

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
DIVERSIDADE BIOLÓGICA

Variação temporal e espacial de infecção de *Ophiocordyceps unilateralis sensu lato* (Ascomycota, Hypocreales) em *Camponotus* (Hymenoptera, Formicinae) em três áreas da Amazônia

JOÃO PAULO MACHADO DE ARAÚJO

Manaus, Amazonas  
Maio de 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
DIVERSIDADE BIOLÓGICA

Variação temporal e espacial de infecção de *Ophiocordyceps unilateralis sensu lato* (Ascomycota, Hypocreales) em *Camponotus* (Hymenoptera, Formicinae) em três áreas da Amazônia

JOÃO PAULO MACHADO DE ARAÚJO

Orientador: THIERRY RAY JEHLIN GASNIER

Co-orientador: DAVID PETER HUGHES

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Diversidade Biológica, Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Diversidade Biológica, área de concentração Caracterização da Biota Amazônica

Manaus, Amazonas  
Maio de 2012

### Ficha catalográfica

Araújo, João Paulo Machado de  
Variação temporal e espacial de infecção de *Ophiocordyceps unilateralis sensu lato* (Ascomycota, Hypocreales) em *Camponotus* (Hymenoptera, Formicinae) em três áreas da Amazônia/ João Paulo Machado de Araújo  
Manaus: UFAM,  
2012.  
41 p. ilustr.  
Dissertação de Mestrado - Área de concentração em Diversidade Biológica  
1. Fungos parasitas 2. Hypocreales 3. *Camponotus*  
**Sinopse:**  
Foi avaliada a variação temporal e espacial na infecção de *Ophiocordyceps unilateralis sensu lato*, em três áreas da Amazônia, assim como foram estudadas quais espécies de formigas do gênero *Camponotus* são infectadas nestas áreas.

Esta segue as normas de formatação propostas pela Coordenação Geral do Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica da Universidade Federal do Amazonas, versão de julho de 2008, sendo seu capítulo apresentado na forma de manuscrito de artigos, que corresponde aos resultados gerados pelo projeto de dissertação. O Capítulo único segue as normas sugeridas pelo periódico *Mycologia*.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à minha família que sempre me apoia e me apoiou em tudo. Minha mãe, meu grande amor, que sempre torceu e me incentivou em tudo que quis fazer, sendo essa conquista especialmente dedicada à ela. Meu pai, Biólogo que me inspirou e que sempre se orgulha de cada conquista minha e me ensinando valores que sempre levarei comigo, à Lu pelos bons momentos de minha infância e adolescência, meu querido irmão, de que tenho muito orgulho pela força e garra que encara a vida e pela amizade de sempre. Aos meus tios Omar, meu segundo pai de coração, Denise, minha tia Regina, eterna tia bendita e tio Luís, melhor pizzaiolo da família. Minha linda Ju, que também sempre torce e me acalma nos momentos difíceis, com palavras doces e um carinho tão profundo... assim como toda sua família que me acolheu como se dela fizesse parte. E minha vózinha Dylsa querida, que virou uma estrela no meio desta trajetória, que sempre me guia e ilumina meu caminho, que com certeza agora brilha mais forte, feliz com essa conquista que ela tanto fez parte...

A todos meus queridos amigos-irmãos João, Nery, Vitão e Quiabão. Meu Grande Amigo e primo de momentos inesquecíveis e horas engraçadas e difíceis Gui Goiaba. Meu primo Vitim Bolerias, pelo humor e amizade. Meus queridos amigos de Ipatinga que sinto tanta falta... Ao meu amigo Renato Bruno pelas ajudas na Reserva Ducke e meus amigos Lelei, Dri e Flávio por dividir momentos inesquecíveis em Manaus, meu grande amigo Hugo pela amizade de sempre e pela ajuda nos momentos mais difíceis durante esse caminho, Vizin, Fabin, Phelipe Nery. Meus queridos amigos Biólogos, Paixão, Jojô, Fernanda, Cris, Vaca, Ribulas, Núbia, Tamires, Vinícius, Iuri, Luana, Marcílio e Paulão Balbino.

Profissionalmente só tenho a agradecer por ter a sorte de ter encontrado em minha vida pessoas tão competentes e motivadoras como Jair Putzke, que foi o responsável pela minha paixão pelos fungos, Fernando Gomes, meu amigo e professor que sempre acreditou em mim e me abriu muitas portas, Cacá e Wadson, que me ensinaram como ser um pesquisador com erro zero! Meu amigo Felipe Wartchow, Saci, meu amigo que me ensinou tanto sobre os fungos da Amazônia, Fabrício Baccaro, importantíssimo neste trabalho e em minha formação e Charissa de Bekker, pelos ensinamentos e Tatiana Sanjuán, pela ajuda de sempre.

Aos meus orientadores Thierry Gasnier, David Hughes e Harry Evans, que me ajudaram cada um de uma forma, mas todos com vital importância para que este trabalho se concluísse.

Ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica, a PennState University pelo apoio logístico e financeiro durante este trabalho, a CAPES pela bolsa, ao INPA na pessoa do Sr. Rubenildo Lima da Silva pelo apoio logístico e ao Dr. Augusto Henriques pela ajuda com a deposição e envio de material. A Benjamin da Luz, gestor da Estação Ecológica de Maracá por toda ajuda e empenho em fazer com que tudo funcionasse durante nosso trabalho, e ao Itamar pela ajuda na floresta. Aos responsáveis pelo Parque Nacional do Viruá, Beatriz Lisboa e Antônio Lisboa e em especial ao Sr. Iran e a todos do PPBio.

Agradeço também a Deus, Buda, Odin, Krishna, Maomé ou Jah, o nome é o que menos importa, o importante é a energia boa que eles nos trazem, nos momentos em que precisamos, nas horas difíceis, para iluminar nosso caminho...

## Resumo

Os *Ophiocordyceps* são os principais fungos entomopatogênicos, possuem alta virulência e podem ter grande influência nas comunidades de seus hospedeiros. No presente estudo, foram coletadas formigas do gênero *Camponotus* infectadas por fungos pertencentes ao complexo *Ophiocordyceps unilateralis sensu lato* em três áreas da Amazônia brasileira. Na Reserva Ducke foram realizadas duas coletas, uma na época mais chuvosa e uma na época mais seca. Nas reservas de Viruá e Maracá, as coletas foram feitas na época seca. Dentro de cada área, nove transectos de 250 metros foram amostrados, sendo estes, distantes no mínimo 1 km entre si. Foram encontradas 424 formigas *Camponotus* infectadas com o fungo em vários estádios de desenvolvimento. A taxa de infecção na época chuvosa foi em média 3 vezes superior à época seca, provavelmente em função das necessidades de sobrevivência e desenvolvimento dos esporos, entretanto, mesmo na época seca houveram formigas infectadas. A taxa de infecção foi semelhante entre as três áreas estudadas apesar das diferenças de clima, vegetação e composição de espécies de formigas. Foram encontradas 17 espécies de *Camponotus* infectadas, mas acreditamos que este número seja ainda maior. A taxa de hiperparasitismo foi baixa, menos de 6% no total das formigas encontradas infectadas, bastante inferior a outros estudos, aparentemente afetando pouco a população de *Ophiocordyceps unilateralis* nessas áreas. Não encontramos influência da granulometria do solo sobre essas infecções. Foram encontrados diferentes tipos de esporos para diferentes espécies de formigas infectadas, indicando que há várias espécies diferentes entre os *O. unilateralis* ainda não descritos, sendo necessário estudos taxonômicos posteriores para um melhor entendimento desta relação.

Palavras-chave: Fungos parasitas, Hypocreales, Formigas.

## Abstract

*Ophiocordyceps* are the main entomopathogenic fungi. They are highly virulent and may have an important influence on their hosts communities. In the present study, we collected ants of the genus *Camponotus* infected by fungi belonging to the complex *Ophiocordyceps unilateralis sensu lato* in three areas of the Brazilian Amazon. In Ducke Reserve, two samples were taken, one in the dry season of 2011 and another in the rainy season of 2012. In Parque Nacional do Viruá and Estação Ecológica de Maracá, the samples were taken during one dry season of 2012. Within each area, nine 250 m-long transects, at least 1 km distant from each other, were sampled. We found 424 infected *Camponotus* by *Ophiocordyceps* in various stages of development. The infection rate in the rainy season was on average three times higher than the dry season, probably reflecting the survival and developmental needs of spores, however, even in the dry season there were infected. The infection rate was similar between the three areas despite differences in climate, vegetation and ant species composition. We found 17 *Camponotus* species infected, but we believe this number is even higher. Hyperparasite occurrence rate was low, representing 6% of total infected ants found, suggesting little effect on *Ophiocordyceps* population in these areas. There was no relationship between the number of infected ants and the soil type (in terms of granulometry). We found morphological differences among the spores infecting different species of ants, indicating that there are several species of the *O. unilateralis* not yet described, requiring further taxonomic studies to better understand this relationship.

Key-words: Parasitic fungi, Hypocreales, Ants.



## SUMÁRIO

Introdução Geral	10
Referência Bibliográficas	12
Objetivos	15
Hipóteses	16
<b>Capítulo Único</b>	17
Introdução	19
Material e Métodos	22
Resultados	28
Discussão	33
Referências Bibliográficas	37

## INTRODUÇÃO GERAL

O papel dos parasitas como importantes agentes ecológicos tem ganhado reconhecimento no decorrer das últimas décadas. Eles possuem a capacidade de controlar populações, aumentar a biodiversidade e podem ser usados como bioindicadores (Combes 2001; 2005). Esses patógenos causam um efeito maior nas comunidades quando alteram o comportamento do hospedeiro (como fungos *Cordyceps* e gêneros afins) (Marcogliese, 2002; Moore, 2002), quando eles reduzem o impacto dos herbívoros (Thaler *et al.* 1999) ou fazem dos hospedeiros alvos mais suscetíveis a predadores (Hudson, 1992; Packer, 2003). Dessa forma, o impacto de parasitas na redução, modificação da atividade e competitividade de seus hospedeiros, podem modificar a abundância de outras espécies e a força das interações entre elas. Esses efeitos diretos e indiretos na abundância de hospedeiros têm uma importante função no fluxo de energia nas comunidades (Hudson, *et al.* 2006).

Existem muitos exemplos de parasitas que alteram o comportamento de seus hospedeiros. Em muitos casos, o parasita gera mudanças comportamentais dramáticas, como alguns nematóides e nematomorfos que fazem com que grilos se atirem na água, onde o parasita poderá se reproduzir. Outros exemplos incluem artrópodes, peixes e mamíferos que têm seu comportamento alterado, fazendo-os presas fáceis de predadores, tornando possível a passagem trófica do parasita para outro hospedeiro (Pontoppidan *et al.* 2009). Entre estes parasitas que alteram o comportamento do hospedeiro estão os fungos. (Hughes *et al.* 2009)

Os principais fungos entomopatogênicos que infectam formigas (e outros insetos) pertencem aos gêneros *Cordyceps* e afins (Evans, 1982; Sung *et al.*, 2007). Existem pelo menos 400 espécies destes gêneros infectando uma enorme quantidade de espécies de artrópodes, incluindo nove ordens de insetos, aranhas e também outros fungos (Hughes *et al.*, 2009). Infecções de *Cordyceps* e gêneros afins são altamente virulentas e matam seus hospedeiros para o desenvolvimento de estruturas aéreas por onde os esporos são dispersados. Uma das características deste grupo de fungos é a produção de hifas compactas que crescem fora do corpo do hospedeiro (stromata), onde são produzidos os corpos de produção de esporos (peritécio) (Evans, 1982).

Recentemente um estudo de múltiplos genes confirmou uma longa suspeita de que o gênero é parafilético (Sung *et al.*, 2007). Três gêneros monofiléticos foram propostos e todas as associações com formigas foram alocados em *Ophiocordyceps*. Segundo Evans (1974, 1982), há indícios fortes de que algumas (várias) espécies de *Cordyceps* são obrigatoriamente

parasitas de formigas. Como as formigas são frequentemente citadas como agentes importantes nos ecossistemas de florestas tropicais (Fittkau & Klinge, 1973; Folgarait, 1998; Hughes & Westoby, 1990; Underwood & Fisher, 2006), esses fungos entomopatogênicos podem se importantes agentes no controle natural de populações de formigas, ajudando a manter a estabilidade dos ecossistemas de florestas tropicais (Evans, 1974).

Existem evidências que o padrão de distribuição espacial dos fungos é agregado em micro escala (até 10 m<sup>2</sup>, chamados de *graveyards*) (Pontoppidan *et al*, 2009). No entanto a distribuição espacial desses fungos em escalas maiores bem como sua possível associação com fatores ambientais ainda é pouco entendida.

As condições de alta umidade e temperatura por longos períodos do ano nas florestas tropicais são pré-requisitos ideais para as infecções fúngicas (Evans, 1974), o que torna a Amazônia um local propício para infecção ao longo de todo o ano. Sanjuán *et al.*, (2001) também realizaram coletas destes fungos na Amazônia colombiana, encontrando 868 fungos ao todo, sendo 207 e 661 nas épocas seca e chuvosa, respectivamente. Em ambos os períodos, foram encontradas quatro diferentes espécies de *Ophiocordyceps* parasitando formigas. Braga-Neto *et al* (2008), realizaram coletas na Reserva Ducke com fungos de serrapilheira, encontrando uma influência no regime de chuvas em relação à diversidade e abundância desses organismos na floresta. Andrade (1980), também realizou coletas deste fungo, encontrando um número alto de infecções, porém não houve comparação entre as épocas seca e chuvosa.

Estudos ecológicos e taxonômicos desses fungos são necessários nesta área, pois, se conhece muito pouco sobre a diversidade de espécies que ocorrem na Amazônia, assim como, seus aspectos ecológicos.

Nesta dissertação foi dado o enfoque ecológico na infecção de fungos *Ophiocordyceps unilateralis sensu lato* na Reserva Ducke (AM), onde a diversidade de hospedeiros e abundância dessa infecção foram observadas e comparadas em duas épocas de coleta, chuvosa e seca. Foram analisadas formigas infectadas do gênero *Camponotus*, (que são infectadas pelo complexo *unilateralis*), formigas de outros gêneros também foram encontradas infectadas, mas por outras espécies de *Ophiocordyceps*. Outro aspecto estudado foi a diferença da ocorrência e diversidade de hospedeiros dessa infecção entre três áreas, Estação Ecológica de Maracá (RR), Parque Nacional do Viruá (RR) e Reserva Ducke (AM), onde as espécies de formigas infectadas foram confrontadas com as espécies ocorrentes nestas áreas (dados já existentes na literatura).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade C. 1980. Epizootia natural causada por *Cordyceps unilateralis* (Hypocreales, Euascomycetes) em adultos de *Camponotus* sp. (Hymenoptera, Formicidae) na região de Manaus, Amazonas, Brasil, *Acta Amazonica*, **10**: 671-677.

Braga-Neto R, Luizão RCC, Magnusson WE, Zuquim G, Castilho CV. 2008. Leaf litter fungi in a Central Amazonian forest: the influence of rainfall, soil and topography on the distribution of fruiting bodies, *Biodiversity and Conservation*, **17**: 2701–2712.

Combes C. 2001. The ecology and evolution of intimate interactions. University of Chicago Press, Chicago. 552 p.

Combes C. 2005. The art of being a parasite. The University of Chicago Press, Chicago. 291 pp.

Evans CH. 1974. Natural control of arthropods, with special reference to ants (Formicidae) by fungi in the tropical high forest of Ghana. *Journal of Applied Ecology*. **11**: 37- 49.

Evans HC., Samson RA. 1982. *Cordyceps* species and their anamorph pathogenic on ants (Formicidae) in tropical forest ecosystems. I. The *Cephalotes* (Myrmicinae) complex. *Transactions of the British Mycological Society*. **79**: 431–453.

Evans CH, Samson RA. 1984. *Cordyceps* species and their anamorphs pathogenic of ants (Formicidae) in tropical forest ecosystems II. The *Camponotus* (Formicinae) complex. *Transactions of British Mycological Society*. **82**: 127- 150.

Fittkau EJ, Klinge H. 1973. On biomass and trophic structure of the central Amazonian rain forest ecosystem. *Biotropica*, **5**: 2-14.

Folgarait PJ. 1998. Ant biodiversity and its relationship to ecosystem functioning: a review. *Biodiversity and Conservation*, **7**: 1221-1244.

- Hudson P.J. 1992. Do parasites make prey vulnerable to predation? Red grouse and parasites. *Journal of Animal Ecology* **61**: 681–692.
- Hudson PJ, Dobson AP, Lafferty KD. 2006. Is a healthy ecosystem one that is rich in parasites? *Trends in Ecology & Evolution*. **21**: 381-385.
- Hughes L, Westoby, M. 1990. Removal rates of seeds adapted for dispersal by ants. *Ecology*. **71**: 138-148.
- Hughes DP, Evans HC, Hywel-Jones N, Boomsma JJ, Armitage SAO. 2009. Novel fungal disease in complex leaf-cutting ant societies. *Ecological Entomology*. **34**: 214–220.
- Hughes, DP, Evans HC, Hywel-Jones N., Boomsma JJ, Armitage, SAO. 2009. Novel fungal disease in complex leaf-cutting ant societies. *Ecological Entomology*. **34**: 214–220.
- Marcogliese D. 2002. Food webs and the transmission of parasites to marine fish. *Parasitology*. **124**: 83–99.
- Moore J. 2002. *Parasites and the Behavior of Animals*, Oxford University Press. 338 p.
- Packer C, Holt RD, Hudson PJ, Lafferty KD, Dobson AP. 2003. Keeping the herds healthy and alert: implications of predator control for infectious disease. *Ecology Letters*. **6**: 797–802.
- Pontoppidan MB, Himaman W, Hywel-Jones NL, Boomsma JJ, Hughes DP. 2009. Graveyards on the move: the spatio-temporal distribution of dead *Ophiocordyceps*-infected ants. *PLoS ONE* **4**.
- Sung GH, Hywel-Jones NL, Sung JM, Luangsa-ard JJ, Shrestha B, Spatafora JW. 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology*. **57**: 5–59.

Thaler JS, Findantsef A, Duffey SS, Bostock RM. 1999. Trade offs in plant defense against pathogens and herbivores: a field demonstration of chemical elicitors and induced resistance. *Journal of Chemical Ecology*. **25**: 1597–1609.

Underwood E, Fisher B. 2006. The role of ants in conservation monitoring: If, when, and how. *Biological Conservation*. **132**: 166-182.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

Avaliar diferenças no padrão de infecção de *Ophiocordyceps unilateralis sensu lato* em formigas do gênero *Camponotus* em três áreas da Amazônia: Reserva Ducke (AM), Estação Ecológica de Maracá (RR) e Parque Nacional do Viruá (RR).

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar o número de infecções por *Ophiocordyceps unilateralis sensu lato*, em formigas do gênero *Camponotus* entre os períodos seco e chuvoso em uma área de floresta ombrófila densa da Amazônia Central (Reserva Ducke - AM);
- Comparar a taxa de infecção desta área com outras duas áreas da Amazônia, que incluem um mosaico de floresta densa, savana fechada e savana aberta (Parque Nacional do Viruá - RR) e uma floresta semi-descídua (Estação Ecológica de Maracá - RR);
- Realizar um levantamento de espécies de formigas do gênero *Camponotus* infectadas por *Ophiocordyceps unilateralis s.l.*;
- Levantar o grau de hiperparasitismo de outros fungos sobre *O. unilateralis s.l.*;
- Investigar se há influência na porcentagem de argila no solo com o número de infecções ocorrentes pelo fungo nas formigas;
- Comparar esporos e a germinação de alguns fungos para verificar se os indivíduos com características de *O. unilateralis* representam na realidade mais de uma espécie e recolher material para posterior estudo taxonômico e biogeográfico de *Ophiocordyceps*.

## HIPÓTESES

**- *Ophiocordyceps unilateralis* s.l. respondem positivamente ao regime de chuvas;**

Os fungos em geral, respondem positivamente à umidade, porém em graus diferentes de crescimento, e no caso dos fungos parasitas, em diferentes taxas de infecção.

**- Existe diferença no número de infecção entre os três locais de coleta: Reserva Ducke, Maracá e Viruá;**

Em locais distantes latitudinalmente e com estrutura de vegetação diferenciada, é esperado que exista uma diferença no padrão de infecção causado por *Ophiocordyceps unilateralis* em *Camponotus*.

**- Fungos *Ophiocordyceps* são atacados por outros fungos, chamados de Hiperparasitas;**

Em locais quentes e úmidos como a Amazônia, é esperado que haja uma alta taxa de hiperparasitismo, visto que fungos possuem o ponto ótimo de crescimento em situações como estas.

**- Tipo de solo pode influenciar no crescimento de fungos;**

Fungos de solo sofrem influência do tipo de solo em que habitam, porém para fungos *Ophiocordyceps* essa influência ainda não é conhecida.

**- Morfologia dos esporos é um dos principais caracteres na diferenciação e identificação de espécies do gênero *Ophiocordyceps*;**

*Ophiocordyceps unilateralis* são fungos ainda com taxonomia não esclarecida, sendo esperado que haja diferentes tipos de esporos nos fungos que atacam formigas *Camponotus*.



CAPÍTULO ÚNICO

**Variação temporal e espacial de infecção de *Ophiocordyceps unilateralis sensu lato* em *Camponotus* em três áreas da Amazônia**

João Paulo Machado de Araújo<sup>1</sup>, Fabrício Beggiato Baccaro<sup>2</sup>, Thierry Ray Jehlen Gasnier<sup>1</sup>, Ricardo Braga-Neto<sup>2</sup>, Harry C. Evans<sup>3</sup>, David Peter Hughes<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica, Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, Brasil

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, Amazonas, Brasil

<sup>3</sup> CAB International, E-UK, Egham, Surrey, United Kingdom

<sup>4</sup> Department of Entomology and Department of Biology, Penn State University, University Park, Pennsylvania, United States of America

Endereço eletrônico:

JPMA: joaofungo@gmail.com

FBB: baccaro@inpa.gov.br

TRJG: tgasnier@ufam.edu.br

RBN: saci007@gmail.com

HCE: h.evans@cabi.org

DPH: dph14@psu.edu

## INTRODUÇÃO

Os principais fungos entomopatogênicos pertencem aos gêneros *Cordyceps* Fr. (1818) (Ascomycota, Hypocreales) e afins (Evans, 1982; Sung *et al.*, 2007). Existem pelo menos 400 espécies descritas destes gêneros infectando uma enorme quantidade de espécies de artrópodes incluindo, nove ordens de insetos, aranhas e também outros fungos (Hughes *et al.*, 2009). Infecções de *Cordyceps* e gêneros afins são altamente virulentas e matam seus hospedeiros para o desenvolvimento de hifas e posteriormente de corpos de frutificação aéreos, por onde os esporos são dispersados. Estes fungos podem ter uma grande influência nas comunidades dos seus hospedeiros (Evans, 1984), entretanto, faltam estudos básicos sobre a variação espacial e temporal das infestações para uma melhor compreensão desta relação e de suas consequências ecológicas.

Segundo Evans (1974) e Evans e Samson (1982, 1984), alguns *Cordyceps* spp. (atualmente *Ophiocordyceps* Petch (1931), ver Sung *et al.*, 2007) aparentemente são parasitas obrigatórios de formigas, possivelmente com alta especificidade entre parasitas e hospedeiros. No entanto, o grau de especificidade ainda não pode ser estabelecido devido à dificuldade na identificação dos fungos. A taxonomia de *Ophiocordyceps unilateralis* (Tul.) Petch 1931, (Ascomycota, Hypocreales) ainda não está clara (Evans *et al.*, 2011), pois a espécie-tipo parecia ser imatura e as principais características morfológicas – ascomata, asco e ascósporos - (somente observados no estágio maduro) não foram incluídas na descrição original (Tulasne & Tulasne, 1865). Se cada espécie de formiga da tribo Camponotini for atacada por uma espécie diferente de *Ophiocordyceps*, como sugerem Evans *et al.* (2011), pode haver dezenas de novas espécies de fungos ainda não descritas, muitas das quais com as características morfológicas atualmente atribuídas a *O. unilateralis*. Serão necessários estudos das características micro-morfológicas dos esporos do fungo e da sua forma de germinação para uma melhor compreensão da relação entre estes fungos e seus hospedeiros.

As formigas são frequentemente citadas como agentes importantes nos ecossistemas de florestas tropicais (Fittkau & Klinge, 1973; Folgarait, 1998; Hughes & Westoby, 1990; Underwood & Fisher, 2006), tornando esses fungos entomopatogênicos, potenciais agentes no controle natural de populações nos ecossistemas (Evans, 1974). Apesar da importância ecológica destes fungos, poucos trabalhos foram feitos sobre a dinâmica temporal e distribuição espacial das infecções (Sanjuán *et al.*, 2001 e Pontoppidan *et al.*, 2009).

Sanjuán *et al.*, (2001) coletaram *Ophiocordyceps* na Amazônia colombiana, encontrando 868 specimens, sendo 207 e 661 nas épocas seca e chuvosa, respectivamente. Em ambos os períodos, foram encontradas quatro espécies de *Ophiocordyceps* parasitando formigas (*Ophiocordyceps unilateralis*, *O. australis* (Speg.) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora 2007, *O. kniphofioides* var. *ponerinarum* (H.C. Evans & Samson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora 2007, e *O. lloydii* var. *binata* (H.C. Evans & Samson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora 2007 (Ascomycota, Hypocreales). Pontoppidan *et al.* (2009) realizaram coletas na Tailândia em dois períodos, 2006 e 2007, encontrando diferenças entre eles. Algumas unidades amostrais (transectos e parcelas) tiveram um pequeno crescimento ou diminuição de um ano para o outro. Esta variação, pode ser devido diretamente à variação de microclima, e indiretamente pela ação de insetos e microorganismos que colonizam as formigas mortas nessas condições.

Outro estudo, realizado por Hawkes *et al.* 2011, ao longo de quatro anos, mostrou que fungos de solo, foram altamente sensíveis às chuvas se compararmos as taxas de precipitação intra e inter-anuais, levando a alterações na abundância e composição das comunidades estudadas. Isso quer dizer que, os fungos não só responderam as variações entre os anos, mas que também houve respostas rápidas às chuvas esporádicas. Entre os fatores que potencialmente podem influenciar a composição da comunidade microbiana, o teor de água no solo é particularmente importante (Sylvia *et al.*, 1999). Na Amazônia, ocorrem áreas de baixio com solo arenoso e úmido e áreas de platô com solo mais argiloso e seco (Ribeiro *et al.*1999). Porém, ainda é desconhecido se há influência do solo na interação entre *Ophiocordyceps* – formigas.

Segundo Harrison e Cornell (2008), em estudos de grande escala, a riqueza de espécies pode ser fortemente afetada por influências em meso e micro-escala, tais como dispersão, extinção local e heterogeneidade espacial. Estudos, como os realizados nos moldes do programa PPBio (Gentry 1982, Magnusson *et al.* 2005), formam uma ligação entre os processos de grande escala (regional) e os processos em pequena escala (local), minimizando estes possíveis efeitos negativos. Estudos realizados dentro deste formato permitem a comparação entre áreas relativamente distantes, a fim de se comparar a diversidade, abundância e aspectos da biologia dos fungos entomopatogênicos entre as áreas coletadas, nos revelando também, particularidades de cada local.

Existem evidências que o padrão de distribuição espacial dos *Ophiocordyceps* é agregado em micro escala (até 10 m<sup>2</sup>) (Pontoppidan *et al.* 2009), mas pouco se conhece da distribuição espacial desses fungos em escalas maiores bem como sua possível associação com fa-

tores ambientais. Andrade (1980) coletou *Ophiocordyceps* do complexo *unilateralis* que atacam formigas na Amazônia brasileira, sendo encontrado um número alto de infecções (cerca de 3.500 indivíduos infectados). Na Amazônia brasileira, esses dados de infecção são desconhecidos, assim como as espécies de *Camponotus* Mayr (1861) (Hymenoptera, Formicinae) infectadas. As perspectivas de se encontrar uma diversidade enorme desses fungos na Amazônia são altas, visto que, as condições de alta umidade e temperatura por longos períodos do ano são pré-requisitos para as infecções fúngicas (Evans, 1974).

Os fungos entomopatogênicos, como os *Ophiocordyceps*, podem ser infectados por outros fungos, chamados de hiperparasitas. Sendo que estes, podem desempenhar um papel crucial no controle da interação parasita-hospedeiro, se estes, estiverem estabelecidos com sucesso nesta comunidade (Morozov *et al.* 2007, Andersen *et al.* 2012).

Os objetivos deste trabalho foram, a) comparar o número de infecções por *Ophiocordyceps unilateralis sensu lato*, em formigas do gênero *Camponotus* entre os períodos seco e chuvoso em uma área de floresta ombrófila densa da Amazônia central, (Reserva Ducke - AM); b) comparar a taxa de infecção desta área com outras duas áreas da Amazônia, que incluem um mosaico de floresta densa, savana fechada e savana aberta (Parque Nacional do Viruá - RR) e uma floresta semi-descídua (Estação Ecológica de Maracá - RR). C) realizar um levantamento de espécies de formigas do gênero *Camponotus* infectadas por *Ophiocordyceps unilateralis s.l.*, d) levantar o grau de hiperparasitismo de outros fungos sobre *O. unilateralis s.l.*, e) investigar se há influência na porcentagem de argila no solo com o número de infecções ocorrentes pelo fungo nas formigas, f) Comparar esporos e a germinação de alguns fungos para verificar se os indivíduos com características de *O. unilateralis* representam na realidade mais de uma espécie.

## MATERIAL E MÉTODOS

*Área de estudo* - As coletas foram realizadas em três sítios de pesquisa do Programa de Pesquisas em Biodiversidade (PPBio / MCT) instalados na: Reserva Ducke (AM), Estação Ecológica de Maracá (RR) e Parque Nacional do Viruá (RR). As três áreas visitadas no presente estudo cobrem um gradiente latitudinal e abrangem uma heterogeneidade ambiental ampla, incluindo áreas de savanas abertas e fechadas, florestas densas e áreas sujeitas a diferentes regimes de inundação (Baccaro *et al.*, 2012). Os dados de granulometria do solo foram obtidos pelo site do PPBio (<http://ppbio.inpa.gov.br/>).

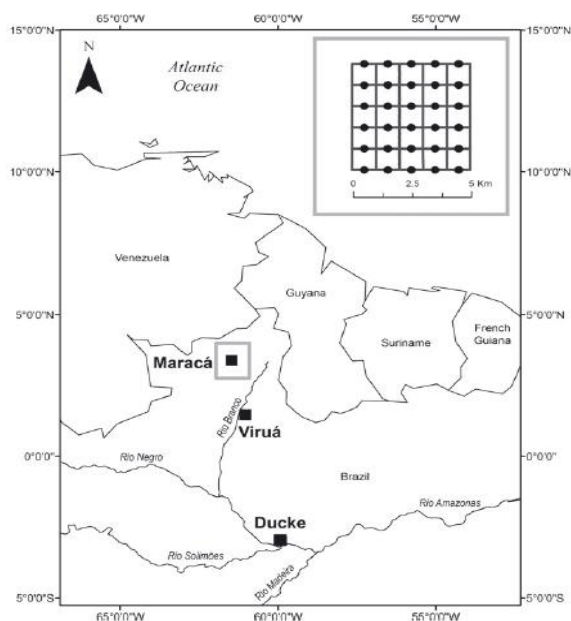


Fig. 1 – Mapa das áreas de estudo. Quadrados representam as três áreas amostradas. No detalhe, os círculos pretos representam os transectos de 250m espacialmente arranjados numa área de 5 x 5 km. Fonte: Baccaro *et al.*, 2012.

*Reserva Ducke* - A Reserva Rucke possui aproximadamente 10.000 ha, localizada a Nordeste de Manaus (02°55'S, 59°59'W), no km 26 da Rodovia Manaus - Itacoatiara (AM - 010). Sendo composta por florestas de terra-firme, representadas por formações de platô, vertente e baixo, e também campinaranas. As florestas de platô ocorrem nas áreas mais altas, sobre solo argiloso, com dossel de 35 a 40 m (árvores emergentes > 45 m) (Ribeiro *et al.* 1999). As florestas de vertente representam a transição entre o platô e

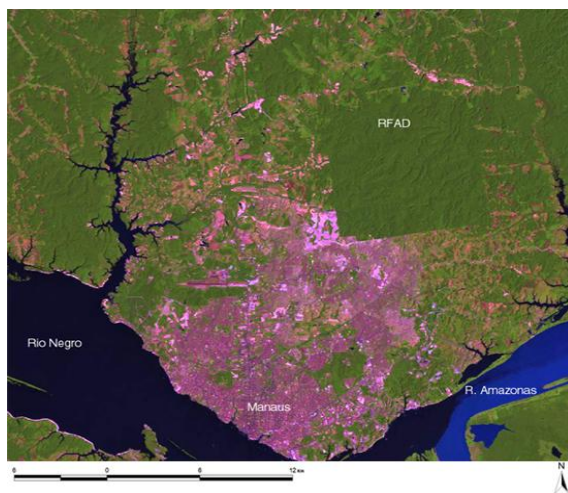


Fig. 2: Mapa da região de Manaus. Fonte: <http://ppbio.inpa.gov.br/Port/inventarios/nrrr/ducke>.

o baixio, ocorrendo sobre terreno inclinado, com solos variando de argilosos a arenosos, e com dossel entre 25 e 35 m. As florestas de baixio ocorrem nas planícies aluviais, sobre solo arenoso, onde ocorrem inundações periódicas na estação chuvosa, com dossel entre 20 e 35 m, com muitas árvores com raízes superficiais. O sub-bosque das florestas de baixio é mais denso que o de platô, sendo abundante em palmeiras acaules (Ribeiro *et al.* 1999). A temperatura média é de aproximadamente 26°C, variando pouco ao longo do ano. A estação seca (precipitação mensal < 100 mm concentra-se entre Julho e Setembro (Marques Filho *et al.* 1981).

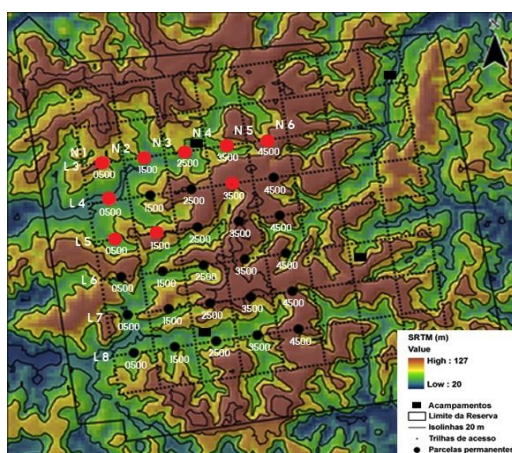


Fig. 3 Parcelas do PPBio na Reserva Ducke. Os pontos vermelhos correspondem as parcelas coletadas. fonte: <http://ppbio.inpa.gov.br/Port/inventarios/ducke/pterrestr/duckesrt>

*Estação Ecológica de Maracá.*- A Estação Ecológica de Maracá (ESEC Maracá) está a 135 km de Boa Vista, localizada em uma ilha no Rio Uraricoera no Estado de Roraima, na confluência de savanas e Florestas Amazônicas (3°22'N, 61°27'W). A ESEC Maracá possui uma área total de 103.976,48 ha e é formada por um arquipélago fluvial com mais de duzentas ilhas e ilhotas. O terreno é plano (elevação de 55-83 m acima do nível do mar), com pequenos riachos intermitentes (Baccaro *et al.*, 2012). A ilha principal, chamada Ilha de Maracá (onde foram feitas as coletas), tem formato triangular e cobre uma área aproximada de 830km<sup>2</sup>.



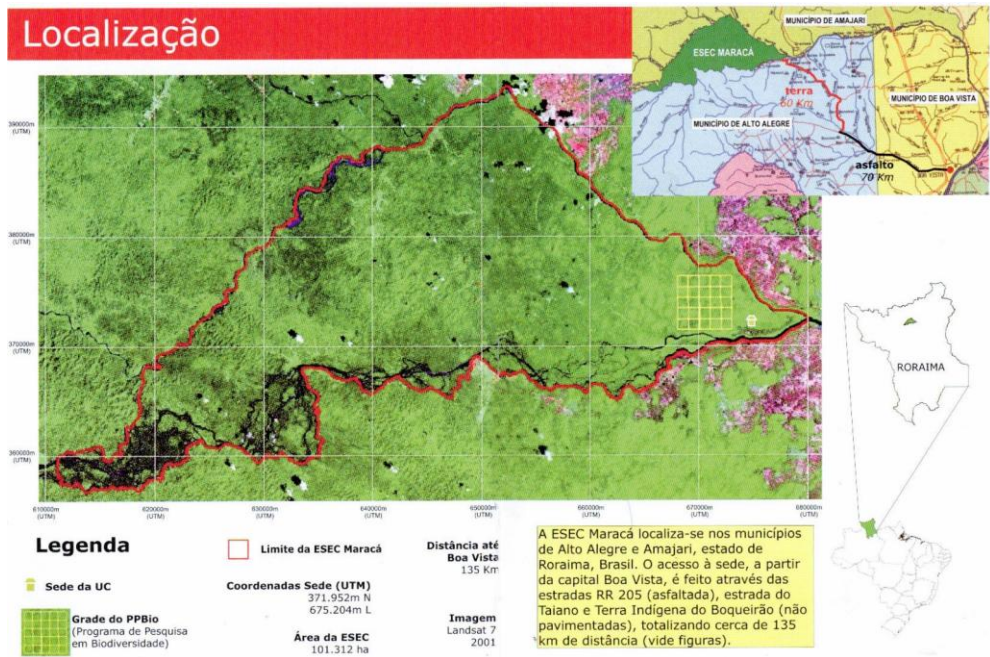


Fig. 4: Mapa da Estação Ecológica de Maracá. Detalhe da grade das parcelas em Amarelo (Aproximação abaixo). Fonte: <http://esecmaracarr.blogspot.com/p/esec-maraca.html>

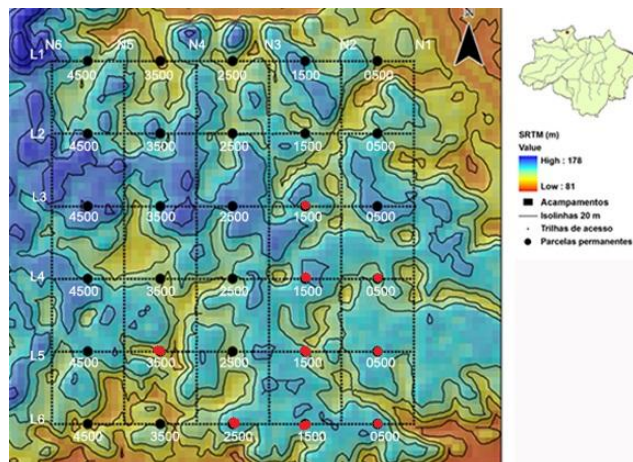


Fig.5: Mapa da ESEC Maracá. Os pontos vermelhos correspondem as áreas coletadas. Fonte: <http://ppbio.inpa.gov.br/Port/inventarios/nrrr/maraca/>

*Parque Nacional do Viruá* - O Parque Nacional do Viruá (elevação de 48–130 m acima do nível do mar) tem mais de 227.000 ha e é localizado no município de Caracaraí (RR). O solo é predominantemente arenoso, pobremente drenado, sendo as inundações causadas em sua maior parte por chuvas locais. O clima é equatorial (quente e úmido), apresentando pequena estação seca, com maiores quedas pluviométricas no outono. Na sua parte Sul, a área compreende uma vasta superfície praticamente plana, com predomínio de solos arenosos e mal drenados, com grande quantidade de lagoas. Na parte Norte do Parque, ocorrem morros residuais com altitudes modestas. Ao longo da extensão Oeste, delimitada pelo Rio Branco, há ocorrência de planícies aluvionares inundáveis, situação observada também na porção Sul, ao longo do Rio Anauá (<http://ppbio.inpa.gov.br/>).

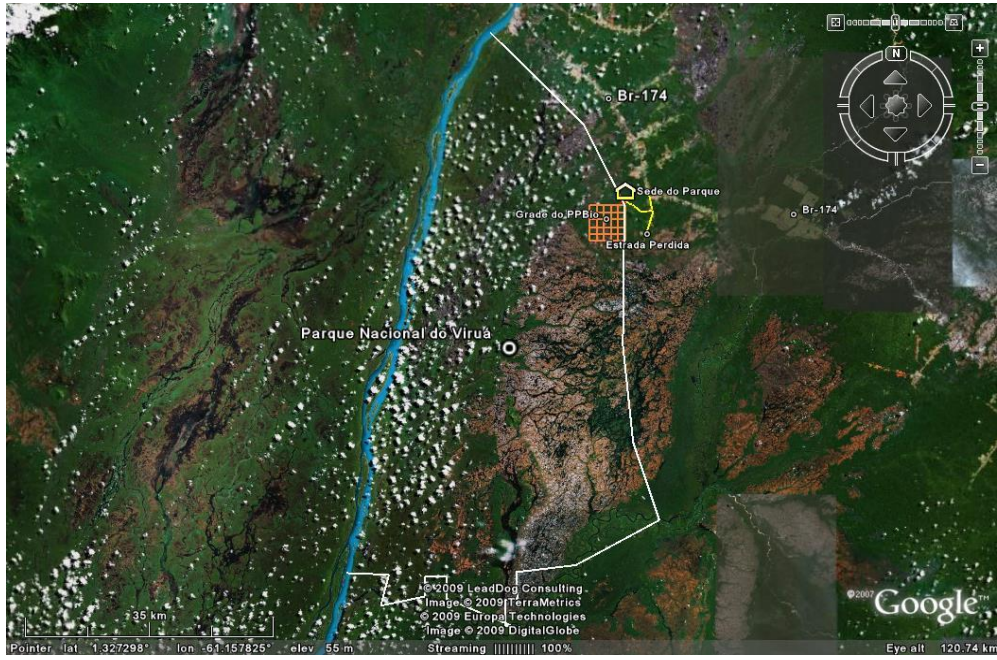


Fig 6: Foto de satélite do Parque Nacional do Viruá (detalhe da grade em laranja, abaixo). Foto: Juliana Schietti.

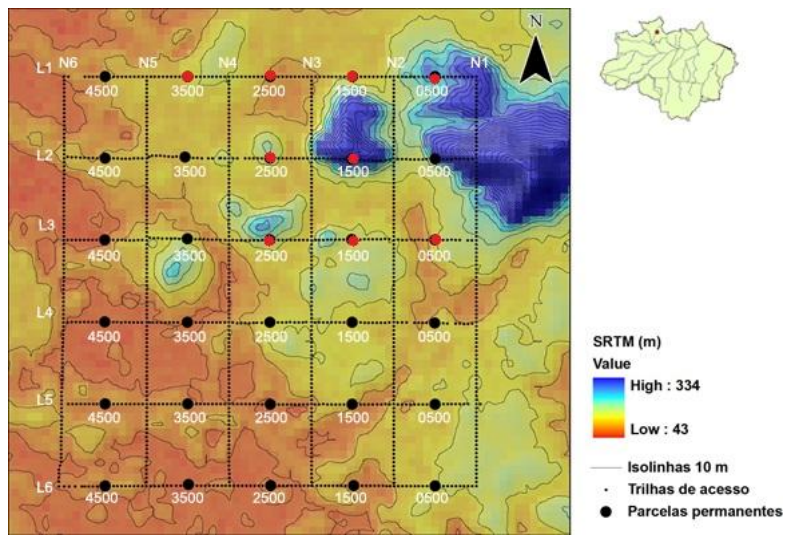


Fig.7: Mapa da grade do PPBio (Parque Nacional do Viruá). Os pontos vermelhos correspondem as áreas coletadas. Fonte: <http://uleinpa.blogspot.com/2009/02/conheca-o-parque-nacional-do-virua-em.html>

*Coleta das formigas e fungos.*- Nas 3 áreas visitadas (Reserva Ducke, Maracá e Viruá) 9 parcelas terrestres da grade de trilhas do PPBio foram utilizadas para as coletas. Os transectos fazem parte das Parcelas Permanentes, criadas pelo Projeto Ecológico de Longa Duração (PELD / CNPq), e possibilitam o estudo integrado e o monitoramento da distribuição de organismos de diferentes grupos biológicos em mesoescala e larga escalas. Este estudo seguiu a metodologia RAPELD (Magnusson *et al.* 2005), onde cada unidade amostral (parcela) foi representada por um transecto de 250 m de extensão, com 2 m de largura, totalizando 500 m<sup>2</sup> amostrados. O maior eixo da parcela seguiu a curva de nível do terreno, reduzindo a variação dos fatores correlacionados espacialmente com a altitude em cada parcela. A distribuição espacial das parcelas foi regular, sendo 1 km a menor distância entre elas.

As coletas na Reserva Ducke foram feitas (parcelas com círculo vermelho na fig.2) em duas épocas distintas, uma na época seca (Julho e Agosto de 2011) e outra na época chuvosa (Janeiro de 2012). Em cada sítio de pesquisa situado em Roraima, nove parcelas foram amostradas no mês de Fevereiro de 2012 (época seca). Todas as formigas infectadas foram registradas e as que apresentavam fungo com corpo de frutificação maduro, foram coletadas para identificação. Todas as formigas infectadas de espécies diferentes apresentando fungo maduro ou não, bem como indivíduos de todas as espécies de formigas não-infectadas também foram coletadas. As formigas foram alfinetadas conforme metodologia padrão, sendo as espécies identificadas. Todas as amostras coletadas foram mantidas em caixa entomológica com sílica gel, para tirar toda a umidade da coleção e evitar o crescimento de hiperparasitas. As coletas foram realizadas entre 8:00 h e 16:00 h, sendo amostradas em média três parcelas por dia.

As formigas infectadas foram classificadas em quatro grupos: anamorfo, maduro, velho e hiperparasitado. O estágio chamado de Anamorfo representa a fase inicial do crescimento do fungo na formiga. O estágio maduro refere-se àqueles em que o fungo está pronto para liberar os esporos. Velhos foram considerados aqueles encontrados secos, danificados pelo tempo devido a idade, ou somente um vestígio típico da infecção como, por exemplo, somente a cabeça encontrada mordendo a folha. Aqueles considerados como Hiperparasitados são aqueles que o fungo encontrava-se com parasita, o que normalmente ocorre em fungos já velhos, tornando-os estéreis (Andersen *et al.* 2012). Para a obtenção dos esporos e suas estruturas de infecção (capiliconídia), os fungos classificados como maduros, foram afixados na parte superior de Placas de Petri contendo a mistura Ágar – Água. Esse método de coleta dos esporos foi utilizado, após i-

númeras tentativas feitas diretamente nas lâminas de microscopia, sem sucesso. Os fungos liberavam os esporos, que caíam na mistura abaixo, entre 24h e 72h, sendo que em alguns espécimes não houve liberação, mesmo estes, estando maduros.

Os insetos infectados com o fungo foram depositados na Coleção Entomológica do INPA, e alguns deles enviados para a Universidade do Estado da Pennsylvania (Pennsylvania State University) para estudos moleculares e taxonômicos posteriores.

*Análise de dados.*- Comparamos o número de formigas infectadas em cada estágio de desenvolvimento do fungo entre as estações secas e chuvosas usando o teste de Wilcoxon pareado (W), onde cada parcela representou um par de observações. As quantidades de formigas infectadas entre os sítios de pesquisas foram comparadas com o teste de Kruskal–Wallis, da mesma forma que no primeiro teste investigamos diferenças entre o número de formigas infectadas em cada estágio de desenvolvimento do fungo. Tanto o teste de Wilcoxon como de Kruskal–Wallis possibilitam a comparação de médias quando a distribuição dos dados não segue distribuição normal, como neste caso.

Usamos regressões simples para investigar as relações entre a prevalência de infecção (número de formigas infectadas) por estágio de desenvolvimento do fungo e a porcentagem relativa de areia no solo por sítio de coleta. A porcentagem relativa de areia do solo é uma medida indireta e estacionária da umidade. Áreas com solos mais arenosos normalmente estão situadas nos baixios que são mais úmidos, comparados com os platôs. As análises foram realizadas com o programa estatístico R (R Development Core Team 2011).

## RESULTADOS

Durante o estudo foram encontradas 17 espécies/ morfoespécies de formigas do gênero *Camponotus* infectadas. O total de formigas infectadas por *Ophiocordyceps unilateralis sensu lato* encontradas na Reserva Ducke foi de 59 na época seca e 177 na época chuvosa, 136 em Viruá e 52 em Maracá, totalizando 424, sendo as duas últimas localidades amostradas durante o período seco. Outras espécies de fungos do gênero *Ophiocordyceps* atacando formigas também foram encontradas e coletadas, porém não foram contabilizadas para o presente estudo, sendo estas: *O. australis*, *O. kniphofioides* var. *ponerinarum* e var. *dolichoderi* (H. C. Evans & Samson) G.H. Sung, J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora, *O. lloydii* var. *lloydii* (H.C. Evans & Samson) G.H. Sung,



J.M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora 2007) (esta última, somente em Maracá e em Vi-ruá).

Na época chuvosa o número de fungos maduros produtores de esporos foi de 44, contra apenas 8 na época seca ( $W = 11$ ;  $p = 0,008$  - figura 8). O número de formigas infectadas pelo fungo foi significativamente superior no período úmido comparado com o período seco ( $W = 5$ ;  $p = 0,002$ ). A quantidade de *Camponotus* infectadas com o fungo ativo (maduro) ou em crescimento (anamórfico) foi aproximadamente sete vezes maior na estação chuvosa, comparado com o período seco ( $W = 4,5$ ;  $p = 0,001$ ). Porém, não encontramos relação de granulometria (% de areia no solo) com as infecções causadas pelo fungo ( $P > 0,05$  para todos os estágios).

Foi encontrado um número semelhante de formigas infectadas categorizadas como velhas ( $W = 30$ ;  $p = 0,297$ ) e hiperparasitadas ( $W = 26,5$ ;  $p = 0,171$ ). Encontramos 39 e 41 fungos no estágio velho e 5 e 6 hiperparasitados, nas épocas seca e chuvosa, respectivamente.

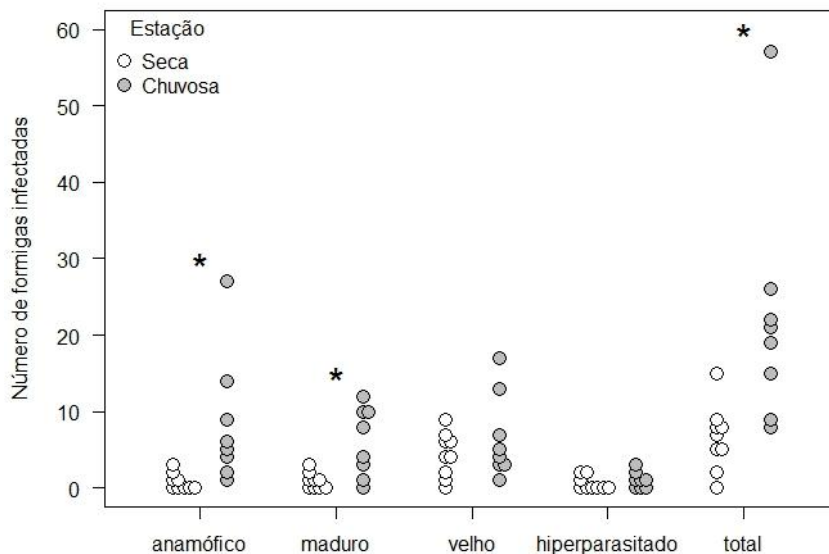


Figura 8: Número de formigas de gênero *Camponotus* infectadas em cada estágio de desenvolvimento do parasita nas estações seca (2011) e chuvosa (2012), na Reserva Ducke, AM. Os asteriscos representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre a estação seca e chuvosa de acordo com teste de Wilcoxon pareado.

O número de espécies de *Camponotus* infectadas pelo fungo *Ophiocordyceps unilateralis s.l.* na Reserva Ducke foi significativamente distinta entre os dois períodos

estudados. Assim como houve uma proporção de três vezes mais registros de infecção no período chuvoso, também houve um número três vezes maior de espécies infectadas na Reserva Ducke no mesmo período. Foram encontradas na época chuvosa 15 espécies/ morfoespécies de formigas infectadas e na época seca, apenas 5 (Tabela I). Houve também diferença no número de espécies encontradas infectadas entre as três áreas na época seca (Tabela II). A espécie *Camponotus atriceps* foi a mais frequente, sendo encontrada nas três áreas de estudo, seguida por *C. bidens*. Algumas formigas foram coletadas apenas uma vez como *C. canescens*, *C. ager*, *C. apicalis* e *C. cf. rapax*.

**Tabela I.** Espécies de formigas infectadas por *Ophiocordyceps unilateralis* s.l. na Reserva Ducke.

<b>Espécie</b>	<b>Época seca</b>	<b>Época chuvosa</b>
<i>Camponotus ager</i>		X
<i>Camponotus apicalis</i>		X
<i>Camponotus atriceps</i>	X	
<i>Camponotus bidens</i>		X
<i>Camponotus canescens</i>	X	
<i>Camponotus cf. femoratus</i>		X
<i>Camponotus chantifex</i>		X
<i>Camponotus crassus</i>	X	
<i>Camponotus nidulans</i>		X
<i>Camponotus prox. helleri</i>		X
<i>Camponotus prox. sexgutattus</i>		X
<i>Camponotus senex</i>		X
<i>Camponotus sexgutattus</i>	X	
<i>Camponotus sp.</i>	X	
<i>Camponotus sp1</i>		X
<i>Camponotus sp2</i>		X
<i>Camponotus sp3</i>		X

A quantidade de formigas infectadas por transecto foi semelhante entre as três áreas de coleta (Figura 2). Embora o número total de formigas infectadas tenha sido um pouco superior no Parque Nacional do Viruá (fig. 9), a diferença não foi estatisticamente significativa (Teste KW,  $P > 0,05$  para todas as comparações por fase do desenvolvimento e total). Em todos os transectos havia uma tendência a encontrarmos as formigas infectadas espacialmente agrupadas em maior ou menor grau, entretanto, foram encontradas formigas infectadas em todos os transectos das três áreas, o que demonstra que na escala do grid a ocorrência está bem distribuída.

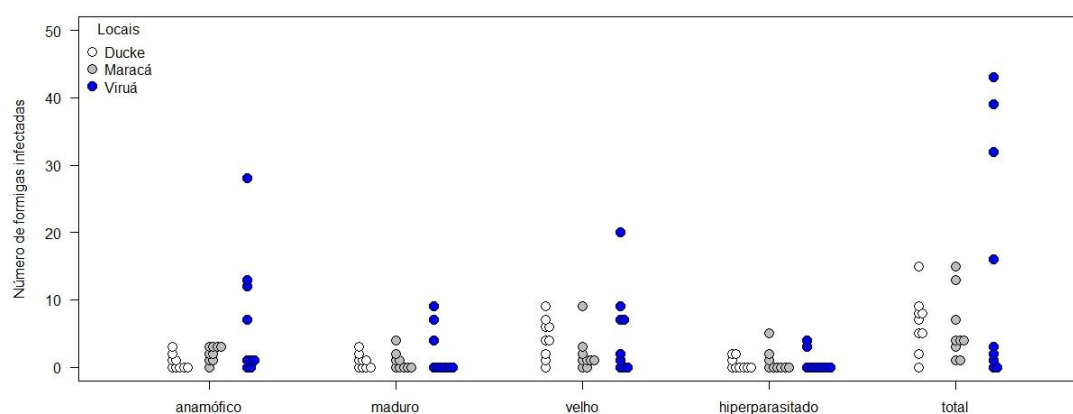


Figura 9. Número de *Camponotus* infectadas em cada estágio de desenvolvimento do parasita entre três sítios de pesquisa: Reserva Ducke, situada no Amazonas e ESEC Maracá e ParNa do Viruá, ambos situados no estado de Roraima (Época Seca).

Tabela II - Espécies de formigas encontradas infectadas por *Ophiocordyceps unilateralis* s.l.

RESERVA DUCKE	MARACÁ	VIRUÁ
<i>Camponotus atriceps</i>	<i>Camponotus atriceps</i>	<i>Camponotus atriceps</i>
<i>Camponotus canescens</i>	<i>Camponotus senex</i>	<i>Camponotus</i> cf. <i>rapax</i> (Rainha)
<i>Camponotus crassus</i>	<i>Camponotus</i> sp.5	<i>Camponotus chantifex</i>
<i>Camponotus sexgutattus</i>	<i>Camponotus</i> sp.6	
<i>Camponotus</i> sp. 1	<i>Camponotus</i> sp.7	
<i>Camponotus</i> sp. 2		
<i>Camponotus</i> sp. 3		



Os esporos que foram coletados em placas de Petri (Ágar-água) foram observados até sua germinação, que ocorre normalmente entre 24h até 72h (Harry Evans, comunicação pessoal), quando estes não germinavam, eram então fotografados e descartados. Foram encontradas diferenças morfológicas entre os fungos que atacavam espécies distintas de *Camponotus*. As principais diferenças encontradas foram em relação aos esporos, sendo o tamanho e formato os principais caracteres observados. Após a germinação, notou-se também, grande diferença entre os capiliconídias de cada espécie (Fig. 10 e Tabela III).

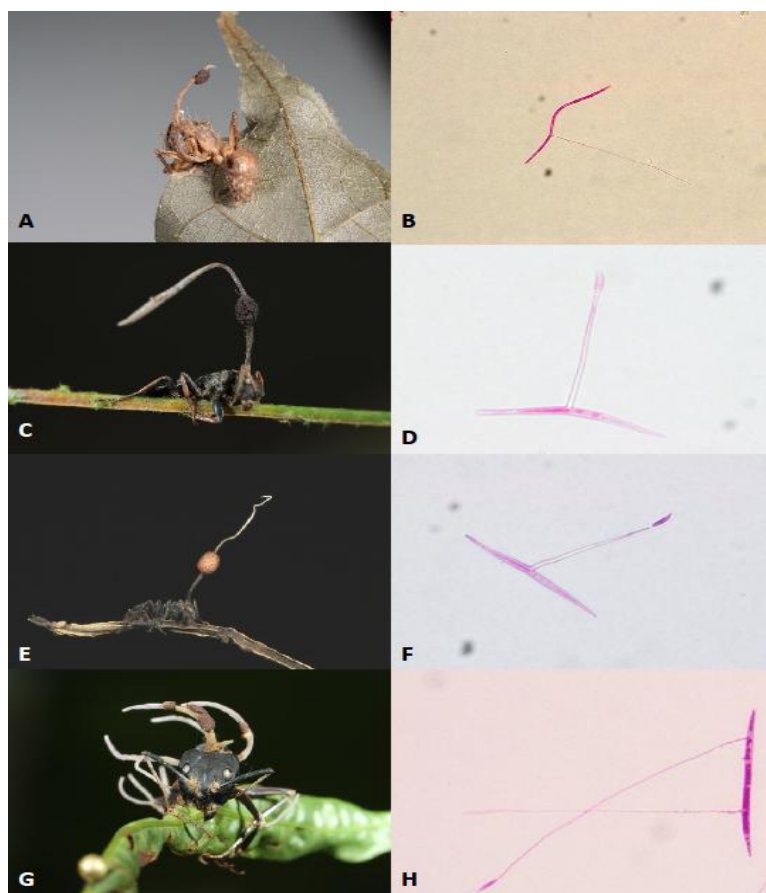


Fig. 10: Espécies de *Camponotus* infectadas por *Ophiocordyceps* e seus esporos com germinação de capiliconídia. (A - B) - *Camponotus atriceps*, (C - D) - *Camponotus bidens*, (E - F) - *Camponotus senex*, (G - H) - *Camponotus* sp.1.

**Tabela III: Comparação de esporo entre algumas das Morfoespécies de fungos coletadas (RD – Reserva Ducke; V – Parque Nacional do Viruá, M – Estação Ecológica de Maracá).**

	HOSPEDEIRO	ASCÓSPOROS		LOCAL
		TAMANHO ( $\mu\text{m}$ )	CAPILICONÍDIA ( $\mu\text{m}$ )	
Morfoespécie 1	<i>C. atriceps</i>	92- 128 x 2,56 - 4,12	129	RD, V, M
Morfoespécie 2	<i>C. senex</i>	71 - 89 x 2,89 - 4,39	66	RD, V, M
Morfoespécie 3	<i>C. bidens</i>	73 - 95 x 2,74 - 4,34	64	RD
Morfoespécie 4	<i>C. sp. 1</i>	65 - 86 x ?	116	V

## DISCUSSÃO

A grande diferença no número de infecções nos estágios anamorfo e maduro entre os períodos seco e chuvoso na Reserva Ducke evidencia a importância da umidade na sobrevivência do esporo e na eficiência da infecção de formigas. A ocorrência de fungos na época seca é um resultado igualmente importante, pois mostra que mesmo nessa época a umidade é suficiente para a manutenção do ciclo de infecções. A relação entre umidade e abundância é comum para muitas espécies de fungos (ex. Lindblad 2001, Braga-Neto *et al.* 2008, Hawkes *et al.* 2011). Braga-Neto *et al.* (2008), realizaram coletas de fungos de serrapilheira em uma área de floresta ombrófila densa na Amazônia Central, e também encontraram uma marcada influência do regime de chuvas na diversidade e abundância desses organismos. Entretanto, ao contrário de outros fungos que utilizam um substrato mais perene, os fungos entomopatogênicos podem ter sua dinâmica mais dependente da manutenção de um ciclo de infecções na época seca. A relação entre umidade e abundância de fungos entomopatogênicos que encontramos corrobora com o descrito em trabalhos anteriores (Luz & Fargues (1997), Fargues & Luz (1998), Arthurs & Thomas (2001), Pontopiddan *et al.* (2009)), entretanto, por ser um fator chave na compreensão da biologia do fungo, ainda precisa ser investigado mais profundamente.

A germinação de capiliconídia somente em Placas de Petri com ágar-água, também indica a necessidade de uma umidade mais alta e constante para a sobrevivência e germinação dos esporos de *Ophiocordyceps unilateralis s.l.* Este fato pode ser decisivo

na infecção de novas formigas já que na seca, essas estruturas, vitais para a infecção do hospedeiro, provavelmente não se formariam. Porém, o fato de termos encontrado fungos anamórficos na fase seca reforça a ideia de uma possível resposta rápida a fatores ambientais (ver Hawkes *et al.* 2011), sendo que chuvas esporádicas podem funcionar como um “gatilho” (“*trigger*”), estimulando o início do crescimento dessas estruturas de infecção (capiliconídia). Sendo assim, um número mesmo que pequeno, mas fundamental de fungos ativos e esporos no ambiente na época seca é mantido.

Encontramos pouca variação no número de fungos categorizados como velhos entre as épocas seca e chuvosa na Reserva Ducke. Isto indica que o número de fungos desta categoria pode ser utilizado como um índice de abundância local de *Ophiocordyceps* em *Camponotus* com menor dependência da variação sazonal para estudos comparativos em avaliações espaciais. Por outro lado, estudos sobre a dinâmica temporal da relação entre hospedeiro e parasitas deveriam utilizar apenas as categorias anamórfico e maduro. Apenas recentemente este tipo de categorização tem sido utilizada em estudos deste fungo (Andersen *et al.* 2012).

A taxa de hiperparasitismo foi inferior a 6%, não representando, aparentemente, um impacto sobre essas populações de fungos. Este resultado, difere completamente do encontrado por Andersen *et al.* (2012) em coleta em uma região da Mata Atlântica em Minas Gerais. Tal estudo encontrou um percentual de 55,4% do total de *Ophiocordyceps* sendo atacados por outros fungos, sendo estes então, responsáveis pela castração destes fungos e diminuindo o impacto destes parasitas nas populações de *Camponotus*.

Apesar das áreas de estudo estarem distantes latitudinalmente umas das outras, implicando em diferenças climáticas, de vegetação e de composição das comunidades de formigas (Souza *et al.* 2012), não houve diferença significativa na infecção de *Camponotus* entre elas. Este resultado não era esperado, principalmente considerando as diferenças na duração da estação seca entre as áreas. Mesmo a Amazônia sendo um ambiente heterogêneo, com áreas de floresta ombrófila densa, floresta semi-descídua, savanas abertas e fechadas (Baccaro *et al.* 2012), a taxa de infecção pode ser relativamente homogênea em grande parte de sua extensão. Seria interessante a comparação da resistência ao dessecamento dos esporos dos fungos entre estas áreas diferentes.

Os esporos são um dos mais importantes caracteres morfológicos para a identificação e descrição de fungos *Cordyceps* e gêneros afins, como *Ophiocordyceps* (Petch 1931, Kobayasi 1939, 1941, 1982, Kepler *et al.* 2011). Sendo assim, comparamos as características dos esporos de *O. unilateralis* que atacavam diferentes espécies de for-

mingas nos três locais amostrados. Os esporos diferiram entre as espécies de formigas infectadas, mas foram similares intra-especificamente, mesmo em áreas distantes (cerca de 800 km). Este resultado corrobora a sugestão de Evans *et al.* (2011), que *Ophiocordyceps unilateralis s.l.* na realidade é um complexo de espécies, havendo necessidade do estudo mais minucioso da morfologia e germinação dos esporos, para assim, separar essas espécies. A variação no tamanho e formato dos esporos, assim como a diferença da formação de capiliconídia, podem também, refletir adaptações para a infecção mais eficiente de seus hospedeiros, com aspectos de vida diferentes entre si. Porém, com os dados disponíveis atualmente, essa afirmação não é possível, havendo necessidade de estudos adicionais neste sentido.

Das 5 espécies encontradas na época seca na Reserva Ducke, apenas 2 foram comuns com as 15 espécies encontradas na época chuvosa. Isto indica que o número de espécies de *Camponotus* infectadas é provavelmente bastante superior às 17 encontradas no total. Não há dados sobre o número total de espécies de *Camponotus* na Reserva Ducke, Maracá e Viruá. O único trabalho realizado para o levantamento das espécies ocorrentes nesses locais foi de Souza *et al.* (2012), que levantou 17 espécies para Reserva Ducke, Maracá e Viruá juntos, mas apenas com base em armadilhas de solo. Porém, formigas do gênero *Camponotus* são espécies predominantemente arbóreas (Holldobler & Wilson, 1990), sendo que a amostragem ideal para este tipo de formiga seria com armadilhas específicas para espécies arbóreas. É bem possível que a maioria, ou mesmo todas as espécies de *Camponotus* sejam parasitadas por este fungo. A provável grande diversidade de fungos que atacam formigas é um indício que esta relação de parasitismo-hospedeiro seja bastante antiga. Estudos moleculares apontam que *Ophiocordyceps unilateralis s.l.*, especiou-se há cerca de 40 milhões de anos atrás, porém o primeiro registro de fungo entomopatogênico data de entre 99 - 105 milhões de anos atrás. Este fóssil não é apenas a mais antiga evidência de fungos parasitas de animais, mas como também continha características morfológicas similares ao estágio anamórfico de *Ophiocordyceps* (*Hirsutella* e *Hymenostilbe*) (Sung *et al.*, 2008). Esse fóssil, tão similar ao anamorfo de *Ophiocordyceps* pode ser um indício de que estes fungos também poderiam estar atacando formigas há muito mais tempo do que se acredita atualmente, sendo que estas, apareceram na Terra há cerca de 120 milhões de anos atrás (Fernández, 2003). Estudos comparados de filogenia dessas espécies crípticas e seus hospedeiros poderão ajudar a entender melhor a evolução desta relação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andersen SB, Gerritsma S, Yusah, KM, Mayntz D, Hywel-Jones, NL, Billen J, Boomsma JJ, Hughes DP. 2009. The life of a dead ant: the expression of an adaptive extended phenotype. *The American Naturalist* **174**: 424–433.
- Andersen SB, Ferrari M, Evans HC, Elliot SL, Boomsma JJ, Hughes DP. 2012. Disease Dynamics in a Specialized Parasite of Ant Societies. *PLoS ONE*. 7(5).
- Andrade C. 1980. Epizootia natural causada por *Cordyceps unilateralis* (Hypocreales, Euascomycetes) em adultos de *Camponotus* sp. (Hymenoptera, Formicidae) na região de Manaus, Amazonas, Brasil, *Acta Amazonica*, **10**: 671-677.
- Arthurs S, Thomas MB. 2001. Effects of temperature and relative humidity on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* in mycosed cadavers of *Schistocerca gregaria*. *Journal of Invertebrate Pathology* **78**: 59–65
- Baccaro FB, Souza JLP, Franklin E, Landeiro VL, Magnusson WE. 2012. Limited effects of dominant ants on assemblage species richness in three Amazon forests, *Ecological Entomology*, **37**: 1 -12.
- Braga-Neto R, Luizão RCC, Magnusson WE, Zuquim G, Castilho CV. 2008. Leaf litter fungi in a Central Amazonian forest: the influence of rainfall, soil and topography on the distribution of fruiting bodies, *Biodiversity and Conservation*, **17**: 2701–2712.
- Chauvel A, Lucas Y, Boulet R. 1987. On the genesis of the soil mantle of the region of Manaus, Central Amazonia, Brazil, *Experientia*, **43**: 234-241.
- Combes, C. 2005. *The Art of Being a Parasite*. Chicago: University of Chicago Press. 280 p.

Evans HC. 1974. Natural control of arthropods, with special reference to ants (Formicidae) by fungi in the tropical high forest of Ghana, *Journal of Applied Ecology*, **11**: 37-49.

Evans HC, Samson. RA. 1982. *Cordyceps* species and their anamorph pathogenic on ants (Formicidae) in tropical forest ecosystems, I, The Cephalotes (Myrmicinae) complex. *Transactions of the British Mycological Society*. **79**, 431–453.

Evans HC, RA Samson. 1984. *Cordyceps* species and their anamorphs pathogenic of ants (Formicidae) in tropical forest ecosystems II, The *Camponotus* (Formicinae) complex. *Transactions of the British Mycological Society*, **82**: 127- 150.

Evans HC, Elliot SL, Hughes DP. 2011. Hidden Diversity Behind the Zombie-Ant Fungus *Ophiocordyceps unilateralis*: Four New Species Described from Carpenter Ants in Minas Gerais, Brazil, *PLoS ONE* **6**: 1-3.

Fargues J, Luz C. 1998. Effects of fluctuating moisture and temperature regimes on sporulation of *Beauveria bassiana* on cadavers of *Rhodnius prolixus*. *Biocontrol Science and Technology* **8**: 323–334.

Fernández, F. 2003. Introducción a las Hormigas de la Región Neotropical. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá, Colombia. 424 p.

Fittkau EJ, Klinge H. 1973. On biomass and trophic structure of the central Amazonian rain forest ecosystem. *Biotropica*, **5**: 2-14.

Folgarait PJ. 1998. Ant biodiversity and its relationship to ecosystem functioning: a review. *Biodiversity and Conservation*, **7**: 1221-1244.

Gentry AH. 1982. Patterns of Neotropical plant species diversity. *Evol. Biol.* **15**:1-84.

Harrison S, Cornell H. 2008. Toward a better understanding of the regional causes of local community richness. *Ecology Letters*, **11**: 969–979.

Hatzipapas P, Kalosaka K, Dara A, Christias C. 2002. Spore germination and appressorium formation in the entomopathogenic *Alternaria alternata*, *Mycological Research*. **106**: 1349–1359.

Hawkes CV, Kivlin SN, Rocca JD, Huguet V, Thomsens MA, Suttle KB. 2011. Fungal Community responses to precipitation. *Global Change Biology*. **17**: 1637-1645.

Hölldobler B, Wilson EO 1990. *The Ants*. Belknap Press of Harvard University Press; 1st edition. 732pp.

Hughes L, Westoby M. 1990. Removal rates of seeds adapted for dispersal by ants. *Ecology* **71**: 138-148.

Hughes DP, Evans HC, Hywel-Jones N, Boomsma JJ, Armitage SAO. 2009. Novel fungal disease in complex leaf-cutting ant societies, *Ecological Entomology*. **34**: 214–220.

Kepler R, Kaitsu Y, Tanaka E, Shimano S, Spatafora, JW. 2011. *Ophiocordyceps pulvinata* sp. nov., a pathogen of ants with a reduced stroma. *Mycoscience*. **52**:39–47.

Kobayasi Y. 1939. On the genus *Cordyceps* and its allies parasitic to Hymenoptera in Japan. *Bulletin of Biogeography Society of Japan*. **9**:271–291

Kobayasi Y. 1941. The genus *Cordyceps* and its allies. *Science Reports of the Tokyo Bunrika Daigaku*. **84**:53–260.

Kobayasi Y. 1982. Keys to the taxa of the genera *Cordyceps* and *Torrubiella*. *Transactions of Mycology Society of Japan*. **23**:329–364

Lindblad I. 2001. Diversity of Poroid and Some Corticoid Wood-Inhabiting Fungi along the Rainfall Gradient in Tropical Forests, Costa Rica, *Journal of Tropical Ecology*. **17**: 353-369.

Luz C, Fargues J. 1997. Temperature and moisture requirements for conidial germination of an isolate of *Beauveria bassiana*, pathogenic to *Rhodnius prolixus*. *Mycopathologia* **138**: 117–125.

Magnusson WE, Lima AP, Luizão R, Luizão F, Costa FRC, Castilho CV, Kinupp VF. 2005. Rapeld: a modification of the Gentry method for biodiversity surveys in long-term ecological research sites. *Biota Neotrop.* **5**, 1–6.

Marques-Filho AO, Ribeiro MNG, Santos JM. 1981. Estudos climatológicos da Reserva Florestal Ducke, Manaus, AM, IV- Precipitação, *Acta Amazonica.* **4**: 759-768.

Morozov AY, Róbin C, Franc A. 2007. A simple model for the dynamics of a host–parasite–hyperparasite interaction, *Journal of Theoretical Biology* **249**: 246–253.

Petch T. 1931. Notes on entomogenous fungi. *Transactions British Mycological Society.* **16**: 55–75.

Pontoppidan M-B, Himaman W, Hywel-Jones NL, Boomsma JJ, Hughes DP. 2009. Graveyards on the Move: The Spatio-Temporal Distribution of Dead *Ophiocordyceps*-Infected Ants. *PLoS ONE* 4(3): 4835.

R Development Core Team. 2011. R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>

Ribeiro JEL, Hopkins MJG, Vincentini A, Sothers CA, Costa MA, Brito JM, Souza, MAD, Martins LHP, Lohmann LG, Assunção PACL, Pereira EC, da Silva CF, Mesquita M, Procópio LC. 1999. Flora da Reserva Ducke – Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central, Manaus, INPA, 816 p.

Sanjuán, T, Henao L G, Amat G. 2001. Distribución espacial de *Cordyceps* spp, (Ascomycotina: Clavicipitaceae) y su impacto sobre las hormigas en selvas del piedemonte amazónico de Colombia, *Rev. Biol. Trop.*, **49**: 945-955 p.



Souza JLP, Baccaro FB, Landeiro VL, Franklin E, Magnusson WE. 2012. Trade-offs between complementarity and redundancy in the use of different sampling techniques for ground-dwelling ant assemblages, *Applied Soil Ecology* **56**: 63–73.

Sung GH, Hywel-Jones NL, Sung JM, Luangsa-ard JJ, Shrestha B, Spatafora JW. 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi, *Studies in Mycology*. **57**: 5–59.

Sung GH, Poinar Jr GO, Spatafora JW. 2008. The oldest fossil evidence of animal parasitism by fungi supports a Cretaceous diversification of fungal–arthropod symbioses. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **49**: 495–502.

Sylvia DM, Fuhrmann JJ, Hartel PG, Zuberer DA. 1999. Principles and Application of Soil Microbiology. Prentice Hall. 2<sup>nd</sup> edition. 672 p.

Tulasne, LR, Tulasne C. 1865. *Selecta Fungorum Carpologia III*, Paris Museum, 221 p.

Underwood E, Fisher B. 2006. The role of ants in conservation monitoring: If, when, and how. *Biological Conservation*, **132**: 166-182.