

VERALUCIA SANTOS BARBOSA

**EFEITO DA FRAGMENTAÇÃO FLORESTAL NA TAXA DE PARASITISMO DE
FUNGOS ASSOCIADOS AO JARDIM DA FORMIGA CORTADEIRA *Atta laevigata***

RECIFE, 2004

VERALUCIA SANTOS BARBOSA

EFEITO DA FRAGMENTAÇÃO FLORESTAL NA TAXA DE PARASITISMO DE FUNGOS ASSOCIADOS AO JARDIM DA FORMIGA CORTADEIRA *Atta laevigata*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre

Orientação: Dr.^a Inara R. Leal

Co-Orientação: Dr. Rainer Wirth, Dr.^a Cristina Maria de S. Motta

Área de Concentração: Ecologia Vegetal

Linha de Pesquisa: Ecologia de Populações e Comunidades Vegetais

RECIFE, 2004

VERALUCIA SANTOS BARBOSA

EFEITO DA FRAGMENTAÇÃO FLORESTAL NA TAXA DE PARASITISMO DE FUNGOS ASSOCIADOS AO JARDIM DA FORMIGA CORTADEIRA *Atta laevigata*

BANCA EXAMINADORA:

Dr^a. Inara Roberta Leal (UFPE)

Dr. André Victor Lucci Freitas (UNICAMP)

Dr^a. Leonor Costa Maia (UFPE)

Dr. Marcelo Tabarelli (UFPE)

Dr^a. Ariadna Valentina Lopes (UFPE)

AGRADECIMENTOS

Na realização deste trabalho foram numerosas as pessoas que, de alguma forma contribuíram, com maior ou menor esforço, entretanto, ao final toda ajuda representou muito e conseqüentemente, foi imprescindível. Então é com pleno prazer que agradeço...

Aos meus orientadores, Dr^a. Inara Leal, Dr. Rainer Wirth e Dr^a Cristina Motta pela confiança depositada em minha pessoa e pela ajuda na elaboração desta dissertação. Em especial a Inara Leal pela amizade...

Aos profs. Dr. Jair Puttinsk, Maria José Fernandes e Débora Massa, pela valiosa contribuição na identificação das espécies de fungos.

Aos amigos de campo: Poliana Falcão, Manoel Vieira e Walkiria Rejane pelos agradáveis momentos durante o curso de mestrado. A Walkiria Rejane pela ajuda com as análises estatísticas.

Aos mateiros Rinaldo e Tarcísio, pela indispensável ajuda em campo.

Aos amigos de laboratório: Eliane da Silva, Emília Chagas, Polyanna Nunes, Eduardo Moura, Michelline Lins pelas inúmeras vezes que me ajudaram, e em especial, à amiga Luciana Gonçalves, que gentilmente me ensinou toda parte técnica para o cultivo de fungos.

A Thibério Pinho pela constante presença, palavras de incentivo e ajuda na redação deste trabalho.

À minha família pela paciência e compreensão.

Ao prof^o. Dr. Marcelo Tabarelli, à Usina Serra Grande, a Conservation International e ao CEPAN pelo apoio logístico. A CAPES/ DFG e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Ao Departamento de Micologia – UFPE, pelas instalações cedidas para realização da parte laboratorial deste trabalho.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| APRESENTAÇÃO..... | 1 |
| REVISÃO DE LITERATURA..... | 3 |
| <i>Fragmentação florestal e controle top-down das populações.....</i> | <i>3</i> |
| <i>Formigas cortadeiras como herbívoros dominantes da região Neotropical.....</i> | <i>4</i> |
| <i>Origem do mutualismo: formigas Attini- fungos.....</i> | <i>7</i> |
| <i>Cuidados com os jardins de fungo.....</i> | <i>9</i> |
| <i>Infecção dos jardins de fungo das formigas cortadeiras.....</i> | <i>11</i> |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 13 |
| MANUSCRITO | |
| ANEXO | |

- Kirk, P. M., Cannon, P. F., David, J. C. & Stalpers, J. A. (2001). Dictionary of the fungi. 9^a edição. CAB international Wallingford (UK).
- Kruess, A & Tscharntke, T. (1994). Habitat fragmentation, species loss, and biological control. *Science* **264**, 1581-1584.
- Kruess, A. & Tscharntke, T. (2000). Species richness and parasitism in a fragmented landscape: experiments and field studies with insects on *Vicia sepium*. *Oecologia* **122**, 129-137.
- Leal, I. R. & Oliveira, P. S. (1998). Interactions between fungus-growing ants (Attini), fruits and seeds in cerrado vegetation in Southeast Brazil. *Biotropica* **30**, 170-178.
- Leal, I. R. & Oliveira, P. S. (2000). Foraging ecology of attine ants in a Neotropical savanna: seasonal use of fungal substrate in the cerrado vegetation of Brazil. *Insectes Sociaux* **47**, 376-382.
- Letourneau, D. K. & Dyer, L. A. (1998). Experimental test in lowland tropical forest shows *top-down* effects through four trophic levels. *Ecology* **79**, 1678-1687.
- Lopez, E. & Orduz, S. (2003). *Metarhizium anisopliae* e *Trichoderma viride* for control of nests of the fungus-growing ant, *Atta cephalotes*. *Biological Control* **27**, 194-200.
- Morellato, L. P. C. (2000). Introduction: The Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica* **32**, 786-792.
- Mudd, A. & Bateman, G. L. (1979). Rates of growth of the food fungus of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.) (Hymenoptera: Formicidae) on different substrates gathered by the ants. *Bulletin of Entomological Research* **69**, 141-148.
- Mueller, U. G., Schultz, T. R., Currie, C. R. Adams, R. M. M. & Malloch, D. (2001). The origin of the attine ant-fungus mutualism. *The Quarterly Review of Biology* **76**, 169-197.

APRESENTAÇÃO

A fragmentação florestal é um importante processo que atualmente contribui para a perda de biodiversidade (Didham *et al.*, 1996; Vasconcelos, 1999; Kruess & Tschardtke, 2000). A consequência primária dessa fragmentação resulta em uma variedade de modificações físicas e biológicas nos remanescentes que podem causar o rompimento de processos biológicos e ecológicos (Didham *et al.*, 1996) e, conseqüentemente, modificar a estrutura da floresta (Murcia, 1995; Zuidema, Sayer & Dijkman, 1996).

Embora pesquisas sobre o desmatamento de florestas tropicais tenham sido intensificadas nos últimos anos, há pouca informação sobre seus efeitos na dinâmica de processos ecológicos (Letourneau & Dyer, 1998), principalmente com uma abordagem relativa ao terceiro nível trófico. A fim de verificar alterações na estrutura trófica da comunidade causadas pela fragmentação, foi escolhida para este trabalho uma importante interação parasita-hospedeiro de florestas tropicais: a relação de fungos filamentosos com os jardins de fungo das formigas cortadeiras (*Atta* spp.).

Devido aos seus múltiplos papéis nos ecossistemas, tais como modificações na ciclagem dos nutrientes (Haines, 1975; Herz *et al.*, 1998), criação de clareiras (Garrettson *et al.*, 1998), e sua posição como herbívoro dominante de florestas tropicais (Fowler, Forti, & Romagnano, 1990), as formigas cortadeiras (gêneros *Atta* e *Acromyrmex*) são consideradas espécies chave (Perfecto & Vander Meer, 1993) e, portanto, excelentes organismos para avaliar respostas bióticas resultantes de alterações ambientais.

A posição das formigas cortadeiras como o maior herbívoro generalista dos Neotrópicos (Cherrett, 1968) só é possível devido o seu hábito único de cultivar fungos como fonte de alimento (Hervey & Nair, 1979; Vasconcelos, 1888; Hebling *et al.*, 2000). O mutualismo entre as formigas e os fungos aumenta o grau de polifagia das formigas por

meio da degradação de compostos tóxicos vegetais intermediada pelos fungos (Carreiro *et al.*, 1997). Os fungos, em troca, são mantidos em um meio livre da competição com outros microorganismos devido à constante aplicação de substâncias bactericida, bacteriostática e fungistática que são secretadas pelas glândulas metapleurais e mandibulares das formigas (Diehl-Fleig & Valim-Labres, 1993; Sales, 1998).

Entretanto, novos estudos têm identificado que os jardins de fungo das formigas cortadeiras são hospedeiros de fungos patogênicos potencialmente virulentos, que podem proliferar dentro da colônia levando-a a morte (Currie *et al.*, 1999a; b). A atividade destes fungos patogênicos constitui um fator de regulação populacional do tipo "top-down", onde as populações de um nível trófico são reguladas pelo nível trófico superior (Begon, Harper & Townsend, 1996). Como nos processos de fragmentação os níveis tróficos superiores são perdidos antes que os inferiores (Kruess & Tscharntke, 1994; 2000), acreditamos que o controle destes fungos, sobre a comunidade de formigas cortadeiras, seja menor em fragmentos florestais, resultando em uma taxa mais alta de fundação de colônias e/ou sobrevivência nestes habitats.

Este trabalho, que é apresentado a seguir como forma de artigo para a revista *Mycological Research*, é parte integrante do projeto "Interações tróficas em florestas fragmentadas: o sistema modelo das formigas cortadeiras" (CAPES/ DFG; PROFIX/ CNPq). Esperamos que seus resultados venham contribuir para um melhor entendimento dos processos que levam ao aumento da diversidade de formigas cortadeiras devido a pressões antrópicas.

REVISÃO DE LITERATURA

Fragmentação florestal e controle top-down das populações

Os sistemas de floresta tropical suportam uma grande proporção da biodiversidade terrestre do planeta, com as maiores taxas de endemismo (Capiolo & Delabie, 2003), e de complexas interações bióticas (Didham *et al.*, 1996). A floresta Atlântica tem sido reconhecida como um dos ecossistemas mais ricos em espécies vegetais e animais em todo mundo, quando consideramos a área geográfica que cobre (Brandão, 2003). Frequentemente associada a outros ecossistemas, tais como manguezais, restingas, florestas de pinheiros e campos de altitude, a floresta Atlântica está atualmente caracterizada por um mosaico de vegetação restrito a aproximadamente 98.000 km² (Vasconcelos, 1999), o que equivale a 7,6% de sua extensão original, e que ainda se encontra sob intensa pressão antrópica e risco iminente de extinção (Morellato, 2000).

A fragmentação florestal é um importante processo que atualmente contribui para a perda de biodiversidade e padrões de extinção de espécies (Didham *et al.*, 1996; Vasconcelos, 1999; Kruess & Tschardtke, 2000). Os efeitos da fragmentação na diversidade de espécies estão associados principalmente à redução da área e ao aumento do isolamento entre os habitats (Kruess & Tschardtke, 2000). Além disso há um aumento na razão borda/interior da floresta, o que resulta em uma variedade de modificações físicas e biológicas nos remanescentes conhecidas como efeito de borda (Saunders, Hobbs & Margules, 1991).

A criação de uma borda altera fatores abióticos como aumento na incidência de luz, temperatura e turbulência, e diminuição na umidade relativa (Murcia, 1995; Turner, 1996). As mudanças físicas devido ao efeito de borda induzem a mudanças na estrutura da floresta, as quais podem causar o rompimento de processos biológicos, com modificações

na composição de espécies (abundância e distribuição), nos processos ecológicos, que mantêm a diversidade e o funcionamento do ecossistema, tais como, polinização, dispersão, parasitismo, predação e ciclagem de nutrientes (Didham *et al.*, 1996) e, conseqüentemente, na estrutura da floresta (Murcia, 1995; Zuidema *et al.*, 1996).

A perda de espécies é um dos efeitos mais marcantes da fragmentação de florestas (Turner, 1996). Essa perda não é randômica com relação ao papel trófico uma vez que as espécies de níveis tróficos mais altos, são mais fortemente afetadas e, por essa razão, as primeiras a tornarem-se extintas localmente (Kruess & Tscharntke, 1994; Rao, Terborgh & Nuñez, 2001). De fato Kruess & Tscharntke (2000) relatam que o comprimento da cadeia alimentar aumenta com o tamanho da área e diminui com o isolamento. Logo, o declínio das espécies deve aumentar com o nível trófico devido a efeitos diretos no tamanho da população ou indiretos, relacionados à dependência das espécies de níveis tróficos mais baixos.

Sabendo-se que durante o processo de fragmentação predadores e parasitas são perdidos antes que suas presas e hospedeiros, pois dependem do estabelecimento prévio e com sucesso dessas populações (Kruess & Tscharntke, 1994), é razoável supor que o controle top-down, que ocorre quando uma população é regulada pelo nível trófico superior (Begon *et al.*, 1996), seja menos intenso em áreas fragmentadas que em floresta contínua.

Formigas cortadeiras como herbívoros dominantes da região Neotropical

As formigas são consideradas um dos principais componentes biológicos de ambientes estruturalmente complexos como as florestas tropicais (Caldas & Moutinho, 1993). Juntamente com os cupins, são os macroartrópodes dominantes em biomassa, abundância e papel ecológico dominando, inclusive, numericamente, a comunidade de

artrópodes de dossel, onde representam mais de 60% da artropodofauna (Erwin, 1982), e de solo de florestas tropicais (Watt, Stork & Bolton, 2002).

Com capacidade de adaptação aos mais variados ecossistemas da região Neotropical, as formigas cortadeiras possuem centro de origem e diversidade no Brasil (Weber, 1972; Hölldobler & Wilson, 1990), e estão distribuídas nos mais diversificados ecossistemas, com uma faixa de dispersão entre 33°N e 44°S e uma distribuição vertical que varia entre 0 e 2500m de altitude (Diehl-Fleig, 1997).

As formigas da tribo Attini (subfamília Myrmicinae, Formicidae), com uma história evolutiva de aproximadamente 50 milhões de anos (Wilkinson, 1999; Lopez & Orduz, 2003), são conhecidas pelo hábito único de cultivar fungos como fonte de alimento (Hervey & Nair, 1979; Vasconcelos, 1988; Hebling *et al.*, 2000). A tribo Attini é composta de 12 gêneros e aproximadamente 210 espécies (Schultz & Meier, 1995). Os cinco gêneros filogeneticamente mais derivados formam um clado chamado Attini superiores e os outros sete gêneros, com aproximadamente metade da diversidade de espécies, compõem as Attini inferiores (Hölldobler & Wilson, 1990; Leal & Oliveira, 2000; Currie, 2001a). Dentro do clado das Attini superiores estão os gêneros *Atta* (15 espécies) e *Acromyrmex* (24 espécies) que possuem o mais complexo e eficiente sistema monocultural de fungos conhecido (Lopez & Orduz, 2003). As formigas destes gêneros utilizam especialmente folhas como substrato para o fungo simbiote, por isso, são conhecidas como formigas cortadeiras (Quinlan & Cherret, 1979; Chapela *et al.*, 1994).

O mutualismo entre as formigas cortadeiras (*Atta* e *Acromyrmex*) e seus fungos é uma associação natural, baseada nas diferentes capacidades metabólicas complementares (Diehl-Fleig & Valim-Labres, 1993). As formigas contribuem diretamente com substrato e distribuição de enzimas proteolíticas, via fluidos fecais, nos seus jardins (Mudd &

Bateman, 1979); além de proverem um modo de dispersão para o fungo (Hinkle *et al.*, 1994; Mueller *et al.*, 2001; Bot *et al.*, 2002). O fungo cultivado, por outro lado, é a única fonte de alimento para as larvas de formigas e o principal item alimentar para as *Attini* basais, embora operárias dos taxa mais derivados possam também complementar sua dieta com seiva vegetal (Barrer & Cherrett, 1972; Carreiro *et al.*, 1997; Leal & Oliveira, 1998; 2000).

O fungo simbiote é considerado um estômago externo das formigas que digere celulose (Hölldobler & Wilson, 1990; Siqueira *et al.*, 1998), ou transforma aleloquímicos vegetais (Nichols-Orians, 1991; Della Lucia & Araújo, 1993; Siqueira *et al.*, 1998), o que torna estes compostos disponíveis às formigas. Essa associação aumenta a amplitude alimentar das formigas (Della Lucia & Araújo, 1993) e permite, dessa forma, um grau excepcional de polifagia (Nichols-Orians, 1991; Carreiro *et al.*, 1997), uma vez que, as formigas passam a explorar um recurso que de outra maneira não estaria disponível (Hinkle *et al.*, 1994). Estas características contribuem significativamente para a abundância das formigas cortadeiras em habitats neotropicais (Howard, Cazin & Wiemer, 1988).

Como consequência de sua dominância e polifagia, as formigas cortadeiras são consideradas os maiores herbívoros generalistas dos Neotrópicos, onde *Atta* sozinha consome de 12-17% da produção vegetal em um ecossistema de floresta (Cherret, 1968; Hubbell, Wiemer & Adjare, 1983; Chapela *et al.*, 1994; Farji-Brener, 2001) e seu impacto na vegetação é maior que os provocados por qualquer outro táxon herbívoro (Hölldobler & Wilson, 1990). Mas, apesar de explorarem uma ampla faixa de espécies vegetais (Forti, Neto & Pereira-da-Silva, 1983), as formigas cortadeiras apresentam coleta preferencial, que é regulada pela presença de quimioestimulantes liberados pelo fungo (Mudd & Bateman, 1979; North, Jackson & Howse, 1997), por espécies pioneiras características de estágios

sucessionais recentes (Cherret, 1972; Quinlan & Cherret, 1979; Farji-Brener, 2001), o que pode afetar a regeneração e a composição da floresta (Vasconcelos & Cherret, 1997).

Paralelamente a sua ação sobre populações e comunidades vegetais, as formigas cortadeiras exercem um importante papel ao nível ecossistêmico (Coutinho, 1984; Garretson *et al.*, 1998). Através do enriquecimento do solo, com as lixeiras das colônias e a transferência de nutrientes para as camadas mais superficiais durante a construção e relocação dos ninhos estas formigas interferem na ciclagem de nutrientes (Haines, 1975; Herz *et al.*, 1998). Além disso, seu impacto na criação de clareiras (Garretson *et al.*, 1998) e na dispersão de sementes de muitas espécies de plantas (Leal & Oliveira 1998; 2000), tornam essas formigas espécies chave dos ecossistemas florestais (Della Lucia & Fowler, 1993; Perfecto & Vander Meer, 1993).

Origem do mutualismo: formigas Attini- fungos

A dependência de fungos como recurso alimentar dominante evoluiu apenas duas vezes entre as formigas e envolveu as Attini e as solenopsidine, gênero *Megalomyrmex* (Mueller *et al.*, 2001). Todas as outras associações formiga- fungo são casuais e não têm funções nutricionais (Currie, 2001a).

A origem do comportamento de cultivar fungo das Attini permanece uma fonte de discussão. A distribuição exclusivamente Neotropical da tribo, sugere que o cultivo de fungos tenha surgido uma única vez, provavelmente na América do Sul, há cerca de 40 milhões de anos (Hölldobler & Wilson, 1990), representando uma transição evolutiva de um caçador-coletor para um cultivador de fungo (Mueller *et al.*, 2001).

Mueller *et al.* (2001), avaliaram cuidadosamente algumas hipóteses prevalentes que têm sido propostas por diferentes autores sobre a origem do hábito de cultivar fungos como

fonte de alimento. A primeira delas, sugere que os atíneos derivaram de formigas granívoras que estocavam sementes, passando a se alimentar e cultivar fungos que cresciam sobre elas. (Von Ihering, 1898). Outra hipótese é a proposta de que o ancestral dos atíneos vivia em troncos podres e gradualmente adquiriu o hábito de se alimentar de fungos que cresciam nas fezes de insetos brocadores (Forel, 1902). Uma pequena variante desta hipótese foi proposta por Weber (1956), que acreditava que as formigas passaram a se alimentar dos fungos que cresciam em suas próprias fezes. Por fim, Garling (1979) sugeriu que o cultivo de fungo dos atíneos surgiu através de repetidos encontros do ancestral com fungos ectomicorrízicos. Como ainda há muitas lacunas, estas hipóteses são baseadas apenas em suposições e nenhuma delas é totalmente aceita.

A identidade específica dos fungos cultivados pelas formigas Attini tem sido assunto de algumas controvérsias (Cazin, Wiemer & Howard, 1989), sua taxonomia torna-se dificultada devido à falta de espécimes adequados, em razão da ausência de estruturas de frutificação e esporos, sob condições naturais (Hinkle *et al.*, 1994; Williams, Jones & Hartley, 2001), requeridos para diagnósticos taxonômicos (Williams *et al.*, 2001).

Análises filogenéticas das Attini e de fungos de vida livre, bem como, características bioquímicas e microbiológicas do micélio do fungo simbiote, indicam que a maioria dessas formigas cultiva fungos da família Lepiotaceae (Basidiomycotina, Agaricales; Williams, *et al.*, 2001). Baseado na fase sexuada, que ocorre apenas em condições laboratoriais, o nome dado à forma perfeita do fungo cultivado pelas formigas cortadeiras do gênero *Atta* é *Leucoagaricus gongylophorus* (Fisher *et al.*, 1996; North *et al.*, 1997; Siqueira *et al.*, 1998). No entanto, devido a incertezas taxonômicas e ao comportamento das formigas de impedir a formação de estruturas de frutificação sob condições naturais, todas as linhagens de fungos associadas às Attini são chamadas de

Attamyces bromatificus Kreisel (Hervey, Rogerson & Leong, 1977; Hinkle *et al.*, 1994; Ortiz & Orduz 2000). O gênero *Attamyces* foi descrito com apenas uma única espécie *Attamyces bromatificus*, baseado em características do estado vegetativo (Imperfeito) (Hervey *et al.*, 1977; North *et al.*, 1997), e é classificado como Mycelia sterilia, um grupo polifilético dos Fungos Anamórficos (Kirk *et al.*, 2001).

Attamyces bromatificus possui especializações morfológicas e fisiológicas aparentes para simbioses com formigas (Schultz & Meier, 1995), um grupo de hifas estéreis com células terminais dilatadas, as gongilídias (Hervey *et al.*, 1977), ricas em glicogênio em uma forma prontamente assimilável pelas formigas (Hölldobler & Wilson, 1990; Williams *et al.*, 2001). Juntas, as gongilídias formam as “staphylidiae” (North *et al.*, 1997) que constituem a principal característica do fungo simbiote e determinam sua aceitabilidade pelas formigas (Stevens, 1974).

Cuidados com os jardins de fungo

O sucesso do mutualismo entre as formigas cortadeiras e seus fungos, depende da sua habilidade em proteger o fungo cultivado do crescimento de microorganismos, competitivamente superiores, associados com o material vegetativo que as operárias continuamente adicionam aos jardins. (Weber, 1956; Adams *et al.*, 2000; Currie & Stuart, 2001).

A fim de aumentar a vantagem competitiva do fungo simbiote, as formigas Attini evoluíram comportamentos especializados associados com a manutenção dos jardins, tais como, coleta e processamento de substratos apropriados e remoção ativa de microorganismos potencialmente patogênicos aos seus jardins (Ridley, Howse. & Jackson, 1996; Currie & Stuart, 2001). Outros mecanismos de defesa têm sido propostos e

examinados (Adams *et al.*, 2000), incluindo a produção de antibióticos nas glândulas metapleurais e mandibulares e a disseminação, nos jardins de fungo, de substâncias promotoras do crescimento e de enzimas derivadas do fungo, que passam não modificadas através de seu trato digestivo (Quinlan & Cherret, 1978; Currie & Stuart, 2001; Lopez & Orduz, 2003). As secreções das glândulas metapleurais têm ainda a função de manter o pH da cultura de fungo das formigas em torno de 5 (Bot *et al.*, 2002). Têm-se sugerido, que um pH baixo é favorável para o crescimento do fungo das formigas, mas prejudicial para outros fungos, uma vez que, quando os jardins de fungo das formigas são abandonados o pH aumenta para cerca de 7 ou 8, e favorece a disseminação de microorganismos contaminantes (Bot *et al.*, 2002).

As enzimas concentradas no fluido fecal das formigas cortadeiras além de suprimir o crescimento de muitos microorganismos (Fisher, Stradling & Pegler, 1994; Carreiro *et al.*, 1997), parecem produzir um rápido crescimento de seu fungo simbionte (Hervey & Nair, 1979; North *et al.*, 1997). Este material é regularmente aplicado no jardim de fungo e contém ácido alantóico, amônia e uma mistura de cerca de 21 aminoácidos. Em adição, exibe uma relevante atividade proteásica (Hölldobler & Wilson, 1990), e possui enzimas que degradam a parede celular das plantas, o que facilita a colonização do substrato pelo seu fungo, compensando, diretamente, suas deficiências metabólicas (Mudd & Bateman, 1979).

Como um mecanismo de defesa adicional, o fungo das formigas também produzem antibióticos (Hervey & Nair, 1979). Há evidências de que o fungo cultivado por *Acromyrmex* e *Atta* secreta ácido fenilacético, que suprime o crescimento bacteriano, ácido D-3 hidrodecanóico, que inibe a germinação de esporos de outros fungos, e ácido indolacético, que estimula seu próprio crescimento micelial (Della Lucia & Araújo, 1993).

Recentemente foi adicionada a este sistema uma bactéria do gênero *Streptomyces*, que é encontrada vivendo na cutícula de todas as espécies de Attini (Hervey & Nair, 1979; Currie *et al.*, 1999a;b; D'Ettore *et al.*, 2002). Várias evidências indicam que este novo simbionte bacteriano é um terceiro mutualista na simbiose entre as formigas e o fungo simbionte (Currie *et al.*, 1999a;b). Esta bactéria é transmitida verticalmente, o que consiste na transferência, pela rainha fundadora, de pellets fúngicos da colônia parental para a colônia incipiente (Currie *et al.*, 1999b). Além de promover o crescimento micelial do fungo das formigas, *Streptomyces* produz antibióticos altamente potentes que inibem seletivamente o crescimento de microfungos patogênicos do gênero *Escovopsis* (Currie *et al.*, 1999b, Wirth *et al.*, 2003).

Infecção dos jardins de fungo das formigas cortadeiras

Apesar de todas as linhas de defesa exibidas pelas formigas cortadeiras e pelo seu fungo simbionte, há um parasita muito difundido e hábil a estabelecer infecção e se espalhar nos jardins de fungo das formigas (Currie & Stuart, 2001), o gênero especializado e virulento *Escovopsis* (Ascomycota: Hipocreales Anamórfico; Currie *et al.*, 1999b; Wirth *et al.*, 2003). As espécies deste gênero não são isoladas em nenhum outro habitat, e vêm sendo frequentemente encontradas em colônias de formigas Attini (Farji-Brener & Illes, 2000). Através de um estudo de escavações de ninhos e dissecação de pellets fúngicos de rainhas fundadoras, verificou-se que ele é horizontalmente transmitido, ou seja, sua transmissão se dá de um ninho para outro através da atividade das operárias, e nunca através dos pellets fúngicos carregados pelas rainhas fundadoras (Wirth *et al.*, 2003).

Escovopsis é capaz de rapidamente sobrepor o cultivar do fungo das formigas, reduzindo significativamente o padrão de crescimento da colônia em termos de massa de

jardim e número de operárias (Currie & Stuart, 2001), podendo devastar os jardins rapidamente (Currie *et al* 1999a; Currie, 2001b; Wirth *et al.*, 2003). Mesmo na presença de formigas ele persiste, uma vez que, suas hifas, consistindo de uma adaptação específica, não são afetadas pelos compostos produzidos pelas glândulas metapleurais (Bot *et al.*, 2002).

O gênero *Trichoderma*, comumente encontrado em muitos tipos de solo, especialmente aqueles com alto conteúdo orgânico (Lopez & Orduz, 2003), também tem sido considerado candidato para o controle das formigas cortadeiras devido sua atividade antagonística contra o fungo simbiote (Lopez & Orduz, 2003). A atividade antagonística das espécies de *Trichoderma* tem sido associada com a produção de enzimas líticas, tais como quitinases, proteases e lipases (Lopez & Orduz, 2003), o que causa deficiência alimentar das formigas pela destruição do fungo simbiote (Lopez & Orduz, 2003). Dessa forma, *Trichoderma* spp. são consideradas parasitas necrotróficos agressivos, que rapidamente crescem e se sobrepõem ao fungo cultivado pelas formigas cortadeiras (Currie & Stuart, 2001).

Há evidências de que os fungos parasitas podem penetrar nos ninhos das formigas cortadeiras através do corpo de insetos fungívoros pastadores, uma vez que é conhecida a presença de microorganismos no corpo de insetos de solo (Diehl-Fleig & Valim-Labres, 1993) e as formigas parecem não exibir defesas contra o ataque destes (Quinlan & Cherret, 1978). Outra hipótese é a de que os fungos penetram nos jardins das formigas como epifíticos e endofíticos do material vegetal coletado (Lopez & Orduz, 2003; Fisher *et al.*, 1996). Sugere-se também, que fungos, freqüentemente adquiridos pelas formigas durante suas atividades de forrageamento, têm potencial para serem grandemente dispersos dentro dos jardins (Fisher *et al.*, 1996; Carreiro *et al.*, 1997; Lopez & Orduz, 2003).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, R. M. M., Mueller, U. G., Schultz, T. R. & Norden, B. (2000). Agro-predation: usurpation of attine fungus gardens by *Megalomyrmex* ants. *Naturwissenschaften* **87**, 549-544.
- Begon, M., Harper, J. L. & Townsend, C. R. (1996). Ecology: individuals, populations and communities. Blackwell, Boston.
- Bot, A. N. M., Ortius-Lechner, D., Finster, K., Maile, R. & Boomsma, J. J. (2002). Variable sensitivity of fungi and bacteria to compounds produced by the metapleural glands of leaf-cutting ants. *Insectes sociaux* **49**, 363-370.
- Brandão, C. R. F. (2003). Riqueza e diversidade de formigas mata Atlântica- a floresta pluvial do Leste do Brasil. In *Anais do XVI Simpósio de Mirmecologia*. pp. 27-30. Florianópolis.
- Caldas, A. & Moutinho, P. R. S. (1993). Composição e diversidade da fauna de formigas (Hymenoptera, Formicidae) em áreas sob remoção experimental de árvores na reserva experimental de Linhares, ES, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia* **37**, 299-304.
- Campiollo, S. & Delabie, J. H. C. (2003). O problema da conservação da diversidade na região do corredor central da mata Atlântica enfocando os formicidae. In *Anais do XVI Simpósio de Mirmecologia*. pp. 21-26. Florianópolis.
- Carreiro, S. C., Pagnocca, F. C., Bueno, O. C., Bacci Jr., M., Hebling, M. J. A. & da Silva, O. A. (1997). Yeasts associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908. *Antonie van Leeuwenhoek* **71**, 243- 248.

- Cazin, J. Jr., Wiemer, D. F. & Howard, J. J. (1989). Isolation, growth characteristics, and long storage of fungi cultivated by attine ants. *Applied and Environmental Microbiology* **55**, 1346-1350.
- Chapela, I. H., Rehner, S. A., Schultz, T. R. & Mueller, U. G. (1994). Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. *Science* **266**, 1691-1694.
- Cherrett, J. M. (1968). The foraging behaviour of *Atta cephalotes* L. (Hymenoptera, Formicidae) I. Foraging pattern and plant species attacked in tropical rain forest. *Journal of Animal Ecology* **37**, 387-403.
- Cherrett, J. M. (1972). Some factors involved in the selection of vegetable substrate by *Atta cephalotes* (L.) (Hymenoptera: Formicidae) in tropical rain forest. *Journal of Animal Ecology* **19**, 647-660.
- Coutinho, L. M. (1984). Aspectos ecológicos da saúva no cerrado – A saúva, as queimadas e sua possível relação na ciclagem de nutrientes minerais. *Boletim Zoológico da Universidade de São Paulo* **8**, 1-9.
- Currie, C. R. & Stuart, A. E. (2001). Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. *Proceeding of the Royal Society of London* **268**, 1033-1039.
- Currie, C. R. (2001a). A community of ants, fungi, and bacteria: a multilateral approach to studying symbiosis. *Annual Review of Microbiology* **55**, 357-380.
- Currie, C. R. (2001b). Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. *Oecologia* **128**, 99-106.
- Currie, C. R., Mueller, U. G. & Malloch, D. (1999a). The agricultural pathology of ant fungus gardens. *Proceedings of the National Academy of Science* **96**, 7998-8002.

- Currie, C. R., Scott, J. A., Summerbell, R. C. & Malloch, D. (1999b). Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature* **398**, 701-704.
- D'Ettoire, E., Mora, P., Dibangou, V. & Rouland, C. (2002). The role of the symbiotic fungus in the digestive metabolism of two species of fungus-growing ants. *Journal of Comparative Physiology B* **172**, 169-176.
- Della Lucia, T. M. C. & Araújo, M. S. (1993). Fundação e estabelecimento de formigueiros. Em *As formigas cortadeiras* (ed T. M. C. Della Lucia), pp. 60-83. UFV, Viçosa.
- Della-Lucia, T. M. C. & Fowler, H. G. (1993). As formigas cortadeiras. Em *As formigas cortadeiras* (ed T. M. C. Della Lucia), pp. 1-3. UFV, Viçosa.
- Didham, R. K., Ghazoul, J., Stork, N. E. & Davis, A. J. (1996). Insects in fragmented forests: a functional approach. *Trends in Ecology and Evolution* **11**, 255-260.
- Diehl-Fleig, E. & Valim-Labres, M. E. (1993). Fungi isolated from leaf-cutting ants *Atta sexdens piriventris* and *Acromyrmex heyeri* (Hymenoptera-Formicidae): *Mucor* spp. effects on *Beauveria bassiana* entomopathogen. *Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science* **45**, 142-144.
- Diehl-Fleig, E. (1997). Interações formigas-plantas. In: *Interações ecológicas e biodiversidade*. (ed. M. C. P. Araújo, G. C. Coelho & L. Medeiros), pp. 49-89. Editora UNIJUÍ, Ijuí.
- Erwin, T. L. (1982). Tropical forests: Their richness in Coleoptera and other Arthropod species. *Coleopterists Bulletin* **36**, 74-75.
- Farji-Brener, A. G. & Illes, A. E. (2000). Do leaf-cutting ant nests make “bottom-up” gaps in neotropical rain forest?: a critical review of the evidence. *Ecology Letters* **3**, 219-227.
- Farji-Brener, A. G. (2001). Why are leaf-cutting ants more common in early secondary forests

than in old-growth tropical forests? An evaluation of the palatable forage hypothesis. *Oikos* **92**, 169-177.

Fisher, P. J., Stradling, D. J. & Pegler, D. N. (1994). *Leucoagaricus* basidiomata from a live nest of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. *Mycological Research* **98**, 884-888.

Fisher, P. J., Stradling, D. J., Sutton, B. C. & Petrini, L. E. (1996). Microfungi in the fungus gardens of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*: a preliminary study. *Mycological Research* **100**, 541-546.

Forel, A (1902). Beispiele phylogenetischer Wirkungen und Ruckwirkungen bei den Instinkten und dem Körperbau der Ameisen als Belege für die Evolutionnslehre und die psychophysiologische Identitätslehre. *Journal of Psychology Neurology* **1**, 99-110.

Forti, L. C., Neto, S. S. & Pereira-da-Silva, V. (1983). Dois métodos de avaliação de densidade populacional para operárias forrageiras de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae). *Anais da Sociedade de Entomologia do Brasil* **12**, 195-211.

Fowler, H. G., Forti, L. C. & Romagnano, L. F. T. D. (1990). Methods for the evaluation of leaf-cutting ant harvest. In *Applied Myrmecology - A world perspective* (ed. R. K. Vander Meer, K. Jaffe, A. Cedeno), pp 228-241. Westview Press, Boulder, San Francisco, & Oxford.

Garling, L. (1979). Origin of ant-fungus mutualism: a new hypothesis. *Biotropica* **11**, 284-291.

Garrettson, M., Stetzel, J. F., Halpern, B. S., Hearn, D. J., Lucey, B. T. & Mckone, M. J. (1998). Diversity and abundance of understory plants on active and abandoned nests of leaf-cutting ants (*Atta cephalotes*) in a Costa Rican rain forest. *Journal of Tropical Ecology* **14**, 17-26.

Haines, B. (1975). Impact of leaf-cutting ants on vegetation development at Barro Colorado

- Island. In: Tropical Ecological Systems (ed. F. G. Golley & E. Medina), pp 99-111.
- Hebling, M. J. A., Bueno, O. C., Maroti, P. S., Pagnocca, F. C. & da Silva, O. A. (2000). Effects of leaves of *Ipomoea batatas* (Convolvulaceae) on nest development and on respiratory metabolism of leaf-cutting ants *Atta sexdens* L. (Hym., Formicidae). *Journal of Applied Entomology*. **124**, 249-252.
- Hervey, A. & Nair, M. S. R. (1979). Antibiotic metabolite of a fungus cultivated by gardening ants. *Mycologia* **71**, 1064-1066.
- Hervey, A., Rogerson, C. T. & Leong, I. (1977). Studies on fungi cultivated by ants. *Brittonia* **29**, 226-236.
- Herz, H., Wirth, R., Hölldobler, B. & Beyschlag, W. (1998). High rate of leaf-cutter ant colony movements in a tropical forest. In *Kurzbeiträge zur Tropenökologie* (ed. H. Dalitz, M. Haverkamp, J. Homeier & S. W. Breckle). Bielefelder Ökologische Beiträge, GTÖ.
- Hinkle, G., Wetterer, J. K., Schultz, T. R. & Sogin, M. L. (1994). Phylogeny of the Attine ant fungi based on analysis of small subunit ribosomal RNA gene sequences. *Science* **266**, 1695-1697.
- Hölldobler, B. & Wilson, E. O. (1990). *The Ants*. Cambridge (MA) Harvard University Press.
- Howard, J. J., Cazin, J. Jr., & Wiemer, D. F. (1988). Toxicity of terpenoid deterrents to the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* and its mutualistic fungus. *Journal of Chemical Ecology* **14**, 59-69.
- Hubbell, S. P., Wiemer, D. F. & Adejare, A. (1983). An antifungal terpenoid defends a neotropical tree (*Hymenaea*) against attack by fungus-growing ants (*Atta*). *Oecologia* **60**, 321-327.

- Murcia, C. 1995. Edge effects in fragmented forests: implications for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* **10**, 58-62.
- Nichols-Orians, C. (1991). Differential effects of condensed and hydrolyzable tannin on polyphenol oxidase activity of attine symbiotic fungus. *Journal of Chemical Ecology* **17**, 1811-1819.
- North, R. D., Jackson, C. W. & Howse, P. E. (1997). Evolutionary aspects of ant-fungus interactions in leaf-cutting ants. *Trends in Ecology and Evolution* **12**, 386-389.
- Ortiz, A. & Orduz, S. (2000). *In vitro* evaluation of *Trichoderma* and *Gliocladium* antagonism against the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. *Mycopathologia* **150**, 53-60.
- Perfecto, I. & VanderMeer, J. (1993). Distribution and turnover rate of a population of *Atta cephalotes* in a tropical rain forest in Costa Rica. *Biotropica* **25**, 316-321.
- Quinlan, R. J. & Cherrett, J. M. (1978). Aspects of the symbiosis of the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) and its food fungus. *Ecological Entomology* **3**, 221-230.
- Quinlan, R. J. & Cherrett, J. M. (1979). The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.). *Ecological Entomology* **4**, 151-160.
- Rao, M., Terborgh, J. & Nuñez, P. (2001). Increased herbivory in forest isolates: implications for plant community structure and composition. *Conservation Biology* **15**, 624-633.
- Ridley, P., Howse, P. & Jackson, C. (1996). Control of the behaviour of leaf-cutting ants by their “symbiotic” fungus. *Experientia* **52**, 631-635.
- Sales, F. J. M. de, (1998). Saúvas: Comportamento, domesticação e aleloquímicos. EdiAtta, Fortaleza.

- Saunders, D. A., Hobbs, R. J. & Margules, C. R. (1991). Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. *Conservation Biology* **5**, 18-32.
- Schultz, T. R. & Meier, R. (1995). A phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. *Systematic Entomology* **20**, 337-370.
- Siqueira, C. G. de, Bacci Jr., M., Pagnocca, F. C., Bueno, O. C. & Hebling, M. J. A (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.
- Stevens, R. B. (1974). Biological associations. In *Mycology guidebook*. University of Washington. Press London.
- Turner, I. M. (1996). Species loss in fragments of tropical rain forest: a review of the evidence. *Journal of Applied Ecology* **33**, 200-209.
- Vasconcelos, H. L. (1988). Distribution of *Atta* (Hymenoptera - Formicidae) in "terra-firme" rain forest of central Amazonia: density, species composition, and preliminary results on effects of forest fragmentation. *Acta Amazonica* **18**, 309-315.
- Vasconcelos, H. L. (1999). Effects of forest disturbance on the structure of ground-foraging ant communities in Central Amazonia. *Biodiversity and Conservation* **8**, 409-420.
- Vasconcelos, H. L. & Cherrett, J. M. (1997). Leaf-cutting ants and early forest regeneration in central Amazonia: effects of herbivory on tree seedling establishment. *Journal of Tropical Ecology* **13**, 357-370.

Von Inhering, H. (1898). Die Anlage neuer Colonian und Pilzguarten bei *Atta sexdens*. *Zool. Anz.* **21**, 238-245.

Watt, A. D., Stork, N. E. & Bolton, B. (2002). The diversity and abundance of ants in relation to forest disturbance and plantation establishment in Southern Cameroon. *Journal of Applied Ecology* **39**, 18-30.

Weber, N. A. (1956). Treatment of substrate by fungus-growing ants. *American society of zoologists* **125**, 604-605.

Weber, N. A. (1972). Gardening ants, the Attines. The American Philosophical Society, Philadelphia.

Wilkinson, D. M. (1999). Ants, agriculture and antibiotics. *Trends in Ecology and Evolution* **14**, 459-460.

Williams, I. S., Jones, T. H. & Hartley, S. E. (2001). The role of resources and natural enemies in determining the distribution of an insect herbivore population. *Ecological Entomology* **26**, 204-211.

Wirth, R., Herz, H., Ryel, R.J., Beyschlag, W. & Hölldobler, B. (2003). Herbivory of leaf-cutting ants a case study on *Atta colombica* in the Tropical Rainforest of Panama. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.

Zuidema, P. A., Sayer, J. A. & Dijkman, W. (1996). Forest fragmentation and biodiversity: the case for intermediate-sized conservation areas. *Environmental Conservation* **23**, 290-297.

MANUSCRITO A SER ENVIADO À REVISTA MYCOLOGICAL RESEARCH

Efeito da fragmentação florestal na taxa de parasitismo de fungos associados ao jardim da formiga cortadeira *Atta laevigata*

Efeito da fragmentação florestal na taxa de parasitismo...

Veralucia Santos Barbosa¹, Rainer Wirth², Cristina Maria de Souza Motta³ & Inara R. Leal¹

¹Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco

Av. Prof. Moraes Rêgo s/nº, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brasil.

E-mails: veraluciasb@yahoo.com.br; irleal@ufpe.br;

²Abteilung Allgemeine Botanik, Universität Kaiserslautern, Postfach 3049, 67653

Kaiserslautern, Alemanha. E-mail: wirth@rhrk.uni-kl.de ;

³Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco

Av. Prof. Moraes Rêgo s/nº, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brasil.

E-mail: smotta@ufpe.br.

ABSTRACT

In this study we isolated and identified the filamentous fungi from gardens of leaf-cutting ants at a fragment of Atlantic Forest in Pernambuco Endemism Center, Brasil and we compared the parasitism taxa of colonies located in control area and fragment. Based on the premiss that the fragmentation process the higher trophic levels are lost before than lower, we predict that colonies located in fragments presented lesser taxa of parasitism than colonies at control areas. However, our results don't support this hypothesis, there were no significant difference on the infection frequency between the habitats. Our results showed that the two habitats have similar conservation status. If this is true, we can conclude that the largest Atlantic Forest area of Pernambuco Endemism Center is very altered for the establishment of specialized fungus parasites.

RESUMO

Nesse estudo nós isolamos e identificamos os fungos filamentosos encontrados nos jardins das formigas cortadeiras em um trecho de floresta Atlântica do Centro de Endemismo Pernambuco, Brasil e comparamos a taxa de parasitismo dos jardins de colônias localizadas em área controle e em fragmento. Baseados na premissa de que com o processo de fragmentação níveis tróficos mais altos são perdidos antes dos mais basais, nós predizemos que jardins de colônias localizados em fragmentos apresentariam menores taxas de parasitismo que colônias de área controle. Entretanto, nossos resultados não suportaram essa hipótese, não havendo diferença significativa na frequência de infecção entre os dois habitats. Nossos resultados indicam que os dois habitats apresentam *status* de conservação similares. Se isso for verdade, pode-se concluir que a maior área de floresta Atlântica do Centro de Endemismo Pernambuco já é bastante alterada para o estabelecimento de fungos parasitas especializados.

INTRODUÇÃO

A taxa de desmatamento de florestas tropicais excede 15 milhões de hectares por ano, resultando em uma paisagem fragmentada (Whitmore, 1997). As conseqüências primárias dessa fragmentação são a redução e o isolamento de habitats, e o aumento da razão borda/interior de floresta, o que resulta em uma variedade de modificações físicas e biológicas nos remanescentes conhecidas como efeito de borda (Saunders, Hobbs & Margules, 1991).

A criação de uma borda altera fatores abióticos como aumento na incidência de luz, temperatura e turbulência, e diminuição na umidade relativa (Murcia, 1995; Turner, 1996). Como conseqüência, há um aumento na mortalidade de espécies tolerantes à sombra e no recrutamento de espécies pioneiras (Laurance *et al.*, 1998a), de lianas e trepadeiras (Laurance *et al.*, 1998b). Essas modificações na composição de espécies alteram os processos ecológicos e a estrutura da floresta (Murcia, 1995; Zuidema, Sayer & Dijkman, 1996).

Consideradas o maior herbívoro generalista dos Neotrópicos, as formigas cortadeiras (gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, Formicidae, Myrmicinae, Attini) possuem centro de origem e diversidade no Brasil (Weber, 1972; Hölldobler & Wilson, 1990) Estão distribuídas nos mais diversificados ecossistemas, com uma faixa de dispersão entre 33°N e 44°S e uma distribuição vertical que varia entre 0 e 2.500m de altitude (Diehl-Fleig, 1997).

Apesar de explorarem uma ampla faixa de espécies vegetais (Forti, Neto & Pereira-da-Silva, 1983), as formigas cortadeiras apresentam coleta preferencial, sendo mais comuns em florestas de estágios sucessionais recentes, dominadas por espécies pioneiras, as quais correspondem à maior parte da sua dieta, provavelmente pelo seu baixo nível de defesas químicas e alto conteúdo nutricional (Cherret, 1972; Quinlan & Cherret, 1979; Farji-Brener, 2001). Conseqüentemente, a disponibilidade de plantas pioneiras parece ser

um dos principais fatores que determinam a densidade de colônias dessas formigas em florestas tropicais (Farji-Brener, 2001).

A vegetação coletada pelas saúvas não é diretamente utilizada por elas. Toda tribo Attini mantém um mutualismo obrigatório com fungos (Basidiomycotina, Agaricales) que são cultivados dentro de seus ninhos com substrato vegetal (Quinlan & Cherret, 1979; Chapela *et al.*, 1994). O fungo é o alimento exclusivo das larvas e o principal dos adultos, uma vez que as operárias podem utilizar seiva exsudada das plantas durante o corte (Barrer & Cherrett, 1972).

O mutualismo entre as formigas e seus fungos é uma associação natural, baseada nas diferentes capacidades metabólicas complementares (Diehl-Fleig & Valim-Labres, 1993). Essa associação permite às formigas explorar um recurso que de outra maneira estaria indisponível (Hinkle *et al.*, 1994), uma vez que os fungos são capazes de metabolizar os compostos secundários das plantas (Nichols-Orians, 1991; Siqueira *et al.*, 1998). Por outro lado, os fungos beneficiam-se com substrato e defesa antimicrobiana fornecidos pelas formigas (North, Jackson & Howse, 1997), sendo, então, mantidos em um meio livre da competição com outros microorganismos pela constante aplicação de substâncias bactericidas, bacteriostáticas e fungistáticas que são secretadas pelas glândulas metapleurais e mandibulares das formigas (Diehl-Fleig & Valim-Labres, 1993; Sales, 1998).

Entretanto, novos estudos têm identificado que os jardins de fungo das formigas cortadeiras são hospedeiros de patógenos potencialmente virulentos, fungos filamentosos dos gêneros *Escovopsis* e *Trichoderma* (Ascomycota: Hipocreales Anamórfico; Currie *et al.*, 1999b; Wirth *et al.*, 2003), que podem persistir dentro dos jardins de fungo das formigas por um grande período de tempo e sob algumas condições podem proliferar

dentro da colônia infectada levando-a a morte (Currie *et al.*, 1999a;b; Currie, 2001a). Logo, está claro que *Escovopsis* e *Trichoderma* têm um impacto na sobrevivência das formigas cortadeiras (Currie, 2001b), o que constitui um fator de regulação populacional do tipo "top-down", onde as populações de um nível trófico são reguladas pelo nível trófico superior (Begon, Harper & Townsend, 1996).

Durante processos de fragmentação, os níveis tróficos superiores são perdidos antes que os inferiores, como um resultado do isolamento e das restrições de colonização, uma vez que suas populações dependem do estabelecimento prévio e bem sucedido das populações de presas (Kruess & Tschardtke, 1994; 2000). Assim, acreditamos que as formigas cortadeiras sofrem um controle "top-down" mais fraco em fragmentos que em floresta contínua. Desta forma, é razoável supor que as taxas de parasitismo dos jardins de fungo das formigas são menores em fragmentos, resultando em uma taxa mais alta de fundação de colônias e/ou sobrevivência nestes habitats.

Sendo assim, os objetivos deste trabalho foram: (1) isolar e identificar os fungos encontrados nos jardins da formiga cortadeira *Atta laevigata* Smith, em fragmentos de diferentes tamanhos; (2) verificar e comparar a frequência de infecção dos jardins das formigas pelos fungos parasitas *Escovopsis* e *Trichoderma* nos fragmentos estudados; e (3) verificar se outras espécies de fungos encontradas nos jardins das formigas apresentam papel inibidor sobre o crescimento do fungo simbiote das formigas cortadeiras.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O trabalho foi realizado na região do Engenho Coimbra, município de Ibataguara, zona da mata Norte do Estado de Alagoas (8° 30'S, 35° 50'W; Figura 1). O clima do município é

tropical quente e úmido com temperatura variando entre 16° e 40°C e média anual de 26°C (*sensu* IBGE 1985). A precipitação média anual é de aproximadamente 1700mm, com os meses mais chuvosos entre maio e julho e os mais secos entre novembro e janeiro (IBGE, 1985). Os solos mais comuns da região são cambissolos eutróficos e planossolos solódicos (IBGE, 1985). A vegetação pode ser classificada como Floresta Ombrófila Aberta Baixo-Montana (250-600m de altitude), caracterizada por árvores emergentes com até 35m de altura (Leguminosae, Lecythidaceae, Sapotaceae, Bombacaceae) e dossel aberto (25-30m) com presença de muitas palmeiras (Veloso *et al.*, 1991).

Métodos

Seleção dos Fragmentos e das colônias de A. laevigata

Foram selecionados como área de estudo o maior fragmento de floresta Atlântica ao Norte do Rio São Francisco, com área estimada em cerca de 3.000 hectares (IBGE, 1985), considerado neste estudo como área controle, e um pequeno fragmento com aproximadamente 10% de sua área, ambos localizados na região do Engenho Coimbra (Figura 1). Os dados foram coletados para dez colônias adultas de *A. laevigata* em cada fragmento, totalizando 20 colônias.

Coleta e amostragem dos jardins de fungo de Atta laevigata

A fim de amostrar os fungos presentes nos jardins das formigas, os ninhos das colônias selecionadas foram escavados entre novembro de 2002 e fevereiro de 2003. Os ninhos foram abertos até a primeira câmara de fungo, tão cuidadosamente quanto possível para garantir a mínima perturbação às formigas. Pedacos do jardim de fungo das formigas

cortadeiras ($\pm 20\text{mm}^3$) foram coletados, com auxílio de pinça e acondicionados em recipientes esterilizados. O tamanho de cada ninho, e a profundidade da primeira câmara de fungos encontrada foram medidos, com auxílio de fita métrica, para cada colônia.

Em ambiente asséptico, amostras menores dos jardins (cerca de $3\text{mm}^3/\text{jardim}$; Currie, 2001b) foram transferidas para placas de Petri, previamente esterilizadas, (três amostras por ninho), com auxílio de pinça entomológica, logo no primeiro dia de coleta para melhores resultados no cultivo (Stevens, 1974). Posteriormente, o meio de cultura BDA (batata- dextrose- ágar), adicionado de cloranfenicol 50mg/l, fundido e esfriado a 45°C foi vertido nas placas sobre os pedaços dos jardins. O BDA foi selecionado, por ser o meio mais adequado para o cultivo uniforme dos fungos presentes nas colônias de formigas cortadeiras (Hervey, Rogerson & Leong, 1977; Nichols-Orians, 1991).

Este material foi guardado cuidadosamente à temperatura ambiente (Seifert, Samson & Chapela, 1995) por cerca de três dias em campo. Após esse período, o material foi levado para o Laboratório da Coleção de Culturas- Micoteca URM, do Departamento de Micologia, da Universidade Federal de Pernambuco para purificação e identificação das espécies de fungos.

Isolamento e a identificação de espécies dos fungos encontradas nos jardins

No laboratório, cada colônia de fungo diferente, que cresceu a partir do material isolado dos jardins das formigas, foi purificada pelo método da estria em placa de Petri e, posteriormente, fragmentos destas colônias foram transferidos separadamente para o meio BDA + Cloranfenicol (50mg/l), contido em tubos de ensaio, até obter crescimento suficiente para serem identificados. Para identificação, foram observadas características macroscópicas (coloração, aspecto e diâmetro das colônias) e microscópicas

(microestruturas) utilizando-se os meios de cultura ágar Czapek, BDA e ágar extrato de malte (Lacaz, Porto, & Martins, 1991), seguindo Rifai, 1969; Booth, 1971; Ellis, 1971; Samson, 1974; Schipper, 1978; Baijal & Mehrotra, 1980; Pitt, 1988; Bissett, 1991; Domsch, Gams & Anderson, 1993; Hesseltine & Fennel, 1995. A identificação do fungo simbiote, baseou-se nos critérios propostos por Cazin, Wiemer & Howard (1989), tais como, falta de produção de esporos e presença de gongilídias quando examinado ao microscópio. Os espécimes identificados foram depositados na Coleção de Culturas-Micoteca URM/ UFPE.

Taxa de parasitismo dos jardins de fungo

Para testar a hipótese de que as taxas de parasitismo dos jardins das formigas cortadeiras pelos fungos *Escovopsis* e *Trichoderma* são maiores na área controle que no fragmento, para cada colônia de formiga selecionada, foram feitas três culturas em BDA, adicionado de cloranfenicol 50mg/l, contidos em placas de Petri, totalizando 30 amostras para cada ambiente. Estas culturas foram incubadas à temperatura ambiente por cerca de duas semanas para verificação da ocorrência dos parasitas.

Experimento de competição

A fim de determinar a habilidade inibitória dos fungos encontrados nos jardins das formigas cortadeiras sobre fungo simbiote de *A. laevigata*, foram conduzidos experimentos de competição. Para realização desses experimentos, foram escolhidas cinco espécies de *Trichoderma*, por serem comumente citadas como antagonistas do fungo simbiote das formigas (Lopez & Orduz, 2003). Além dos *Trichoderma*, foram sorteadas aleatoriamente outras dez espécies encontradas nos jardins das formigas.

O experimento de competição foi conduzido totalmente no escuro, a temperatura ambiente e em meio de cultura BDA (adicionado de cloranfenicol 50mg/l). Discos da cultura do fungo simbionte, com aproximadamente sete dias de crescimento e 0,2 cm² de diâmetro foram inoculados em uma das bordas da placa de Petri, e após o micélio deste atingir 1,5 cm de comprimento, colocou-se um outro inóculo, agora do fungo a ser testado (0,2 cm²), na outra extremidade da placa (Ortiz & Orduz, 2000). As placas foram incubadas até o micélio de ambos os fungos se encontrarem, o tempo variou de acordo com a espécie de fungo testada. Paralelamente ao crescimento combinado, os fungos foram colocados para crescer isoladamente, como controle. Foram feitas cinco réplicas para cada trio: fungo simbionte, fungo competidor e fungo simbionte + fungo competidor.

A sensibilidade do fungo simbionte em relação ao fungo competidor foi medida em termos de inibição do crescimento (Madeira *et al.*, 1993). Para tal, foi determinado o crescimento do fungo simbionte isolado e na presença do fungo competidor. A diferença no crescimento isolado e com competidor foi a medida de inibição.

Análise Estatística

Além da riqueza e abundância, foi calculado o índice de diversidade de Shannon-Wiener para cada área, utilizando o Software de Krebs (1989). A similaridade de fungos entre os ambientes foi calculada através do índice de Morisita (cf. Software de Krebs, 1989).

Para testar se a riqueza e a abundância de fungos encontrados nos jardins das formigas são relacionadas com o tamanho dos ninhos e com a profundidade da primeira câmara de fungos, foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman (Zar, 1999). Para comparar a taxa de parasitismo dos jardins de fungo das formigas por *Escovopsis* e

Trichoderma, em área controle e fragmento foi utilizado o teste do Qui-quadrado (Zar, 1999). E para verificar se as espécies encontradas nos jardins são capazes de inibir o crescimento do fungo simbionte foi utilizado o teste t ou Mann-Whitney (Zar, 1999). A normalidade foi testada com Kolmogorov-Smirnov (Lilliefors; Zar, 1999).

RESULTADOS

Espécies de fungos associados aos jardins das formigas cortadeiras

Dos 57 isolados de fungos coletados nos jardins das formigas cortadeiras, foram identificadas 55 espécies pertencentes a 18 gêneros (Tabela 1). De acordo com a classificação dos fungos, segundo Kirk, *et al.*(2001), a maioria destes gêneros (11) está incluída nos Fungos Anamórficos: *Acremonium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Nigrospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Trichoderma* e o grupo *Mycelia sterilia*; quatro estão nos Zygomycota: *Circinella*, *Cunninghamella*, *Gongronella* e *Mucor*; e apenas dois nos Ascomycota: *Pseudallescheria* e *Talaromyces*. A abundância destas espécies foi discretamente maior em fragmento (79 isolados) que em área controle (72 isolados; Tabela 1). O fungo das formigas foi identificado, com base em caracteres vegetativos, como *Attamyces bromatificus* Kreisel.

Com base no índice de Shannon-Wiener, os dois habitats apresentaram alta diversidade de fungos associados aos jardins das formigas cortadeiras (área controle: $H' = 4,677$ bits; fragmento: $H' = 4,675$ bits). Entretanto, existem diferenças nas espécies identificadas associadas aos diferentes habitats. Vinte e duas espécies foram exclusivas da área controle e 23 de fragmento (Tabela 1). Cinco gêneros ocorreram apenas na área controle: *Cunninghamella*, *Mucor*, *Pestalotiopsis*, *Pseudallescheria* e *Talaromyces*; e três em fragmento: *Gliocladium*, *Gongronella* e *Nigrospora*. Apenas 12 espécies foram

encontradas em ambos os ambientes (Tabela 1). Esses resultados refletem no índice de Similaridade Morisita Horn's, que indica um valor de cerca de 50% de similaridade entre os habitats.

Riqueza e abundância de fungos vs. tamanho dos ninhos e profundidade da primeira câmara de fungo

O tamanho dos ninhos escavados variou de 19m² a 304m². A profundidade da primeira câmara onde o fungo das formigas foi coletado variou de 20cm a 120cm. A abundância e a riqueza de fungos associados aos jardins foram inversamente proporcionais ao tamanho dos ninhos e à profundidade das câmaras dos jardins (Figura 2). No entanto, só houve uma correlação significativa quando a riqueza e a abundância foram relacionadas com a profundidade das câmaras de fungo (rs= -0,4311, p=0,057; rs= -0,4706, p=0,036, respectivamente).

Taxa de parasitismo dos jardins das formigas cortadeiras

Dos dois gêneros de fungos parasitas, *Escovopsis* e *Trichoderma*, já registrados, nos ninhos das formigas cortadeiras apenas *Trichoderma* foi observado neste estudo. Verificou-se um percentual de 60% de parasitismo dos jardins de fungo das formigas, por seis espécies de *Trichoderma* (*T. aureoviride*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. longibrachiatum*, *T. pseudokoningii*, *Trichoderma* sp.1) para as amostras de fragmento, contra 66,6% para área controle (Figura, 3), não havendo diferença significativa entre estes valores ($X^2 = 0,287$, gl = 1, p = 0,5921).

Experimentos de competição

Dos 57 isolados de fungos encontrados nos jardins das formigas cortadeiras, a habilidade inibitória contra os fungos de *A. laevigata* foi testada para 15 espécies (Figura 4). Destas espécies, dez apresentaram habilidade inibitória significativa: *Circinella muscae* (Figura 4A; $U = 2$, $p = 0,028$, $n = 5$), *Nigrospora sphaerica* (Figura 4B; $t = -11,832$, $p = 0,001$, $n = 5$), *Paecilomyces roseo-purpureum* (Figura 4C; $t = 10,620$, $p = 0,001$, $n = 5$), *Pestalotiopsis maculans* (Figura 4D; $U = 1$, $p = 0,016$, $n = 5$), *Talaromyces wortmannii* (Figura 4E; $U = 0$, $p = 0,009$, $n = 5$), e todas as espécies do gênero *Trichoderma* testadas: *T. aureoviride* (Figura 4F; $t = -6,402$, $p = 0,001$, $n = 5$), *T. harzianum* (Figura 4G; $t = -2,145$, $p = 0,05$, $n = 5$), *T. koningii* (Figura 4H; $t = 3,342$, $p = 0,01$, $n = 5$), *T. longibrachiatum* (Figura 4I; $t = 3,540$, $p = 0,007$, $n = 5$), *T. pseudokoningii* (Figura 4J; $t = -20,615$, $p = 0,01$, $n = 5$). Todas as espécies de *Trichoderma* cresceram sobre o micélio do fungo simbiote após uma semana do encontro. Não houve redução significativa no padrão de crescimento do fungo simbiote quando em presença de: *Colletotrichum gloeosporioides* (Figura 4K; $t = 1,026$, $p = 0,78$, $n = 5$), *Fusarium decemcellulare* (Figura 4L; $t = -0,285$, $p = 0,78$, $n = 5$), *Fusarium solani* (Figura 4M; $t = 1,258$, $p = 1$, $n = 5$), *Gliocladium virens* (Figura 4N; $t = 1,902$, $p = 0,093$, $n = 5$), *Gongronella butleri* (Figura 4O; $t = 0,598$, $p = 0,598$, $n = 5$).

DISCUSSÃO

Nesse estudo nós investigamos a taxa de parasitismo dos jardins de fungo das formigas cortadeiras, baseados na premissa de que com o processo de fragmentação níveis tróficos mais altos são perdidos antes que os mais basais (Kruess & Tscharrntke, 1994; Rao, Terborgh & Nuñez., 2001). Nós predizemos que jardins de colônias localizados em fragmentos apresentariam menores taxas de parasitismo que colônias de área controle.

Entretanto, nossos resultados não suportam essa hipótese, não havendo diferença significativa entre a taxa de parasitismo dos jardins das formigas cortadeiras localizadas na área controle e no fragmento, o que talvez indique *status* de conservação similares entre estes dois ambientes.

O parasita generalista *Trichoderma* foi encontrado amplamente distribuído em colônias de formigas cortadeiras localizadas na área controle e no fragmento. Por outro lado, e embora Bot *et al.* (2002) tenham isolado *Escovopsis* diretamente do jardim da própria cultura das formigas, e Currie *et al.*, 1999b relate que *Escovopsis* é o fungo mais freqüentemente encontrado em colônias de formigas cortadeiras, não foi possível isolar *Escovopsis* em nenhuma das colônias amostradas. O método mais indicado para o isolamento deste parasita especializado é através da análise do material encontrado nas câmaras de lixo das formigas (Currie *et al.*, 1999a). Entretanto, Nagamoto *et al.*, (2003) também encontraram dificuldades para isolar o *Escovopsis*, tanto a partir do jardim de fungos quanto das câmaras de lixo.

A ausência de *Escovopsis* pode ser justificada por Currie (2001b), que relata uma maior facilidade de isolamento de *Escovopsis* em colônias de *Acromyrmex* que de *Atta*. Outra provável explicação é que, ao contrário de *Trichoderma*, que tem sua presença nos ninhos relacionada ao declínio da saúde do jardim (Williams *et al.*, 2001), uma vez que as formigas são hábeis em suprimir patógenos generalistas (Currie & Stuart, 2001), as hifas do *Escovopsis* não são afetadas pelos compostos das glândulas metapleurais. As formigas mantêm, então, um mecanismo mais efetivo de defesa contra este fungo parasita na forma do Actinomycece *Streptomyces* (Bot *et al.*, 2002). Esta bactéria não tem efeito inibitório detectável no crescimento de fungos saprotróficos generalistas e fungos entomopatogênicos. Seu efeito é específico sobre *Escovopsis*, suprimindo completamente a

germinação de seus esporos (Currie & Stuart, 2001). Em um estudo de competição entre o Actinomycete e linhagens fúngicas, Currie *et al.* (1999b) puderam verificar que apenas o parasita especialista *Escovopsis* foi inibido, sendo as outras linhagens testadas (*Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp. e *Trichoderma* sp.) não afetadas.

Escovopsis é um parasita estritamente especializado, encontrado apenas nos jardins de fungo das formigas cortadeiras (Currie & Stuart, 2001; Wirth *et al.*, 2003). *Trichoderma*, por outro lado, é amplamente difundido na comunidade microbiana dos solos (Ortiz & Orduz, 2000) especialmente aqueles com alto conteúdo orgânico, como é o caso dos ninhos das formigas, podendo ser achado na rizosfera, na madeira e em material vegetal em decomposição, possuindo então hábitos saprofíticos (Lopez & Orduz 2003). Assim *Escovopsis* poderia ser mais suscetível aos efeitos de fragmentação que *Trichoderma*. No entanto, nem colônias de fragmento, nem colônias de área controle foram infectadas com *Escovopsis*. Duas razões para tal resultado podem ser apontadas. Primeiro, o método não foi adequado para o isolamento do *Escovopsis*. E segundo a nossa área controle apresenta *status* de perturbação semelhante ao fragmento. A primeira possibilidade pode ser rejeitada, uma vez que Nagamoto *et al.*, (2003) também encontrou dificuldades para isolar o *Escovopsis*, tanto a partir do jardim de fungos quanto das câmaras de lixo. Sendo assim, a segunda possibilidade, que a área controle e o fragmento estudados apresentam semelhanças no seu grau de perturbação e nas condições do estabelecimento do *Escovopsis*, é a mais provável. Se isso for verdade mesmo, a maior área de floresta Atlântica do Centro de Endemismo Pernambuco já é bastante alterada para o estabelecimento do fungo parasita *Escovopsis*.

Apesar de todas as linhas de defesa exibidas pelas formigas Attini e pelo seu fungo simbiote, nós registramos exuberante microflora associada aos jardins das colônias escavadas. Exceto para o fungo simbiote, pouca atenção tem sido dada a outros microorganismos associados com os jardins das formigas cortadeiras (Carreiro *et al.*, 1997), e referências de microorganismos próximos a estes jardins são raras (Cazin *et al.*, 1989; Della Lucia & Araújo, 1993; Diehl-Fleig & Valim-Labres, 1993; Fisher *et al.*, 1996; Bot *et al.*, 2002). Entretanto, alguns autores já relacionaram as dificuldades de isolamento do fungo simbiote (Cazin *et al.*, 1989), bem como a supressão do crescimento (Williams *et al.* 2001) e a degeneração do jardim (Quinlan & Cherret, 1978) à presença de bactérias e fungos contaminantes encontrados na superfície deste.

Apesar da grande riqueza de fungos apresentada neste trabalho, poucos foram os gêneros previamente referidos por outros autores. O gênero *Gliocladium* foi encontrado por Bot *et al.* (2002) germinando em jardins de formigas cortadeiras. *Penicillium* foi isolado como fungo saprofítico (Cazin *et al.*, 1989), e associado interna e externamente ao corpo das formigas (Diehl-Fleig & Valim-Labres, 1993). *Mucor* e *Aspergillus* também foram isolados a partir do corpo dessas formigas (Diehl-Fleig & Valim-Labres, 1993), sendo este último, embora não encontrado neste estudo, freqüentemente isolado de solos e de ninhos de *Atta* e *Acromyrmex* com excessiva umidade (Della Lucia & Araújo, 1993; Bot *et al.*, 2002). Isolando o material, dos jardins das formigas cortadeiras, Fisher *et al.* (1996) registraram 17 *taxa* de fungos filamentosos, sendo duas espécies também encontrados neste estudo, *Fusarium solani* e *Trichoderma longibrachiatum*. *Phomopsis* e *Cladosporium*, este último já isolado como saprofítico por Cazin *et al.* (1989), também foram isolados por Fisher *et al.* (1996) como endofíticos e epifíticos. A presença desses microorganismos nos jardins das formigas leva a acreditar que as secreções mandibulares e metapleurais das

formigas não possuem ação fungicida, mas apenas fungistática (Diehl-Fleig & Valim-Labres, 1993; Sales, 1998).

A abundância e a riqueza de fungos associados aos jardins foram inversamente proporcionais ao tamanho dos ninhos e à profundidade das câmaras de fungo, ou seja, aumentando-se o tamanho dos ninhos e a profundidade das câmaras, diminui-se o número de espécies e isolados de fungo. Em relação ao tamanho dos ninhos, sugere-se que este parâmetro indique a idade da colônia (Hölldobler & Wilson, 1990). Colônias mais velhas devem ser mais estáveis e, portanto, mais protegidas contra microorganismos invasores que aqueles de menor tamanho. Quanto à profundidade das câmaras, o que se pode supor é que devido à alta incidência de microorganismos na superfície do solo (Cardoso *et al.*, 1992), é bem provável que as câmaras de fungo mais superficiais sejam mais freqüentemente contaminadas.

Em ambientes naturais os microorganismos raramente crescem em total isolamento de outros e seu sucesso particular pode ser influenciado pelas atividades metabólicas de outros organismos (Madeira *et al.*, 1993). Algumas substâncias produzidas por fungos podem inibir o crescimento de outros microorganismos, exercendo ações antagonísticas e interferindo no seu crescimento (Diehl-Fleig & Valim-Labres, 1993; Madeira *et al.*, 1993). Contudo, há evidências experimentais de que o fungo simbiote das formigas cortadeiras, *Attamyces bromatificus*, não apresenta sinais de antagonismo contra outros fungos, o que sugere que este Basidiomycete tem uma baixa capacidade para inibir o crescimento de outros fungos, sendo dependente da agricultura das formigas para suprimir seu desenvolvimento (Fisher *et al.*, 1996).

Os testes de competição conduzidos com espécies de *Trichoderma* (*T. aureoviride*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. longibrachiatum*, *T. pseudokoningii*) mostraram que as

espécies deste gênero inibiram o crescimento micelial do fungo das formigas. Após uma semana do encontro entre os micélios, as culturas de *Trichoderma* se sobrepuseram ao cultivar das formigas, colonizando sua cultura e esporulando sobre ela. Esses resultados são semelhantes aos de Ortiz & Orduz (2000), que também conduziram experimentos *in vitro* com este gênero.

Nossos testes de competição com as espécies: *Circinella muscae*, *Nigrospora sphaerica*, *Paecilomyces roseo-purpureum*, *Pestalotiopsis maculans* e *Talaromyces wortmannii* também indicaram inibição do fungo simbiote. Outros experimentos de competição mostram que fungos saprofíticos dos gêneros *Aspergillus*, *Mortierella*, *Penicillium*, *Trichothecium*, *Schizophyllum* (Quinlan & Cherret, 1978) e *Metarhizium anisopliae* também inibem o crescimento do fungo simbiote (Lopez & Orduz, 2003).

Os nossos resultados da competição com *Gliocladium* também foram suportados por Ortiz & Orduz (2000). *Gliocladium* não causou nenhum efeito inibitório no crescimento micelial do fungo simbiote, havendo apenas o contato direto entre seus micélios. Resultados semelhantes foram encontrados com outras espécies testadas como: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium decemcellulare*, *Fusarium solani* e *Gongronella butleri*.

A insensibilidade e o rápido crescimento de alguns fungos em relação ao fungo simbiote pode ser explicada pela maneira como eles crescem, apresentando hifas muito longas e de rápido crescimento, que não são dependentes de sinais nutricionais do meio para crescimento (Ortiz & Orduz, 2000; Bot *et al.*, 2002). Dados dos experimentos de competição *in vitro* indicam que o fungo simbiote não coloniza ou inibe amostras de *Trichoderma* spp., devido, talvez, ao seu lento crescimento (Cazin *et al.*, 1989; Bot *et al.*, 2002) e/ou sua pouca habilidade em reconhecer outros microorganismos (Ortiz & Orduz,

2000). Essas características associadas ao fato do microclima dos ninhos das formigas cortadeiras oferecerem condições ideais para o desenvolvimento de muitos microorganismos, especialmente fungos (Diehl-Fleig & Valim-Labres, 1993), podem, talvez, explicar a elevada riqueza de fungos filamentos encontrados neste estudo.

Trichoderma, como proposto por alguns autores (Currie & Stuart, 2001; Bot *et al.*, 2002; Lopez & Orduz, 2003) é um forte candidato para o controle das formigas cortadeiras devido sua habilidade de colonização e competição por nutrientes (Ortiz & Orduz, 2000). Por ser um parasita generalista (Dal Bello *et al.*, 1997; Ortiz & Orduz, 2000), parece não ser tão afetado quanto o parasita especializado *Escovopsis*, pelos processos de perturbação ambiental. Quanto a *Escovopsis*, a sua ausência tanto na área controle quanto no fragmento podem sugerir altos níveis de perturbação em ambos habitats. A investigação dessa questão será continuada com isolamentos de fungos em colônias localizadas em outros fragmentos para verificar se esse padrão se repete. Entretanto, os resultados deste estudo contribuem com importantes informações sobre a biota associada aos jardins das formigas cortadeiras e possíveis inimigos naturais desses importantes herbívoros.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Usina Serra Grande, à Conservation International e ao Centro de Pesquisas Ambientais do Nordeste pelo apoio logístico deste trabalho. À CAPES/ DFG e ao CNPq pelo apoio financeiro. E à coleção de culturas Micoteca-URM (UFPE), pelas instalações cedidas durante a parte laboratorial deste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baijal, U. & Mehrotra, B. S. (1980). The genus *Cunninghamella* – a reassessment. *Sydowia* **33**, 1-13.
- Barrer. P. M. & Cherrett, J. M. (1972). Some factors affecting the site and pattern of leaf-cutting in the ant *Atta cephalotes* L. *Journal of Entomology* **47**, 15-27.
- Begon, M., Harper, J. L. & Townsend, C. R. (1996). Ecology: individuals, populations and communities. Blackwell, Boston.
- Bissett, J. (1991). A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. *Canadian Journal of Botany* **69**, 2373-2420.
- Booth, C. (1971). The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
- Bot, A. N. M., Ortius-Lechner, D., Finster, K. Maile, R. & Boomsma, J. J. (2002). Variable sensitivity of fungi and bacteria to compounds produced by the metapleural glands of leaf-cutting ants. *Insectes sociaux* **49**, 363-370.
- Cardoso, E.J.B.N., Tsai, S.M. & Neves, M.C.P. *Microbiologia do solo*. Sociedade Brasileira de Ciência do solo, Campinas/SP, 1992, 360p.
- Carreiro, S. C., Pagnocca, F. C., Bueno, O. C., Bacci Jr., M., Hebling, M. J. A. & da Silva, O. A. (1997). Yeasts associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908. *Antonie van Leeuwenhoek* **71**, 243- 248.

- Cazin, J. Jr., Wiemer, D. F. & Howard, J. J. (1989). Isolation, growth characteristics, and long storage of fungi cultivated by attine ants. *Applied and Environmental Microbiology* **55**, 1346-1350.
- Currie, C. R. & Stuart, A. E. (2001). Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. *Proceedings of Royal Society of London* **268**, 1033-1039.
- Currie, C. R. (2001a). A community of ants, fungi, and bacteria: a multilateral approach to studying symbiosis. *Annual Review of Microbiology* **55**, 357-380.
- Currie, C. R. (2001b). Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. *Oecologia* **128**, 99-106.
- Currie, C. R., Mueller, U. G. & Malloch, D. (1999a). The agricultural pathology of ant fungus gardens. *Proceedings of the National Academy of Science* **96**, 7998-8002.
- Currie, C. R., Scott, J. A., Summerbell, R. C. & Malloch, D. (1999b). Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature* **398**, 701-704.
- Chapela, I. H., Rehner, S. A., Schultz, T. R. & Mueller, U. G. (1994). Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. *Science* **266**, 1691-1694.
- Cherrett, J. M. (1972). Some factors involved in the selection of vegetable substrate by *Atta cephalotes* (L.) (Hymenoptera: Formicidae) in tropical rain forest. *Journal of Animal Ecology* **19**, 647-660.
- Cherrett, J. M. (1989). Leaf-cutting ants. In *Ecosystems of the world* (ed. H. Lieth & M. J. A. Werger), pp. 473-486. Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York.
- Della Lucia, T. M. C. & Araújo, M. S. (1993). Fundação e estabelecimento de formigueiros. Em *As formigas cortadeiras* (ed T. M. C. Della Lucia), pp. 60-83. UFV, Viçosa- Minas Gerais.

- Diehl-Fleig, E. (1997). Interações formigas-plantas. em: *Interações ecológicas e biodiversidade*. (ed. M. C. P Araújo, G. C Coelho & L. Medeiros), pp. 49-89. Editora UNIJUÍ, Ijuí, RS.
- Domsch, H. H., Gams, W. & Anderson, T. H. (1993). *Compendium of soil fungi*. Editora IHW - Verlag V. I, San Francisco.
- Ellis, M. B. (1971). Dematiaceous Hyphomycetes. Kew, Commonwealth Mycological Institute Kew.
- Farji-Brener, A. G. (2001). Why are leaf-cutting ants more common in early secondary forests than in old-growth tropical forests? An evaluation of the palatable forage hypothesis. *Oikos* **92**, 169-177.
- Fisher, P. J., Stradling, D. J., Sutton, B. C. & Petrini, L. E. (1996). Microfungi in the fungus gardens of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*: a preliminary study. *Mycological Research* **100**, 541-546.
- Forti, L. C., Neto, S. S. & Pereira-da-Silva, V. (1983). Dois métodos de avaliação de densidade populacional para operárias forrageiras de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae). *An. Soc. Entomol. Brasil* **12**, 195-211.
- Hervey, A., Rogerson, C. T. & Leong, I. (1977). Studies on fungi cultivated by ants. *Brittonia* **29**, 226-236.
- Hesseltine, C. W. & Fennel, D. I. (1995). The genus *Circinella*. *Mycologia*, v7.
- Hinkle, G., Wetterer, J. K., Schultz, T. R. & Sogin, M. L. (1994). Phylogeny of the Attine ant fungi based on analysis of small subunit ribosomal RNA gene sequences. *Science* **266**, 1695-1697.
- Hölldobler, B. & Wilson, E. O. (1990). *The Ants*. Cambridge (MA) Harvard University Press.

- IBGE. (1985). *Atlas Nacional do Brasil: Região Nordeste*, Rio de Janeiro.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., David, J. C. & Stalpers, J. A. (2001). *Dictionary of the fungi*. 9ª edição. CAB international Wallingford (UK).
- Krebs, C. J. (1989). *Ecological methodology*. Harper & Row Publishers, New York.
- Kruess, A & Tscharntke, T. (1994). Habitat fragmentation, species loss, and biological control. *Science* **264**, 1581-1584.
- Kruess, A. & Tscharntke, T. (2000). Species richness and parasitism in a fragmented landscape: experiments and field studies with insects on *Vicia sepium*. *Oecologia* **122**, 129-137.
- Lacaz, C. S., Porto, C. & Martins, J. E. C. (1991). *Micologia Médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*. Savier-EDUSP, São Paulo.
- Laurance, W. F., Ferreira, L. V., Rankin-de-Merona, J. M., Laurance, S. G., Hutchings, R. W. & Lovejoy, T.E. (1998a). Effects of forest fragmentation on recruitment patterns in Amazonian tree communities. *Conservation Biology* **12**, 460-464.
- Laurance, W. F., Ferreira, L. V., Rankin-de-Merona, J. M. & Laurance, S. G. (1998b). Rain forest fragmentation and the dynamics of amazonian tree communities *Ecology* **79**, 2032-2040.
- Lopez, E. & Orduz, S. (2003). *Metarhizium anisopliae* e *Trichoderma viride* for control of nests of the fungus-growing ant, *Atta cephalotes*. *Biological Control* **27**, 194-200.
- Madeira, A. C., Fryett, K. P., Rossall, S. & Clark, J. A. (1993). Interaction between *Ascochyta fabae* and *Botrytis fabae*. *Mycological Research* **97**, 1217-1222.

- Murcia, C. (1995). Edge effects in fragmented forests: implications for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* **10**, 58-62.
- Nagamoto, N. S., Rocha, M. M., Forti, L.C., Boaretto, M. A. C., Camargo, R. S., Andrade, A. P. P. & Lopes, J. F. S. (2003). Reavaliação do impacto do fungo parasita *Escovopsis* em colônias de formigas cortadeiras mantidas em laboratório. In *Anais do XVI Simpósio de Mirmecologia*. pp. 27-30 . Florianópolis.
- Nichols-Orians, C. (1991). Differential effects of condensed and hydrolyzable tannin on polyphenol oxidase activity of attine symbiotic fungus. *Journal of Chemical Ecology* **17**, 1811-1819.
- North, R. D., Jackson, C. W. & Howse, P. E. (1997). Evolutionary aspects of ant-fungus interactions in leaf-cutting ants. *Elsevier Science Tree* **12**, 386-389.
- Ortiz, A. & Orduz, S. (2000). *In vitro* evaluation of *Trichoderma* and *Gliocladium* antagonism against the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. *Mycopathologia* **150**, 53-60.
- Pitt, J. I. (1988). A laboratory guide to common *Penicillium* species. Commonwealth scientific and Industrial Research Organization Division Food Processing, Australia.
- Quinlan, R. J. & Cherrett, J. M. (1978). Aspects of the symbiosis of the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) and its food fungus. *Ecological Entomology* **3**, 221-230
- Quinlan, R. J. & Cherrett, J. M. (1979). The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.). *Ecological Entomology* **4**, 151-160.
- Rao, M., Terborgh, J. & Nuñez, P. (2001). Increased herbivory in forest isolates: implications for plant community structure and composition. *Conservation Biology* **15**, 624-633

- Rifai, M. A. (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol. Pap.* **116**, 1-56.
- Sales, F. J. M. de, (1998). Saúvas: Comportamento, domesticação e aleloquímicos. EdiAtta, Fortaleza, CE.
- Samson, R. A. (1974). *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. Centralalbureau voor schimmelcultures baar; Institute of the Royal Netherlands Academy of Sciences and Letters.
- Saunders, D. A., Hobbs, R. J. & Margules, C. R. (1991). Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. *Conservation Biology* **5**, 18-32.
- Schipper, M. A. A. (1978). On certain species of *Mucor* with a key to all accepted species. *Studies in Mycology*. n. 25, 1978. 53p.
- Seifert, K. A., Samson, R. A. & Chapela, I. H. (1995). *Escovopsis aspergilloides*, a rediscovered hyphomycete from leaf-cutting ant nests. *Mycologia* **87**, 407-413.
- Siqueira, C. G. de, Bacci Jr., M., Pagnocca, F. C., Bueno, O. C. & Hebling, M. .J. A (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.
- Stevens, R. B. (1974). Biological associations. In *Mycology guidebook*. pp. 313-356. University of Washington. Press London.
- Turner, I. M. (1996). Species loss in fragments of tropical rain forest: a review of the evidence. *Journal of Applied Ecology* **33**, 200-209.

- Vasconcelos, H. L. & Cherrett, J. M. (1997). Leaf-cutting ants and early forest regeneration in central Amazonia: effects of herbivory on tree seedling establishment. *Journal of Tropical Ecology* **13**, 357-370.
- Veloso HP, Rangel-Filho ALR, Lima, JCA (1991) Classificação da Vegetação Brasileira, adaptada a um sistema universal. IBGE, Rio de Janeiro.
- Weber, N. A. (1972). Gardening ants, the Attines. The American Philosophical Society, Philadelphia.
- Whitmore, T. C. (1997). Tropical forest disturbance, disappearance, and species loss. In: (ed. W. F. Laurance & R. O. Jr. BierregaardB). *Tropical forest remnants: Ecology, management, and conservation of fragmented communities*. University of Chicago Press, Chicago, pp 3-12
- Williams, I. S., Jones, T. H. & Hartley, S. E. (2001). The role of resources and natural enemies in determining the distribution of an insect herbivore population. *Ecological Entomology* **26**, 204-211.
- Wirth, R., Herz, H., Ryel, R.J., Beyschlag, W. & Hölldobler, B. (2003). Herbivory of leaf-cutting ants a case study on *Atta colombica* in the Tropical Rainforest of Panama. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
- Zar, J. H. (1996). *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, Inc., New Jersey.
- Zuidema, P. A., Sayer, J. A. & Dijkman, W. (1996). Forest fragmentation and biodiversity: the case for intermediate-sized conservation areas. *Environmental Conservation* **23**, 290-297.

Tabela 1. Espécies e abundâncias de fungos filamentosos, (Kirk *et al.*, 2001), coletados na área controle e no fragmento de mata Atlântica no município de Ibataguara, Alagoas.

| Espécies | Área controle | Fragmento |
|--|----------------------|------------------|
| FUNGOS ANAMÓRFICOS | | |
| <i>Acremonium roseolum</i> (G. Smith) W. Gams | | 1 |
| <i>Acremonium</i> sp. 1 Link ex Fr. | 1 | |
| <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fres.) de Vries | 1 | |
| <i>Cladosporium tenuissimum</i> Cooke | | 1 |
| <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Penzig | 2 | 2 |
| <i>Fusarium decemcellulare</i> Brick | 1 | |
| <i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht | 1 | |
| <i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc. | | 5 |
| <i>Gliocladium virens</i> Miller, Giddens & Foster | | 1 |
| <u><i>Mycelia sterilia</i></u> | 5 | 1 |
| <i>Nigrospora sphaerica</i> (Sacc.) Mason | | 1 |
| <i>Paecilomyces carneus</i> (Duché et Heim) | | 1 |
| <i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom) Samson | 1 | 2 |
| <i>Paecilomyces roseo-purpureum</i> Dierckx | | 1 |
| <i>Paecilomyces varioti</i> Bainier | | 1 |
| <i>Penicillium canescens</i> Sopp | | 1 |
| <i>Penicillium citreonigrum</i> Dierckx | | 2 |
| <i>Penicillium commune</i> Thom | 6 | 4 |

| | | |
|---|----|----|
| <i>Penicillium corylophilum</i> Dierckx | 1 | 3 |
| <i>Penicillium crustosum</i> Thom | | 2 |
| <i>Penicillium fellutanum</i> Biourge | 3 | |
| <i>Penicillium glabrum</i> (Wehmer) Westling | 2 | 2 |
| <i>Penicillium griseofulvum</i> Dierckx | | 1 |
| <i>Penicillium implicatum</i> Biourge | 1 | |
| <i>Penicillium janthinellum</i> Biourge | | 1 |
| <i>Penicillium lapidosum</i> Raper & Fennell | 1 | |
| <i>Penicillium lividum</i> Westling | 1 | |
| <i>Penicillium paxili</i> Bainier | | 3 |
| <i>Penicillium purpurogenum</i> Stoll | | 1 |
| <i>Penicillium restrictum</i> Gilman & Abbott | 2 | |
| <i>Penicillium simplicissimum</i> (Oudem.) Thom | 2 | |
| <i>Penicillium solitum</i> Westling | 1 | |
| <i>Penicillium turbatum</i> Westling | | 1 |
| <i>Penicillium verruculosum</i> Peyronel | | 3 |
| <i>Penicillium waksmanii</i> Zaleski | 1 | 1 |
| <i>Penicillium</i> sp. 1 Link ex Fr. | | 3 |
| <i>Penicillium</i> sp. 2 Link ex Fr. | 2 | |
| <i>Pestalotiopsis maculans</i> (Corda) Nag Raj | 2 | |
| <i>Phomopsis archeri</i> nom.nov. | | 3 |
| <i>Phomopsis stipata</i> (Lib.) Sutton | 1 | |
| <i>Trichoderma aureoviride</i> Rifai | 10 | 13 |

| | | |
|--|---|---|
| <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai | 5 | 5 |
| <i>Trichoderma koningii</i> Oudem. | 2 | 1 |
| <i>Trichoderma longibrachiatum</i> Rifai | 4 | 5 |
| <i>Trichoderma pseudokoningii</i> Rifai | 1 | |
| <i>Trichoderma</i> sp. 1 Pers. ex Fr. | | 1 |

ZYGOMYCOTA

| | | |
|---|---|---|
| <i>Circinella minor</i> Lendner | 1 | |
| <i>Circinella muscae</i> (Sorokine) | 1 | 1 |
| <i>Cunninghamella blakesleeana</i> Lendner | 2 | |
| <i>Cunninghamella homothallica</i> Kominami & Tubaki | 3 | |
| <i>Gongronella butleri</i> (Lendner) Peyronel & Dal Vesco | | 2 |
| <i>Mucor</i> sp.1 Mich. ex St.-Am | 2 | |

ASCOMYCOTA

| | | |
|---|---|--|
| <i>Pseudallescheria boydii</i> (Shear) McGinnis <i>et al.</i> | 1 | |
| <i>Talaromyces trachyspermus</i> (Shear) Stolk & Samson | 1 | |
| <i>Talaromyces wortmannii</i> (Klöcker) C. Benjamin | 1 | |

| | | |
|------|--|---|
| Sp.1 | | 2 |
| Sp.2 | | 1 |

LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1. Localização da área de estudo, Usina Serra Grande, Municípios de Ibateguara e São José da Laje, Alagoas, mostrando a área original de mata Atlântica e os remanescentes atuais (modificado de Pimentel, 2001).

Figura 2. Correlação de Spearman entre: a riqueza e o tamanho dos ninhos (A); a abundância e o tamanho dos ninhos (B); a riqueza e a profundidade das câmaras de fungos (C); e a abundância e a profundidade das câmaras de fungos (D) das colônias escavadas na área controle e no fragmento da área de estudo.

Figura 3. Taxa de parasitismo dos jardins das formigas cortadeiras por *Trichoderma* spp. nos dois ambientes estudados.

Figura 4. Habilidade inibitória dos fungos: *Circinella muscae* (A), *Nigrospora sphaerica* (B), *Paecilomyces roseo-purpureum* (C), *Pestalotiopsis maculans* (D), *Talaromyces wortmannii* (E), *Trichoderma aureoviride* (F), *Trichoderma harzianum* (G), *Trichoderma koningii* (H), *Trichoderma longibrachiatum* (I), *Trichoderma pseudokoningii* (J), *Colletotrichum gloeosporioides* (K), *Fusarium decemcellulare* (L), *Fusarium solani* (M), *Gliocladium virens* (N), *Gongronella butleri* (O), sobre o fungo simbiote da formiga cortadeira *Atta laevigata*. ■ = Média; $\bar{\uparrow}$ = Erro padrão; \perp / \top Desvio padrão.

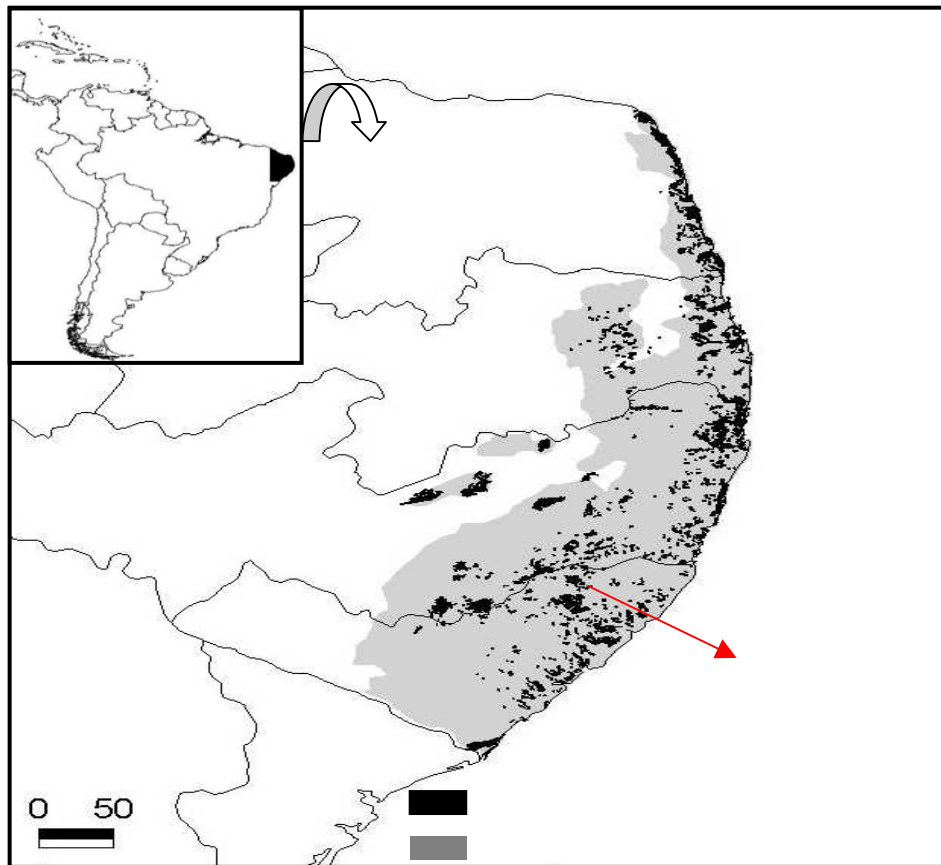


Figura 1.

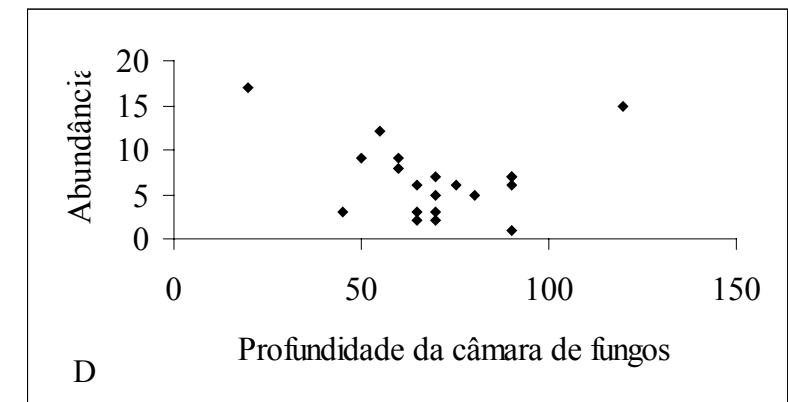
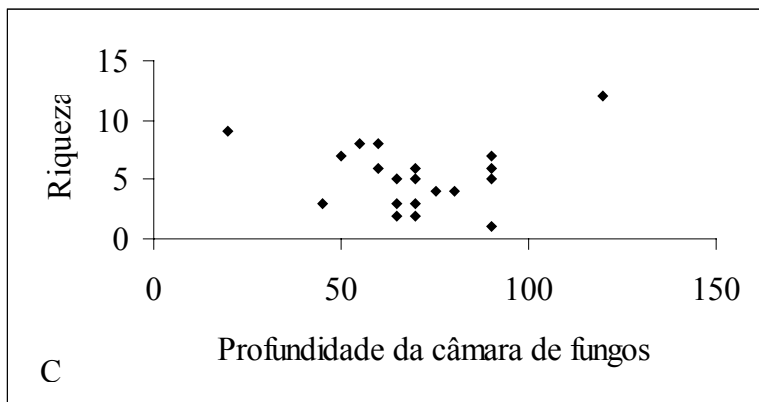
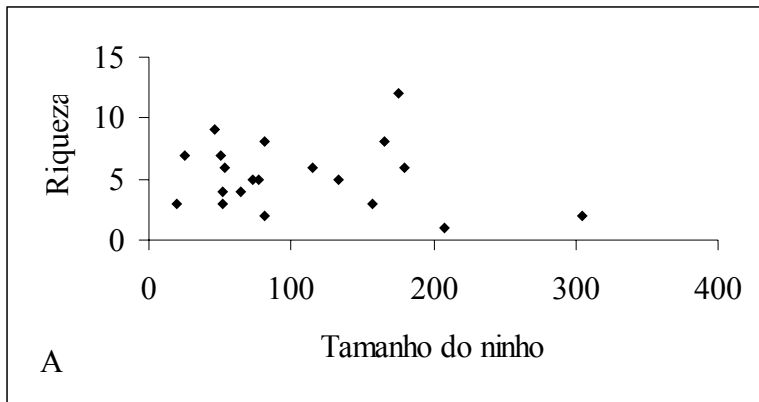


Figura 2.

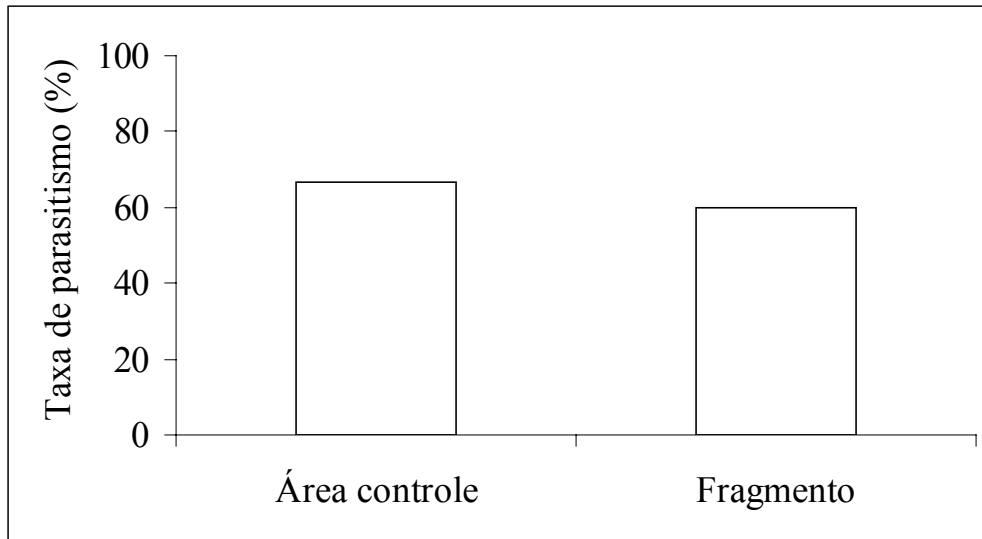


Figura 3.

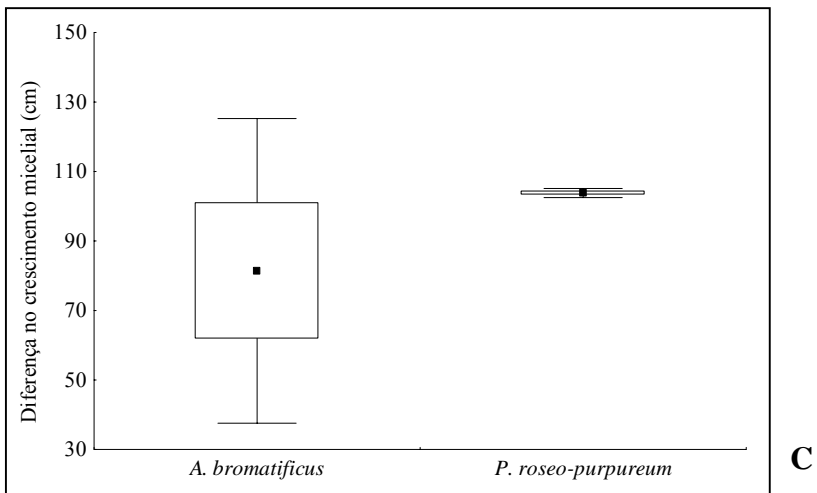
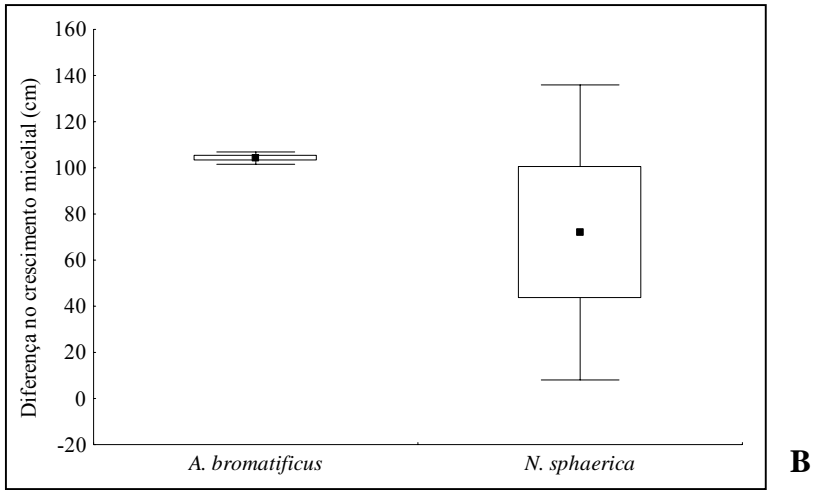
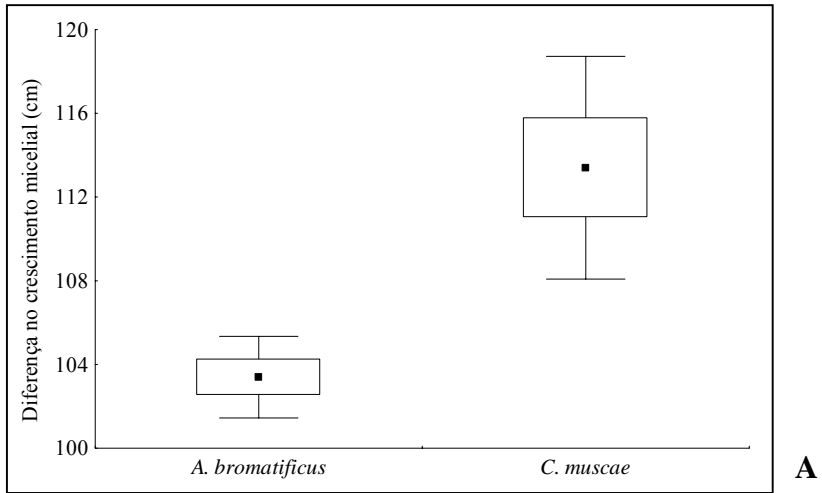
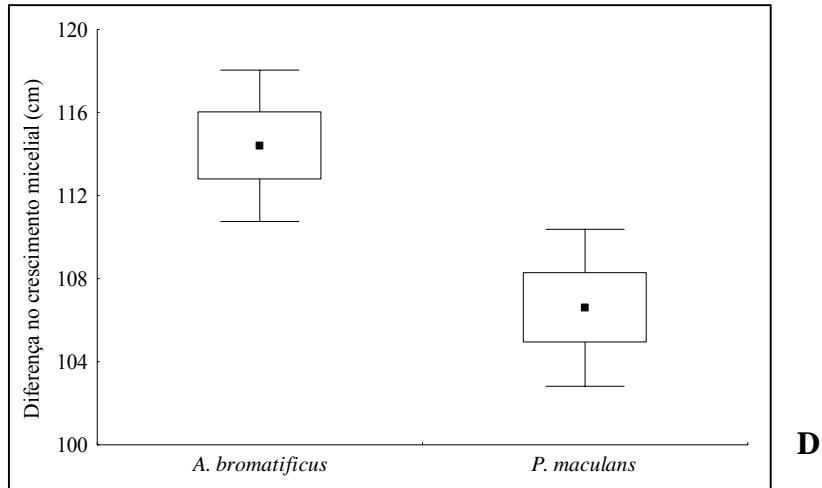
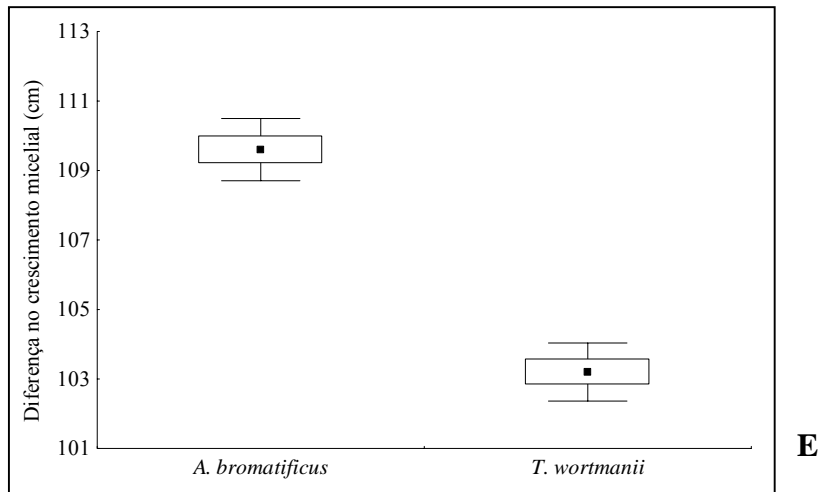


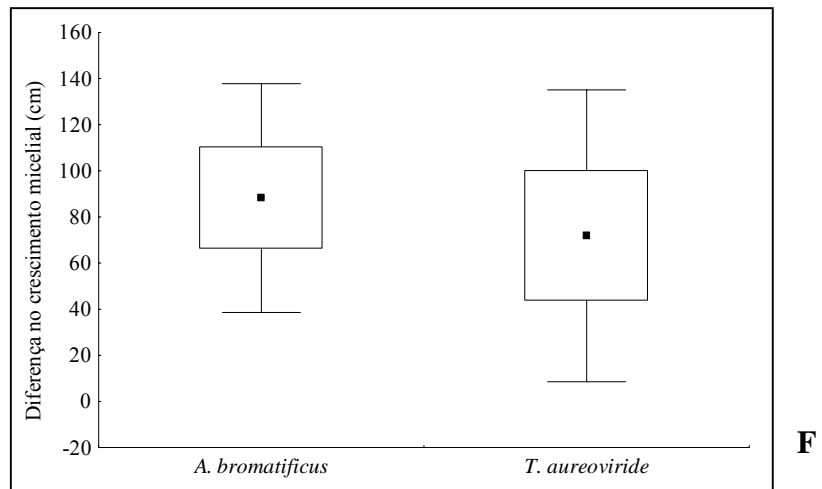
Figura 4.



D

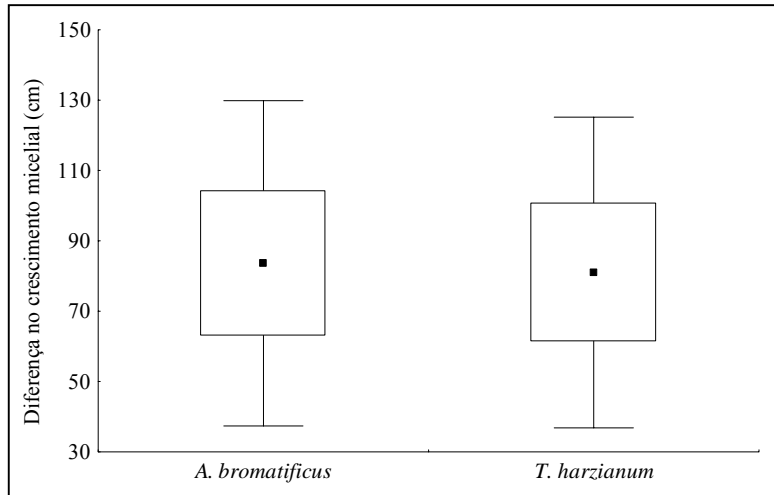


E

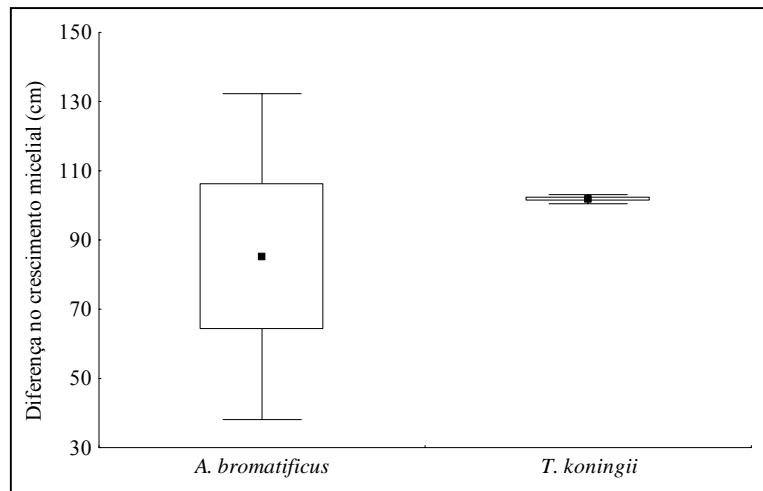


F

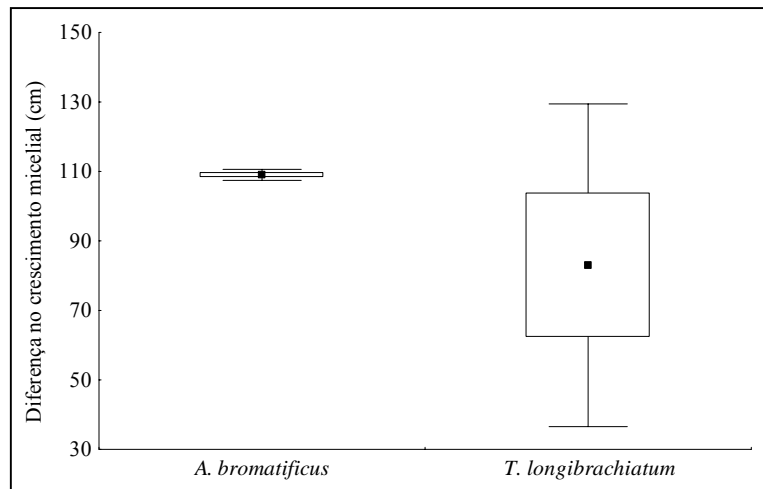
Figura 4.



G

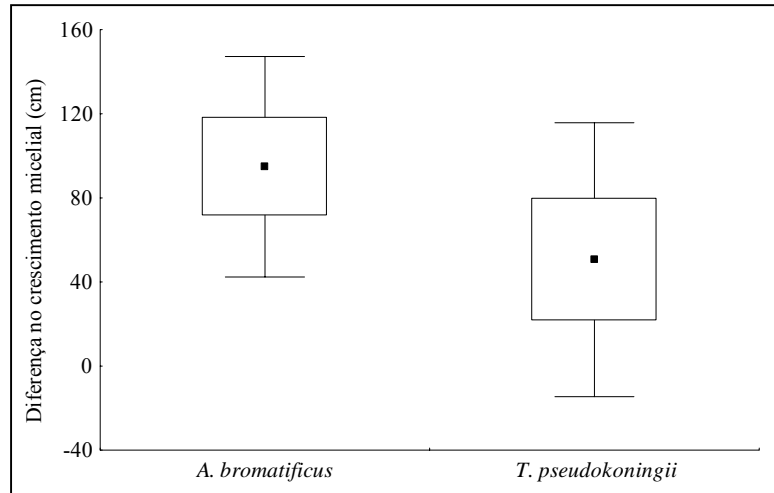


H

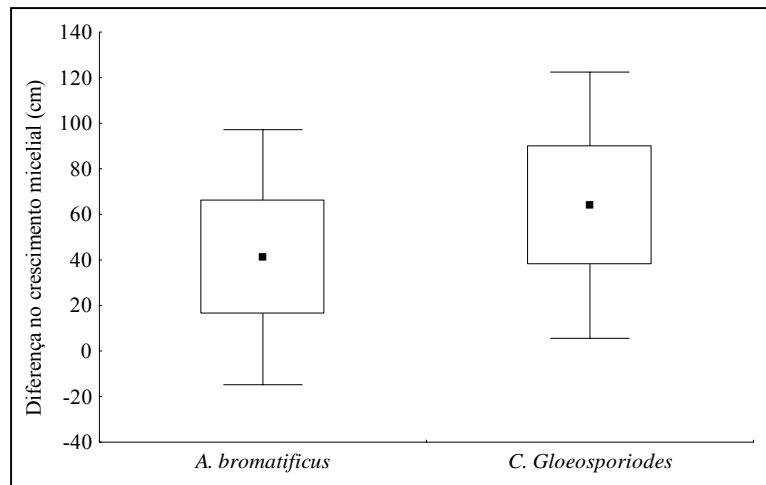


I

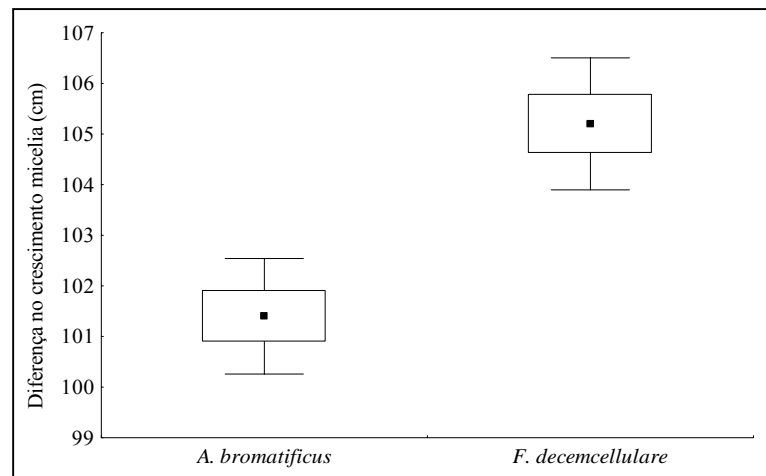
Figura 4.



J



K



L

Figura 4.

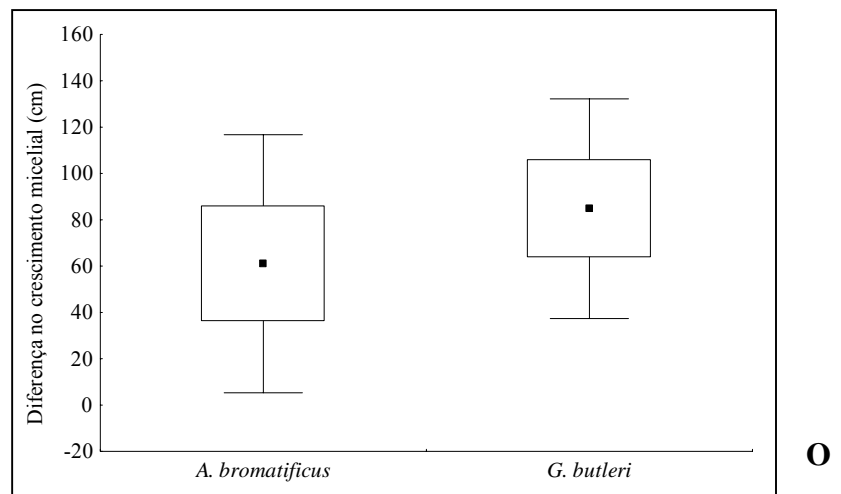
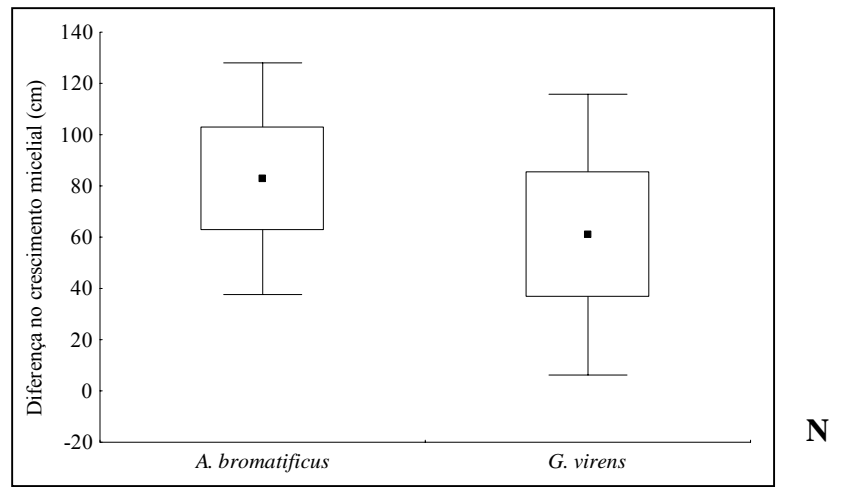
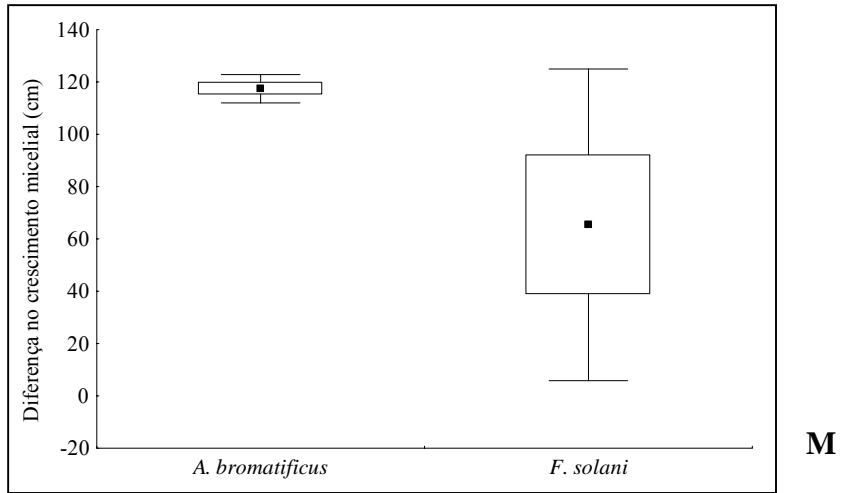


Figura 4.

ANEXO

Mycological Research

Mycological Research is an international journal which publishes papers in **all fields of mycology** including biotechnology and industrial applications of fungi, and plant, animal and human pathology.

Mycological Research will publish both full length and short papers reporting original research which makes a significant contribution to mycology. Review articles on themes of *topical* interest are welcome. There are no page charges, and non-members of the Society are encouraged to submit manuscripts for publication. Authors receive a free supply of reprints.

Full *Instructions to Authors* were published in volume **104 (1)** (January 2000), pp. 119-127. REFER TO THESE AND RECENT ISSUES OF THE JOURNAL FOR DETAILED GUIDANCE.

Manuscripts and enquiries should be directed to:

Professor David L Hawksworth CBE,
Executive Editor,
Departamento de Biología Vegetal II
Facultad de Farmacia
Universidad Complutense
Plaza de Ramon y Cajal, Ciudad Universitaria
E-28040 MADRID Spain

email: davidh@eucmos.sim.ucm.es

To submit a manuscript to *Mycological Research* send:

- (1) THREE copies of the typescript which must be double-spaced throughout.
- (2) A disk or emailed electronic version, ideally in Microsoft Word.
- (3) ONE complete set of illustrations comprising original line drawings and first class photographic prints intended for use by the printer in preparing the published version of your paper (identify each separate item with your name and short title of the paper). Mounted illustrations MUST NOT exceed A4 in size.
- (4) TWO complete sets of fully labelled illustrations, which may be of lesser quality unless this diminishes their scientific value, for use in the refereeing process (make sure that these are also identified with your name and paper title.)
- (5) A covering letter which clearly states the name and address of the person with whom the Editors should correspond and which confirms explicitly that (a) all named authors have agreed to publication of the work, and (b) the manuscript does not infringe any other person's copyright or property rights.
- (6) The names of 3-5 mycologists not in your institution with appropriate expertise who might be considered as possible referees for your paper.

- (7) If the manuscript makes reference to other papers which are 'in press' please include a copy of such unpublished papers for the benefit of the referees.
- (8) Faxed submissions of textual material (but not illustrations) are welcome, but an electronic version will also be required.

The first page of your manuscript should show the title of the paper, names of authors and their affiliations, a running title (not more than 50 characters and spaces), and a short summary. Not all papers can be presented in the conventional form, so we are willing to allow some flexibility in layout. However, papers describing conventional experimental work should be set out in the five major sections Summary, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion. The summary and introduction **do not carry headings** in the printed text but the others should be given the headings shown in the previous sentence.

These major sections can be subdivided by up to two levels of subheading. You do not need to attempt to reproduce the typographical layout of *Mycological Research* in your typescript.

Spelling and punctuation. English spellings are required, and should follow The Concise Oxford Dictionary (Oxford: Clarendon Press). Words of non-English origin, like *bona fide*, *prima facie*, *in vitro*, *in situ*, will be printed in italic type and should be underlined in the manuscript.

Experimental procedures. A basic assumption is that the paper describes research in sufficient detail for it to be repeatable by the reader. Consequently, all experimental methods should be described briefly, but in sufficient detail to allow others to reproduce the experiments. All materials must be available to others. This means that commercial sources must be identified, proprietary materials must be patented prior to publication (so that they can be released), and all cultures, strains or varieties on which the work is based must be deposited in an identified culture collection from which they can be obtained by others.

Statistical treatment of results. Numerical data which lack statistical analysis are valueless and will not be published. Data from a sufficient number of independent experiments should be reported to permit evaluation of the reproducibility and significance of results. When any significance is claimed, the test of significance used should be stated and an estimate of the probability given. If you use complex statistical transformations a few lines of explanation in plain English of the purpose and the outcome of the test should be provided.

Figures. ALL FIGURES (LINE DRAWING AND HALF-TONE ALIKE) MUST BE NUMBERED CONSECUTIVELY IN ONE SERIES within the manuscript. This also applies to composite plates or montages, each component of which must be one of the consecutively-numbered figures. Figures should be sized to take up the minimum possible space. **Colour photographic illustrations** can be included **if they are essential** to the paper but only by prior discussion with the Executive Editor. Magnifications MUST be indicated by SCALEBARS and these MUST show whole numbers of the most appropriate unit.

Reference citation in text. References in the text are to be given in the following form: 'Smith & Jones (1965) have shown ...', or, 'some authors (Williams, 1928; Smith & Jones, 1965) consider that ...'. The names of collaborating authors are joined by ampersand (&). Where there are three authors, **all names should be given at first citation**, and thereafter the first name only, adding *et al.*, e.g. Smith, Jones & Robinson (1964) **at first**, then Smith *et al.* (1964) or (Smith *et al.*, 1964) subsequently. Where there are four or more authors, use the form Smith *et al.* **for all citations**. Where an author or authors have published more than one work in a year, to which a reference is made, they should be distinguished by letters *a*, *b*, etc. immediately after the date, e.g. Smith (1965*a*, *b*).

Citations in Reference list. References are to be listed in strictly alphabetical order at the end of the text. Arrangement in the reference list is based on the Harvard system, but each reference should include the **full title** of the paper AND JOURNAL (not in an abbreviated form), and the **final as well as the first** page number. In the case of chapters in books, the names of editors, first and last page numbers of the chapters, publisher and place of publication are needed.

COPYRIGHT

Under the United Kingdom's Copyright, Designs and Patents Act (1988), copyright in the typographical arrangement of all papers published in *Mycological Research* will rest with the British Mycological Society (the Publisher of *Mycological Research*). Except for the activities which are permitted under Chapter III of the above Act, before any paper or part of a paper can be reproduced the consent of the British Mycological Society must be obtained from the Executive Editor. Copyright in the typographical arrangement is quite distinct from ownership of copyright of the literary work represented by the text, and artistic work represented by the graphic and photographic components of individual papers. The first part of this paragraph does not affect the first ownership of these copyrights. In most cases they will remain the property of the employer of the author of the paper (section 11 of the Act).

© The British Mycological Society