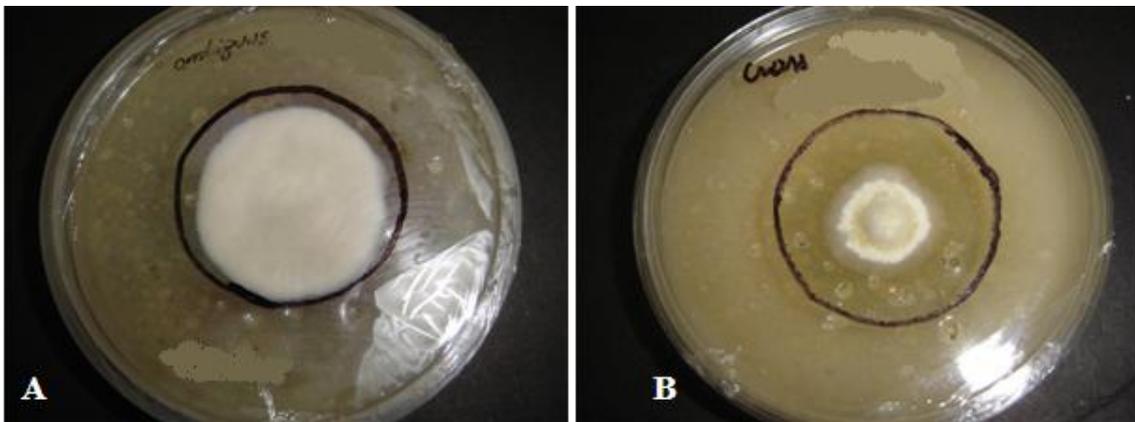


Figura 4. Crescimento do fungo simbiote de *Acromyrmex ambiguus* Emery, 1887 (A) e *Acromyrmex crassispinus* Forel, 1909 (B) em meio de cultura YNBG, 30 dias de incubação a 25°C.

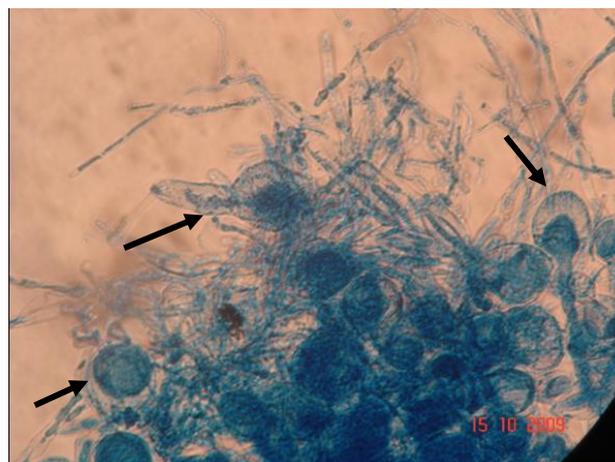


Figura 5. Fungo simbiote cultivado por *Acromyrmex crassispinus* Forel, 1909 apresentando hifas contendo intumescências em suas extremidades, denominadas gongilídeos (setas). Exame direto com azul de algodão de micélio com 30 dias de cultivo a 25°C (objetiva 400X).

4.2 Exigências térmicas do fungo simbiote cultivado por formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* Mayr, 1865

O limite inferior da temperatura (T_b) foi calculado pelo método da hipérbole, conforme proposto por HADDAD & PARRA (1984) com as temperaturas de 18°C, 22°C, 25°C e 28°C.

Quanto às exigências térmicas, o modelo matemático estimado foi $(1/D = -0,161171 + 0,009934X)$, onde $1/D$ = velocidade de desenvolvimento e X = temperatura em °C), cujo teste χ^2 ($\chi^2 = 11.1451$), com coeficiente de determinação de 81,96. Para a temperatura base (limiar térmico inferior de desenvolvimento) foi encontrado o valor de 16,22°C. Com os valores estimados construiu-se também um gráfico da velocidade de desenvolvimento (Figura 6) em função da temperatura.

A partir da equação da reta determinou-se o limite inferior de temperatura (T_b) para *A. ambiguus*. A temperatura base foi de 16,22°C (Figura 6).

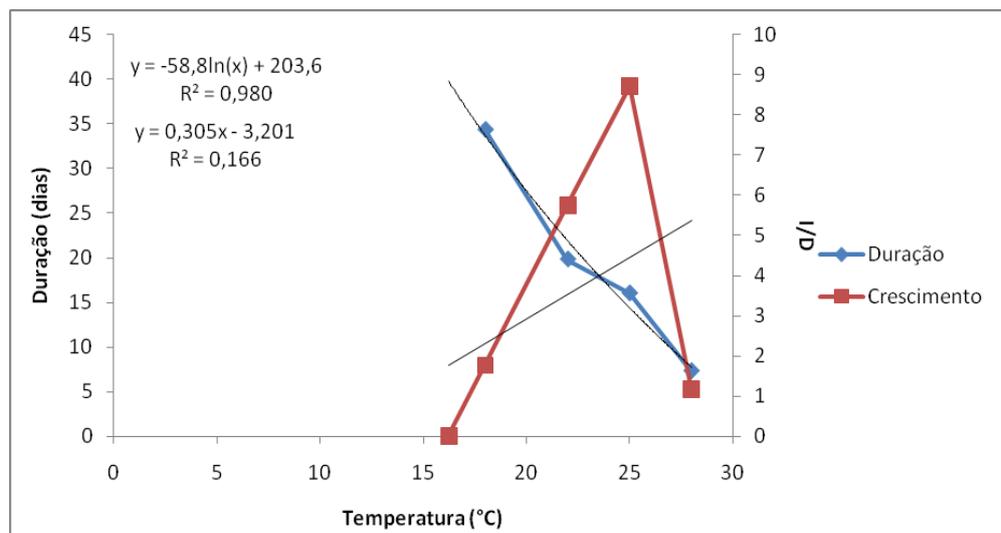


Figura 6. Duração (dias), velocidade de desenvolvimento (1/dias) e temperatura basal (T_b) de *Acromyrmex ambiguus* Emery, 1887.

A velocidade de desenvolvimento para as temperaturas estudadas ajustou-se para *A. ambiguus*, cuja T_b foi de 16,22°C com limite térmico ótimo de desenvolvimento entre 19,39°C e 21,02°C. Para os fungos cultivados por *A. crassispinus* e *A. heyeri* o modelo não se ajustou mostrando que as faixas de temperatura adotadas não foram adequadas para os mesmos, evidenciando assim

que suas exigências térmicas são diferentes. Entretanto, outros estudos, utilizando outros intervalos de temperaturas diferentes das avaliadas aqui, deverão ser realizados para o fungo destas espécies.

Em fungos basidiomicetos inexistem estudos que avaliem a constante térmica e determinem a temperatura ideal para otimizar o cultivo e crescimento destes fungos. Normalmente, os trabalhos realizados visando o cultivo *in vitro* de fungos simbiotes de formigas são conduzidos em temperaturas fixadas em 25°C (LOECK et al., 2004; SILVA-PINHATI et al., 2005; BORBA et al., 2008). Desta forma, estudos que avaliem as exigências térmicas desses basidiomicetos são importantes e necessários para o conhecimento da fisiologia desses microrganismos.

4.3 Crescimento micelial *in vitro* do fungo simbiote cultivado por três espécies de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* Mayr, 1865 em diferentes temperaturas

Em relação ao crescimento micelial *in vitro* dos fungos simbiotes cultivados pelas três espécies de formigas cortadeiras, pode-se observar que o fungo cultivado por *A. ambiguus* apresentou melhor crescimento entre as temperaturas de 19,39°C e 21,02°C. Já o fungo simbiote cultivado por *A. crassispinus* cresceu melhor a 18°C. Entretanto, nas temperaturas de 22°C e 25°C o crescimento foi homogêneo durante todo o período de avaliação. Porém, na temperatura de 25°C, houve melhor crescimento micelial a partir do 20º dia de incubação. Já na temperatura de 28°C houve crescimento desuniforme (Figura7).

Para o fungo de *A. heyeri* observou-se crescimento uniforme no intervalo de temperatura entre 22°C e 28°C, porém a melhor temperatura de incubação foi 28°C. Diferentemente, o fungo cultivado por *A. crassispinus* não cresceu a 18°C (Figura 8). Estes resultados evidenciam que o crescimento dos fungos é diferenciado em relação à espécie de formiga que o cultiva. Comportamentos diferenciados do fungo simbiote de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* foram observados por Borba et al. (2006) ao avaliarem diferentes meios de cultura sobre o crescimento desse basidiomiceto. Constataram que houve diferença de peso seco de micélio entre as espécies de formigas, dependendo do substrato utilizado para o cultivo. Entretanto, estes autores não avaliaram a influência da temperatura no crescimento destes fungos.

Vários fatores podem influenciar o crescimento micelial *in vitro* de basidiomicetos, entre eles, o meio de cultura para o crescimento fúngico e a temperatura. Dentre estes, a temperatura é um dos fatores mais relevantes.

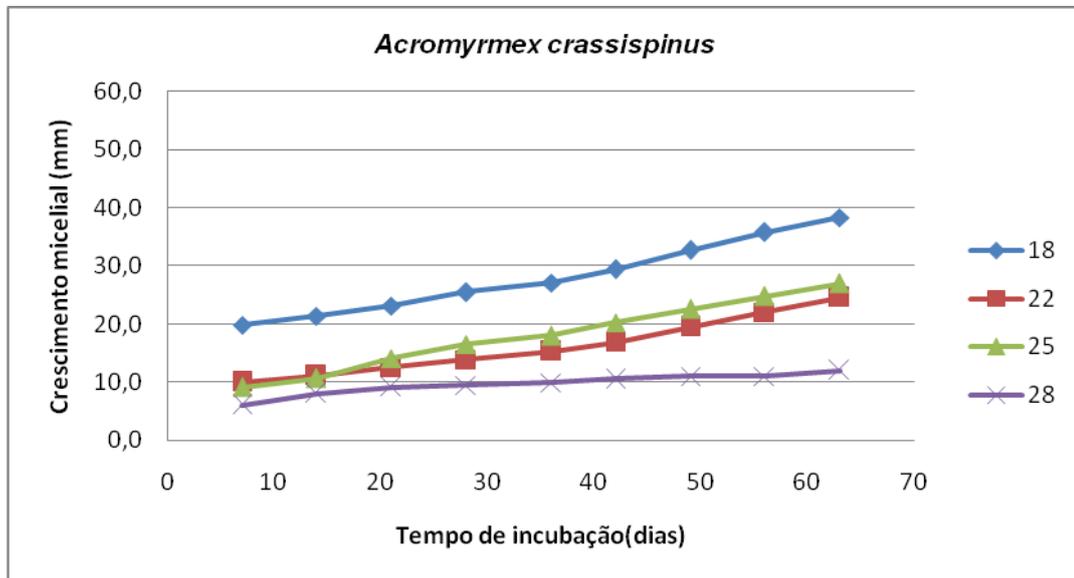


Figura 7. Crescimento micelial (mm) de *Acromyrmex crassispinus* Forel, 1909, durante 63 dias de avaliação, em temperaturas de 18, 22, 25 e 28°C, em laboratório.

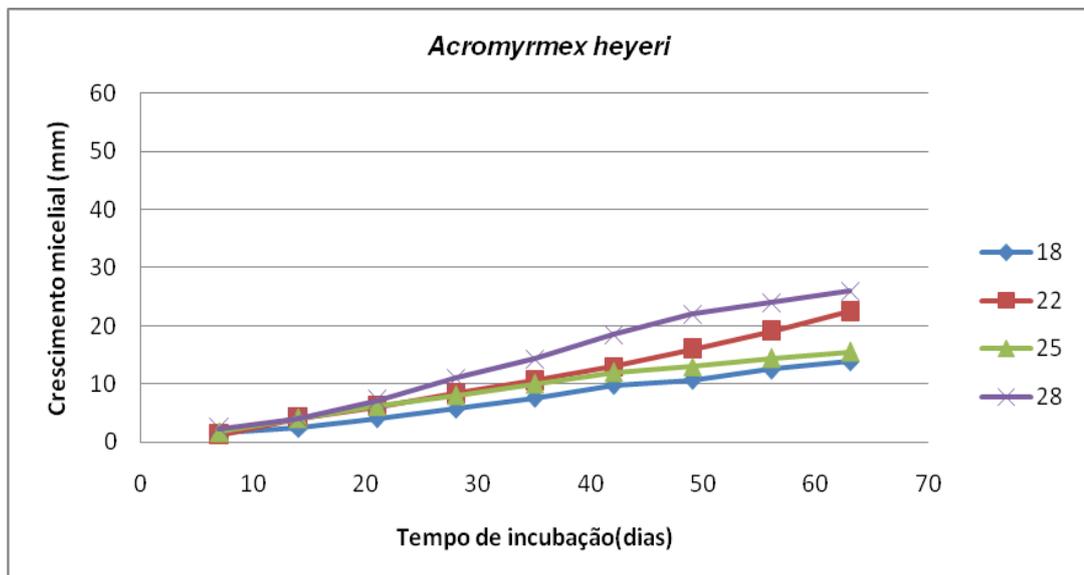


Figura 8. Crescimento micelial (mm) de *Acromyrmex heyeri* Forel, 1899, durante 63 dias de avaliação, em temperaturas de 18, 22, 25 e 28°C, em laboratório.

Estudos *in vitro* avaliando a influência da temperatura no desenvolvimento de basidiomicetos cultivados por formigas cortadeiras são inexistentes. Entretanto, estudos com outros basidiomicetos como os gêneros *Agaricus* e *Pleurotus* abordam com clareza tal característica. Para esses gêneros de basidiomicetos observa-se que os intervalos de temperatura para o crescimento micelial variam de 22 a 35°C (STAMETS; CHILTON, 1983; MAZIERO, 1990; GUSMÁN et al. 1993; CAPELARI, 1996; BONONI et al.,1999; ROSSI et al, 2001; SALES-CAMPOS et al., 2005; ANDRADE et al., 2010), sendo superiores aos intervalos observados no presente estudo para os fungos isolados das espécies *A. ambiguus* (19,39 a 21,02°C) e *A. crassispinus* (18°C), porém não para a espécie *A. heyeri* (28°C).

Os resultados obtidos no presente, estudo ao mesmo tempo em que vêm corroborar com os conhecimentos já existentes a respeito dos fungos cultivados por formigas cortadeiras, demonstram que a relação de simbiose existente entre eles é muito complexa. No entanto, assim como as diferentes espécies de formigas coletam folhas de diferentes espécies de plantas, é provável que o fungo tenha co-evoluído com as mesmas, uma vez que apresenta características peculiares em diferentes meios de cultura e temperaturas. Por isso, estudos adicionais devem ser realizados visando obter a faixa ótima de temperatura que proporcione melhor crescimento, uma vez que este fungo naturalmente apresenta desenvolvimento lento na ausência das formigas.

5. Considerações gerais

Com base nos resultados obtidos e para as condições em que foi realizado o estudo, podemos dizer que:

- O crescimento micelial *in vitro* do fungo simbiote das três espécies de formigas cortadeiras sofre influência da temperatura;
- O valor do limiar térmico inferior de desenvolvimento (T_b) para *Acromyrmex ambiguus* foi de $16,22^{\circ}\text{C}$, com limite ótimo de desenvolvimento entre $19,39^{\circ}\text{C}$ e $21,02^{\circ}\text{C}$;
- A melhor temperatura para o desenvolvimento do fungo cultivado por *Acromyrmex crassispinus* é 18°C e por *Acromyrmex heyeri* é 28°C ;
- O crescimento micelial dos fungos isolados de *A. ambiguus*, *A. crassispinus* e *A. heyeri* foi lento a 30°C e ausente a 15°C .

6. Referências

- AGRIOS, G.N. Plant diseases caused by fungi. In: AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 4 ed. San Diego: Academic Press, p.245-406, 2002.
- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**, 4 Ed., John Wiley e Sons, 1996.
- ALVES, S.B. & NOGUEIRA, N.L. Efeito da temperatura na germinação e viabilidade do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 9. **Resumos**. p.170, 1984.
- ANA, E.C.F. **Pragas online – Formigas cortadeiras**. Disponível em: <http://www.pragas.com.br/pragas/formiga/formiga_cortadeira.php> Acesso em: 17 jan. 2010.
- ANDRADE, M.C.N.; CHAVARI, J.L.; MINHOTI, M.T.A.; ZIED, D.C. Crescimento micelial *in vitro* de cinco linhagens de *Agaricus bisporus* submetidos a diferentes condições de temperatura. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.32, n.1, p. 69-72, 2010.
- ANGELI-PAPA J. ; EYMÉ, J. Les champignons cellulaires par les fourmis Attinae. Évolution des structures cellulaires au cours Du developpement. **Annales des Sciences Natureles**, v.7, n.13, p.103-129, 1985.
- BASS, M. & CHERRETT, J.M. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. **Physiological Entomology**, v.20, n.1, p.1-6, 1995.
- BERBEE, D.J.; TAYLOR, J.W. **Molecular Biology and Evolution**, v.20, n.1, p. 278-284, 1992.
- BOLTON, B. **A new general catalogue of the ants of the world**. Harvard University Press. 1995.
- BONONI, V.L., CAPELARI, M., MAZIERO, R., TRUFEM, S.F.B. **Cultivo de Cogumelos Comestíveis**. 2ª Ed., p. 206, 1999.

- BONONI, V.L.R. **Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas**. São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria de Estado do Meio Ambiente (org), p.184, 1998.
- BONONI, V.L.R.; CAPELARI, M. **Manual prático vida: cogumelos**. v.3, p.32, 1985.
- BORBA, R.S.; LOECK, A.E.; BANDEIRA, J.M.; MORAES, C.L.; CENTENARO, E.D. Crescimento do fungo simbiote de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* em meios de cultura com diferentes extratos. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, p. 726, 2006.
- BORBA, R.S.; LOECK, A.E.; BANDEIRA, J.M.; MORAES, C.L.; CENTENARO, E.D. Crescimento do fungo simbiote de formigas cortadeiras cultivado em diferentes meios de cultura. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 14, 2005, Pelotas. **Anais do...**, 2005. CD-ROM.
- BORBA, R.S.; LOECK, A.E.; BRANCO, J.S.C.; KOPP, M.M.; OLIVEIRA, A.C. Polimorfismo do fungo simbiote de formigas cortadeiras submetido à luz ultravioleta. **Ciência Rural**, v.37, n.5, 2007.
- BORBA, R.S.; LOECK, A.E.; BRANCO, J.S.C.; BONOW, J.; OLIVEIRA, A.C. Pareamento de fungos cultivados por diferentes espécies de formigas cortadeiras no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v.38, n.5, p. 1214-1219, 2008.
- BRANCHER, N. **Avaliação eletroforética e morfológica do fungo cultivado pelas formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex***. 1993. 58f. Dissertação (Pós-graduação em Agronomia – área de concentração em Fitossanidade), Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.
- BRANDÃO, C.R.F. & MAYHÉ-NUNES, A.J. A new fungus-growing ant genus, *Mycetagroicus* gen.n., with the description of three new species and comments on the monophyly of the Attini (Hymenoptera:Formicidae). **Sociobiology**, v.38, p. 639-665, 2001.
- CAMARGO, R.S.; FORTI, L.C.; ROCHA, M.M.; MATOS, C.A.O.; LOPES, J. F.S.; ANDRADE, A.P.P.; VERZA, S. The effect of plant diversity on fungus garden development and foraging behavior of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v.42, p. 1-10, 2003.
- CAPELARI, M. **Atividade biodegradadora e cultivo de três espécies comestíveis de basidiomicetos: *Pleurotus* sp. e *Agrocybe perfecta* (Rick) Sing**. 1996. 154p. Tese (Doutorado em Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.
- CARLOS, R.F.B. **Formigas**. Disponível em: <http://www.scipione.com.br/educa/galeria/10_for/index.htm> Acesso em: 19 dez. 2009.
- CASTRO, N.F.; ARAÚJO, J.N.; CORDEIRO, M.S.C.; SOUZA, W.S.B. Estudo do ótimo de temperatura para crescimento de fungos xilófagos em meio de cultura. **Anais da 58ª Reunião Anual da SBPC**, 2006.

CHAPELA, I.H.; REHNER, S.A.; SCHULTZ, T.R.; MUELLER, U.G. Evolutionary history of symbiosis between fungus growing ants and their fungi. **Science**, v.26, p.1691-1694, 1994.

CURRIE, C.R. Ants, agriculture, and antibiotics. In: Seckbach, J. Symbiosis: mechanisms and model system. **Kluwer Academic Publishers**. 2002.

CURRIE, C.R.; SCOTT, J.A.; SUMMERBELL, R.C. & MALLOCH, D. Corrigenda de Currie e colaboradores 1999a (Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites). **Nature**, p. 423 - 461, 2003.

DELLA LUCIA, T.M.C. **As formigas cortadeiras**. Folha de Viçosa, p. 262, 1993.
FERRON, P. Biological control of insects pest by entomogenous fungi. **Annual Review of Entomology**, v.23, p. 409-442, 1978.

FISHER, P.J.; STRADLING, D.J.; PEGLER, D.N. Leaf cutting ants, their fungus gardens and the formation of basidiomata of *Leucoagaricus gongylophorus*. **Mycologist**, v.8, p. 128-131, 1994.

FREDGARDSON M. **Reino fungi – divisão basidiomycota**. Disponível em: <http://www.ccaa.ufma.br/fredgardson/basidiomycota_alunos.pdf> Acesso em: 05 nov. 2009.

GUSMÁN, G., MATA, G., SALMONES, D., SOTO-VELASCO, C., GUZMÁN-DÁVALOS, **El cultivo de los hongos comestibles**. Instituto Politécnico Nacional, p. 245, 1993.

GUSMÃO, L.G.; LOECK, A.E. Distribuição geográfica de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae) na Zona Sul do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.5, n.1, p. 64- 67, 1999.

GRUTZMACHER, D.D.; LOECK, A.E. Caracterização morfológica das formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* de maior ocorrência no Estado do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.11, n.4, p. 437-444, 2005.

HADDAD, M.L. & PARRA, J.R. 1984. Métodos para estimar os limites térmicos e a faixa ótima de desenvolvimento de diferentes fases do ciclo evolutivo dos insetos. Piracicaba, Fund. Luiz de Queiroz – FEALQ. **Boletim da Série Agricultura e Desenvolvimento**.

HINKLE, G.; WETTERER, J.K.; SCHULTZ, T.R.; SOGIN, M.L. Phylogeny of the attine fungi based on analysis of small subunit ribosomal RNA gene sequences. **Science**, v.22, p.1695-1697, 1994.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E.O. **The ants**. Cambridge, Harvard University Press, 1990.

KHOURI, C.R.; CASTELLANI, M.A.; FORTI, L.C.; NASCIMENTO, M.DE L.; RIBEIRO, A.E.L.; BOMFIM NETO, H.; VIANA, A.E.S.; SILVA, K.S.; LEMOS, O.L. Efeito de extratos de gramíneas forrageiras no crescimento do fungo simbionte de *Acromyrmex* (*Moellerius*) *balzani* (Hymenoptera, Formicidae). In: SIMPÓSIO DE

MIRMECOLOGIA, 16, 2003, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis-SC, p.483-485, 2003.

LOECK, A.E.; ZIMMER, P.D.; BONOW, J. Comparação de fungos cultivados por formigas do gênero *Acromyrmex* em diferentes localidades no Estado do Rio Grande do Sul através de Marcadores Moleculares tipo ISSR. **XVI Simpósio de Mirmecologia**. p. 252-253, 2003.

LOECK, A.E.; PIEROBOM, C.R.; GUSMÃO, L.G.; AFONSO, A.P. Growth of symbiont fungi of some higher attine ants in mineral médium. **Ciência Rural**, v.34, p.79-82, 2004.

LOECK, A.E.; ZANELA, C. Growth of fungus cultivated by cutting ants on Murashige & Skoog nutrient solution in different pH. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 21, 2000, Fóz do Iguacú. **Abstracts of....**, v.1, p.527-527, 2000.

LOECK, A.E.; GRÜTZMACHER, D.D. **Ocorrência de formigas cortadeiras nas principais regiões agropecuárias do Estado do Rio Grande do Sul**. Pelotas: Editora e Gráfica da UFPEL, v. 1, 2001.

LOUREIRO, E.S.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J.E.M.; LEITE, L.G.; LAMAS, C. Efeito da temperature e da luminosidade no desenvolvimento do fungo *Sporotrix insectorum* (Hoog & Evans). **Arquivo Instituto Biológico**, v.69, n.2, p. 79-83, 2002.

MARICONI, F.A.M. **As saúvas**. Ceres, p.176, 1970.

MAZIERO, R. **Substratos alternativos para o cultivo de *Pleurotus* spp.** Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 136f, 1990.

MEHDIABADI, N.J.; HUGHES, B. & MULLER, U.G. Cooperatin, conflict, and coevolution in the attine ant-fungus symbiosis. **Behavioral Ecology**, v.17, n.2, p. 291-296, 2006.

MOHALI, S. Ultrastructural and morphological study of the mutualistic fungus of the ant *Atta cephalotes*. **Revista de Ecologia Latino Americana**, v.5, n.3, p. 1-6, 1998.

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

MUELLER, U.G.; REHNER, S.A.; SCHULTZ, T.R. The evolution of agriculture in ants. **Science**, v.281, p. 2034-2038, 1998.

MUELLER, U.G.; REHNER, S.A.; SCHULTZ, T.R. The origin of the attine ant- fungus mutualism. **The Quaterly Review of Biology**, v.76, n.2, p.169-197, 2001.

MULLER, U.G.; GERARDO, N.M.; AANEN, D.K.; SIX, D.L. & SCHULTZ, T.R. The evolution of agricultura in insects. **Annual Review of Ecology Evolution and Systematics**, v.36, p. 563-595, 2005.

NASCIMENTO, R.R.D.; SCHOETERS, E.; MORGAN, E.D.; BILLEN, J. & STRADLING, D.J. Chemistry of metapleural gland secretions of there attine ants, *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta cephalotes* and *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera:Formicidae). **Journal of Chemical Ecology**, v.22, n.5, p.987-1000, 1996 .

PAGNOCCA, F.C. et al. RAPD analysis of the sexual state and sterile mycelium of the fungus cultivated by the leaf-cutting ant *Acromyrmex hispidus fallax*. **Mycology Research**, v.105, n.2, p.173-176, 2001.

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

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

RIBEIRO, S.B. **Efeito de extratos de plantas sobre o fungo simbiote de *Atta sexdens rubropilosa*** Forel, 1908. 84 p. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, 1994.

ROSSI, I.H.; MONTEIRO, A.C.; MACHADO, J.O. Desenvolvimento micelial de *Lentinula edodes* como efeito da profundidade e suplementação do substrato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.6, p.887-891, 2001.

SALES-CAMPOS, C; JESUS, M. A; EIRA, A. F.; CAMPAGNOLLI, F. Cinética do crescimento micelial do fungo comestível *Pleurotus ostreatus*, como subsídio para posterior cultivo do cogumelo em resíduo madeireiro da região Amazônica. In: **Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia**. Santos, SP, 2005.

SILVA-PINHATI, A.C.O.; BACCI, J.M.;SIQUEIRA, G.C.; SILVA, A.; PAGNOCCA, C.F.; BUENO,C.O.; HEBLING,J.A.M. Isolation and Maintenance of Symbiotic Fungi of Ants in the Tribe Attini (Hymenoptera: Formicidae). **Neotropical Entomology**, v.34, n.1, p. 1-5, 2005.

STAMENTS, P.; CHIITON, J.S. **The Mushroom Cultivator**. Olympia, Washington: Agarikon Press, p. 159-216, 1983.

TORKOMIAN, V.L.V. **Plantas tóxicas e formigas cortadeiras: efeitos de extratos de *Ricinus communis* L. e de *Canavalia ensiformis* sobre o fungo simbiote de *Atta sexdens rubropilosa*** (Forel, 1908). Rio Claro, 94f. **Dissertação** (Mestrado)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual paulista, 1994.

VASCONCELOS H.C.; FOWLER, H.G. Foraging and fungal substrate selection by leaf-cutting ants. In: VANDER MEER, R.K.; JAFFÉ, K.; CEDEÑO, A. (Eds.) **Applied myrmecology: a world perspective**. Boulder, Westview Press, p.410-419, 1990.

VILLESEN, P. **Summary of mating system evolution, worker reproduction and symbiont diversity in Attini ants**. Doctorates and PhDs 2001, Faculty Science,

University of Aarhus, s. 616-618. Ph.D. thesis presented in Institute of Biological Sciences of the University of Aarhus, 2001.

WEBER, N.A. **Gardening ants: The Attines**. Philadelphia: American Philosophical Society, v.9, p. 146, 1972.

WETTERER, J.K.; SCHULTZ, T.R. & MEIER, R. Phylogeny of Fungus-Growing Ants (Tribe Attini) Base don mtDNA Sequence and Morphology. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 9, n.1, p.42 - 47, 1998.

YENDOL, W.G. Factors affecting germination of Entomophthora conidia. **Journal Invertebr. Pathol.** v.10, p.116-121, 1968.