

**INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA**

**Zumbis buscam a luz? *Camponotus atriceps* infectadas por
Ophiocordyceps camponoti-atricipis morrem em locais mais
iluminados na Amazônia Central Brasileira**

Fernando Sarti Andriolli

Manaus, Amazonas

Agosto, 2017

FERNANDO SARTI ANDRIOLLI

**Zumbis buscam a luz? *Camponotus atriceps* infectadas por
Ophiocordyceps camponoti-atricipis morrem em locais mais iluminados
na Amazônia Central Brasileira**

Fabricio Beggiato Baccaro

Noemia Kazue Ishikawa

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requerimentos para obtenção do título de Mestre em Biologia (Ecologia), em 2017.

Manaus, Amazonas

Agosto, 2017

Banca Examinadora



MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DO INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA.

Aos 16 dias do mês de agosto do ano de 2017, às 09h00min, no Auditório do LBA, Campus II, INPA/Aleixo. Reuniu-se a Comissão Examinadora de Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: o(a) Prof(a). Dr(a). **José Renato Cavallazzi**, da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, o(a) Prof(a). Dr(a). **Adrian Ashton Barnett**, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, e o(a) Prof(a). Dr(a). **Marcelo Gordo**, da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, tendo como suplentes o(a) Prof(a). Dr(a). Igor Luis Kaefer, da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, e o(a) Prof(a). Dr(a). Beatriz Ronchi Teles, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, sob a presidência do(a) primeiro(a), a fim de proceder a arguição pública do trabalho de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de **FERNANDO SARTI ANDRIOLLI**, intitulado: **“ZUMBIS BUSCAM A LUZ? *Camponotus atriceps* INFECTADAS POR *Ophiocordyceps camponotiatricipis* MORREM EM LOCAIS MAIS ILUMINADOS NA AMAZÔNIA CENTRAL BRASILEIRA”**, orientado(a) pelo(a) Prof(a). Dr(a). Fabricio Beggiato Baccaro, da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, e coorientado(a) pelo(a) Prof(a). Dr(a). Noemia Kazue Ishikawa, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA.

Após a exposição, o(a) discente foi arguido(a) oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final:

APROVADO(A) REPROVADO(A)
 POR UNANIMIDADE POR MAIORIA

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

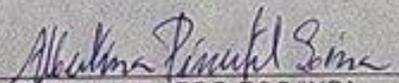
Prof(a). Dr(a). JOSÉ RENATO CAVALLAZZI

Prof(a). Dr(a). ADRIAN ASHTON BARNETT

Prof(a). Dr(a). MARCELO GORDO

Prof(a). Dr(a). IGOR LUIS KAEFER

Prof(a). Dr(a). BEATRIZ RONCHI TELES


Coordenação PPG-ECO/INPA

Ficha catalográfica

A573 Andriolli, Fernando Sarti

Zumbis buscam a luz? *Camponotus atriceps* infectadas por *Ophiocordyceps camponoti-atricipis* morrem em locais mais iluminados na Amazônia Central Brasileira. / Fernando Sarti Andriolli. --- Manaus: [s.n.], 2017.

39 f.: il.

Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2017.

Orientador: Fabricio Beggiato Baccaro

Coorientadora: Noemia Kazue Ishikawa

Área de concentração: Ecologia

1. Formigas zumbis. 2. Fungos. 3. Parasitas. I. Título.

CDD 595.796

SINOPSE

Este trabalho relacionou a incidência luminosa com o local de morte de *formigas Camponotus atriceps* infectadas pelo fungo parasita *Ophiocordyceps camponoti-atricipis*. As regiões onde são encontrados muitos cadáveres de formigas parasitadas, chamados de cemitérios, foram utilizadas para o delineamento das 10 parcelas. A intensidade luminosa foi reduzida em metade da área das parcelas através de uma tela de sombreamento. As novas formigas parasitadas foram monitoradas semanalmente em relação a área, altura e orientação dos locais de morte durante 6 meses de coleta.

Palavras-Chave: Formigas zumbis, interação parasita-hospedeiro, fungos parasitas, luminosidade, manipulação de comportamento, Amazônia.

Agradecimentos

Vou utilizar do excerto “a ordem dos fatores não altera o produto” pra iniciar esta sessão e já de antemão saliento que este script não está ordenado segundo o alfabeto, não possui sentido cronológico nem tão pouco aleatório (aliás, “*o quê sêr alêatório?*”). Também não está em ordem de importância ou mesmo aparição. Está mais pra algo entre *Pulp Fiction* e *Fight club*. O final pode não estar no fim. Primeiramente fora Temer/diretas já. Em seguida, gostaria de agradecer aos meu orientadores Fabricio (“Papício” na linguagem da Bia de do Azeitona) e Noemia por todo longo caminho de curto espaço de tempo pelo que ele representa (o mestrado é um piscar de olhos). A relação sempre foi bastante agradável e proporcionou engrandecimento intelectual-cognitivo e pessoal. À Cristina Maki (em memória) pelo apoio fundamental no início da elaboração do projeto. Aos meus pais pelo apoio (semi) incondicional de toda a trajetória desde *o início, o fim e o meio*. Aos meus *amigos de copo e de cruz*, Kaizer, Dito e Arreia, também *Kanalhas* de plantão se tratando de Dj, Sujos ou Tatão. Detalhes adicionais sobre o cunho vernáculo do vocábulo intitulado não serão expostos aqui. Ao Carlão (Cabelo) pelo pôster do *AC/DC* (no momento colado na minha parede do quarto) e por cortar o suprimento de água do banheiro o que proporcionou um “não lavar de mãos” de consciência limpa (ao contrário das mãos). Aos companheiros de *John Power*, Kelly, Ivan, Hermísia, Jeff e o “calouro de longa data” recém chegado Azê. À Carol Antunes e as meninas (Maju, Marina e Tainah) por me receberem tão bem em casa logo que cheguei em Manaus (ainda vou pagar aquele fardo qualquer hora dessas!). Aos amigos da ponte Rio Claro-Manaus, Layon (antes Fada, depois Brad Pitt com Leish e agora Peixe-boi, em qualquer fisionomia quase sempre levando surras Homéricas no bilhar) Fernanda, Jaspion, Jack, Bambu. Ao Carlos e Sonia Demarchi, Edmundo Andriolli (pai e *Kanalha* mor) e Roberto Crespo por terem ajudado a trazer minha moto (*Suzy Q*) pra cá. Pra quem pilota dispensa comentários adicionais. Aos parceiros e

amigos que me ajudaram em campo, Neto, Gui Alvarenga, Ramiro Blade, Xonas Meia-rede, Bicudo, Jeff, Fada, Túlio (pelas caronas e habilidades sobre-humanas de cortar árvores que caem na estrada com terçado sem corte) e à Flavinha. Sem vocês o campo e por consequência o trabalho não teria rolado, ao menos não da mesma maneira (*“Eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos!” V.M.*). À Ruby Vargas e as meninas do laboratório sempre eficazes e competentes, à Tiara por comprar (e vencer) a briga do sequenciamento do fungo que teimou em reconhecer sua própria identidade (quem nunca...). Ao Luiz Cândido e a equipe de alunos do CLIAMB, em especial à Denise, pelos sensores, torres de coleta e suporte, fundamentais para a realização deste trabalho. À FAPEAM pela bolsa concedida durante (grande parte) o mestrado. À Val por me lembrar que faltavam 2 créditos à cumprir antes da defesa e à minha turma de mestrado do PPG em Ecologia do INPA.

*Now I'm back in the ring to take another swing
Cause the walls were shaking the earth was quaking
My mind was aching
And we were making it
And
You shook me all night long...*

Angus Young, Malcolm Young and Brian Johnson

À D. Mirtes, Charlie e Elis.

Resumo

Parasitas especializados podem modificar o comportamento de seus hospedeiros para aumentar as chances de se reproduzir. Esse comportamento é considerado um exemplo do fenótipo estendido do parasita. Neste trabalho, nós estudamos a relação entre o fungo *Ophiocordyceps camponoti-atricipis*, um parasita especializado, e as formigas carpinteiras *Camponotus atriceps*. Uma vez infectadas por *O. camponoti-atricipis*, as formigas morrem em locais onde a temperatura e umidade são mais estáveis. Esses locais aumentam o sucesso reprodutivo do parasita. Entretanto, a luz é responsável por controlar a reprodução de diversas espécies de fungos de vida livre, e pode ter um papel importante na fase terminal da infecção de fungos parasitas. Neste trabalho, nós avaliamos o efeito da luminosidade na seleção dos locais de morte de *C. atriceps* infectadas. Em 10 cemitérios (locais próximos as trilhas de forrageio de *C. atriceps* onde são encontradas muitas formigas mortas infectadas), a luminosidade foi reduzida através de telas de sombreamento de 80% em metade da área das parcelas. Nós identificamos os cadáveres de *C. atriceps* com fitas de marcação coloridas durante 6 meses de trabalho de campo. As formigas infectadas que morreram após o estabelecimento das parcelas foram monitoradas nesse período. O número de cadáveres que produziram corpos de frutificação, a altura em relação ao nível do solo e a orientação das formigas parasitadas foram mensurados. As áreas sombreadas receberam 53 formigas, representando 32,7 % do total, em comparação à área controle adjacente, onde foram encontradas 109 formigas mortas. Além disso, nas áreas sombreadas apenas 15 cadáveres produziram ascomas ou corpos de frutificação. Já nas áreas controle 41 cadáveres desenvolveram os ascomas. As *C. atriceps* infectadas também morreram em locais mais altos nas áreas sombreadas (140 cm) em relação às áreas controle (110 cm). Nossos resultados sugerem que a luz pode atuar no local da morte das formigas *C. atriceps* parasitadas e por consequência desempenhar um papel importante no ciclo reprodutivo do fungo *O. camponoti-atricipis*.

Abstract

Specialized parasites can modify the behavior hosts to increase chances of reproduction. This behavior is considered an example of extension phenotype of the parasite. We study the relationship of the fungus *Ophiocordyceps camponoti-atriceps*, a specialized parasite, with the carpenter ants *Camponotus atriceps*. Once infected by *O. camponoti-atriceps*, the ants dies in places with stable temperature and relative humidity. The reproduction of the parasite is locally increased on these areas. However, light is responsible for controlling the reproduction of several species of free-living fungi, and may play an important role in the terminal phase of parasitic fungal infection. On this work, we evaluate the effect of luminosity in selected sites of dead infected *C. atriceps* ants. In 10 graveyards (sites near of foraging trails with many infected dead ants), the luminosity was reduced 80% through shading screens in half of the plots area. We identified dead infected *C. atriceps* using colored marking ribbons over 6 months of fieldwork. The infected ants that died after establishment of the plots were monitored. We measured the number of fruiting bodies, height above ground and the orientation of infected ants in the field. The selected sites of infected *C. atriceps* shows strong influence by experimental light reduction. The shaded areas received 53 ants (32, 7%) in comparison to the adjacent control area, with 109 (67, 3%) ants. In addition, in the shaded areas only 15 dead ants produced fruiting bodies. In the control areas, 41 dead ants developed fruiting bodies. The infected *C. atriceps* also died at higher sites in the shaded areas (140 cm) in relation to the control areas (110 cm). Our findings suggest that light may have act in the place death of parasitized *C. atriceps* ants and therefore play an important role on reproductive cycle of the fungus *O. camponoti-atriceps*.

Sumário

Banca Examinadora	3
Ficha catalográfica.....	4
Agradecimentos	5
Resumo	9
Abstract.....	10
Objetivos.....	12
Capítulo I	13
Abstract.....	15
Introdução	16
Métodos	18
Resultados.....	25
Discussão	31
Referências	35
Suplementos	39

Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi relacionar o efeito da redução da luminosidade incidente nos cemitérios com o local de morte das formigas *Camponotus atriceps* infectadas com o fungo *Ophiocordyceps camponoti-atricipis*. Mais especificamente, como a redução da luminosidade das áreas sombreadas, nas 10 parcelas monitoradas, em comparação às áreas controle, modificou os seguintes caracteres mensurados:

- (1) Número de cadáveres de formigas infectadas;
- (2) Número de ascomas ou corpos de frutificação;
- (3) A altura dos cadáveres das formigas infectadas em relação ao nível do solo;
- (4) A orientação dos cadáveres das formigas infectadas em relação ao local de morte.

Andriolli, F.S.; Kazue, N.I, Baccaro, F.B.; **Zumbis buscam a luz? *Camponotus atriceps* infectadas por *Ophiocordyceps camponoti-atricipis* morrem em locais mais iluminados na Amazônia Central Brasileira.** Manuscrito em preparação para submissão para *Behavioral Ecology and Sociobiology*.

Zumbis buscam a luz? *Camponotus atriceps* infectadas por *Ophiocordyceps camponoti-atricipis* morrem em locais mais iluminados na Amazônia Central

Brasileira

Fernando Sarti Andriolli^{1*}, Noemia Kazue Ishikawa¹, Fabricio Beggiato Baccaro²

¹ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Av. André Araújo 2936,

Manaus, AM, 69.080-971, Brasil

² Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Av. General Rodrigo Octávio, 6200,

Manaus, AM, 69.080-900, Brasil

* Corresponding author:

E-mail: andriollifernando@gmail.com

Abstract

Specialized parasites can modify the behavior hosts to increase chances of reproduction. This behavior is considered an example of extension phenotype of the parasite. We study the relationship of the fungus *Ophiocordyceps camponoti-atriceps*, a specialized parasite, with the carpenter ants *Camponotus atriceps*. Once infected by *O. camponoti-atriceps*, the ants dies in places with stable temperature and relative humidity. The reproduction of the parasite is locally increased on these areas. However, light is responsible for controlling the reproduction of several species of free-living fungi, and may play an important role in the terminal phase of parasitic fungal infection. On this work, we evaluate the effect of luminosity in selected sites of dead infected *C. atriceps* ants. In 10 graveyards (sites near of foraging trails with many infected dead ants), the luminosity was reduced 80% through shading screens in half of the plots area. We identified dead infected *C. atriceps* using colored marking ribbons over 6 months of fieldwork. The infected ants that died after establishment of the plots were monitored. We measured the number of fruiting bodies, height above ground and the orientation of infected ants in the field. The selected sites of infected *C. atriceps* shows strong influence by experimental light reduction. The shaded areas received 53 ants (32, 7%) in comparison to the adjacent control area, with 109 (67, 3%) ants. In addition, in the shaded areas only 15 dead ants produced fruiting bodies. In the control areas, 41 dead ants developed fruiting bodies. The infected *C. atriceps* also died at higher sites in the shaded areas (140 cm) in relation to the control areas (110 cm). Our findings suggest that light may have act in the place death of parasitized *C. atriceps* ants and therefore play an important role on reproductive cycle of the fungus *O. camponoti-atriceps*.

Introdução

Parasitas especializados podem causar modificações morfológicas, fisiológicas e comportamentais em seus hospedeiros aumentando as suas chances de reprodução (COMBES, 2001; THOMAS, 2010). Essas alterações beneficiam os parasitas através da liberação de propágulos em ambientes mais adequados e por consequência aumentam as chances de infecção de novos hospedeiros (BIRON et al., 2005). As modificações comportamentais de uma espécie infectada que favorecem à propagação dos genes do parasita, é um exemplo da manifestação do fenótipo estendido (DAWKINS, 1982). Os benefícios dessas relações são evidências de que o parasitas podem ter sido selecionados ao induzir essas modificações no comportamento dos hospedeiros (LEFEVRE et al., 2009). Entretanto, se a manipulação de comportamento é induzida especificamente pelo parasita, ou se é um simples efeito colateral da infecção é um paradoxo de difícil resposta, fascinante e controverso ao mesmo tempo (TALARICO et al., 2017).

Formigas infectadas com fungos parasitas do complexo *Ophiocordyceps unilateralis s.l.* apresentam alterações de comportamento que não ocorrem em indivíduos saudáveis (HUGHES et al., 2011). A contaminação acontece através do contato direto dos esporos com a superfície externa do corpo da formiga. Após o estabelecimento da infecção, o crescimento do fungo é proporcionado pelo consumo das estruturas musculares da formiga enquanto ela mantém suas atividades normais de saída e retorno para o ninho (EVANS, 1989; HUGUES et al., 2011). O crescimento interno do micélio atinge o sistema nervoso central da formiga entre uma a duas semanas após o início da infecção. Nesse período elas apresentam movimento trêmulo e errático, escalando e caindo dos arbustos devido a convulsões (ANDERSEN et al., 2009; HUGHES et al., 2011). A morte da formiga ocorre depois de fixar as mandíbulas na lateral de uma folha (*death grip*), ou em outra região da planta (espinhos, galhos etc.) (ANDERSEN et al., 2009). Em uma a duas semanas após a morte da formiga, o fungo

produz o ascoma ou corpo de frutificação fora do corpo da formiga, onde os esporos são produzidos e liberados para o ambiente (DE BEKKER; MERROW; HUGHES, 2014; EVANS; ELLIOT; HUGHES, 2011; EVANS; SAMSON, 1984). Ao atingir o solo, os esporos podem entrar em contato com novas formigas não infectadas reiniciando o ciclo de vida do parasita (ANDERSEN et al., 2009; EVANS; SAMSON, 1984). O comportamento atípico das formigas infectadas na fase terminal da infecção foi utilizado para compara-las ao comportamento de zumbis (HUGHES et al., 2011).

Os registros de parasitismo do complexo *Ophiocordyceps unilateralis s.l.* pertencem as formigas da tribo *Camponotini*. Atualmente acredita-se que os fungos parasitas do gênero *Ophiocordyceps* possuem uma relação específica com seus hospedeiros, em que cada espécie de fungo infecta apenas uma espécie de formiga (EVANS; ELLIOT; HUGHES, 2011). Os cadáveres das formigas infectadas podem ser encontrados em grande quantidade (mais de 26 indivíduos/m² para *Camponotus leonardi* na Tailândia) em locais chamados de cemitérios (PONTOPPIDAN et al., 2009). Nestes cemitérios, a maior parte das formigas infectadas são encontradas mortas a 25 cm de altura em relação ao nível do solo (ANDERSEN et al., 2009). A realocação de cadáveres de formigas sugere que nessa altura, a temperatura e a umidade variam menos em comparação às áreas mais altas da floresta, favorecendo o desenvolvimento, liberação e dispersão dos esporos do fungo (ANDERSEN et al., 2009).

Estudos recentes com outras interações entre parasitas e hospedeiros, como lagartas infectadas por baculovírus (HOOVER et al., 2011) e grilos infectados por nematomorphos (THOMAS et al., 2002), sugerem forte influência de um comportamento fototático positivo do hospedeiro mediado pelo parasita (PONTON et al., 2011; VAN HOUTE et al., 2015; VAN HOUTE; ROS; VAN OERS, 2013). É bem conhecido que as formigas podem utilizar referências espaciais como a luz e a posição

solar como orientação para forrageio e retorno para o ninho (WEHNER, 1984; WYSTRACH; GRAHAM, 2012) entretanto, a utilização da luminosidade como orientação para formigas infectadas por fungos parasitas é um assunto recente. Alguns estudos, com diferentes abordagens, sugerem que a luz solar também pode influenciar o comportamento de formigas zumbis (CHUNG et al., 2017; DE BEKKER; MERROW; HUGHES, 2014; HUGHES et al., 2011). Em formigas *Camponotus americanus* infectadas com *O. unilateralis s.l.*, em laboratório, o *biting behavior* (ato de morder a folha) aconteceu no período da manhã e a morte dos hospedeiros (*death grip*) aconteceu no início da tarde (DE BEKKER; MERROW; HUGUES 2014). Para *Camponotus leonardi*, infectadas com *O.unilateralis s.l.*, também foi registrado sincronismo entre o horário de fixação das mandíbulas (*biting behavior*) ao meio dia, e morte no final da tarde, em observações focais em floresta da Tailândia (HUGHES et al., 2011). Entretanto, o conhecimento sobre os possíveis efeitos da luz no comportamento modificado das formigas parasitadas é ainda incipiente. Neste trabalho, o local de morte (*death grip*) de *C. atriceps* infectadas por *O. camponoti-atricipis* foi investigado através de um experimento de campo em que a luminosidade foi majoritariamente reduzida.

Métodos

Área de estudo

O trabalho de campo foi realizado na Reserva Florestal Adolpho Ducke localizada ao norte da cidade de Manaus-AM (02°55' S, 59°59' W). A Reserva possui 100 km² de área e é representada por Floresta Tropical Úmida de Terra Firme (ALENCAR, 1986). O clima na região de acordo com a classificação de Köppen é do tipo Af_i, tropical com pouca amplitude térmica sem inverno e verão bem definidos (RIBEIRO, 1976). A temperatura média anual é de 26 °C e a precipitação varia entre 1750 mm a 2500 mm de chuva por ano com o período de maior intensidade de

novembro a maio e o período menos chuvoso de junho a outubro. O solo é predominantemente argiloso nas regiões mais altas (platôs de 80 m a 140 m de altitude) e a porcentagem de argila vai gradativamente diminuindo nas vertentes sendo substituída por frações maiores de areia nas regiões de baixios (OLIVEIRA et al., 2008).

Desenho amostral e Coleta de dados

Nós delimitamos 10 parcelas à partir dos cemitérios de *C. atriceps* encontrados (média de 29 formigas mortas por parcela). Cada parcela possuiu 10 m² de área total. Metade (5 m²) de cada parcela foi coberta com tela de sombreamento de polietileno de fator 80% (marca Ecosombra). As telas de sombreamento foram instaladas à altura de 2 metros em relação ao nível do solo (**Anexo 1**). A posição das telas seguiu a orientação norte-sul para que a incidência solar fosse uniforme em ambas as áreas das parcelas ao longo do dia.

Para a escolha do local da tela de sombreamento o número de formigas infectadas para as áreas sombreado e controle foi considerado mantendo um número semelhante de cadáveres para cada área. As formigas mortas infectadas foram identificadas e numeradas individualmente com fitas de marcação coloridas permanentes. Apenas os indivíduos que surgiram depois da instalação das telas de sombreamento foram considerados para as análises estatísticas. A entrada da luminosidade lateral no experimento (nascer e pôr do sol) foi considerada, delimitando um buffer de 50 cm de altura e 50 cm de largura no entorno da área sombreada. A mesma razão foi estendida para a área controle adjacente. Essa região foi chamada de área de borda.

Entre outubro de 2016 e abril de 2017, o monitoramento de novos cadáveres de *C. atriceps* infectados foi realizado semanalmente nas 10 parcelas. A cada novo cadáver encontrado foi mensurado a altura em relação ao nível do solo, a área da parcela em que a formiga estava presente (sombreado, controle e borda) e o crescimento externo do fungo até a possível formação do ascoma (corpo de frutificação). A orientação dos cadáveres em relação ao local em que as mandíbulas estavam presas (folhas ou outras partes das plantas) também foi registrado. A coleta dos dados foi feita seguindo protocolo de busca ativa e minuciosa abrangendo árvores, palmeiras, arbustos e herbáceas.



Figura 1. Locais de morte e estágios de desenvolvimento do fungo no exterior do corpo da formiga. **(A)** *C. atriceps* morta há poucos dias (menos de 72h) com as mandíbulas presas em espinho de palmeira. O fungo não apresenta crescimento externo. **(B)** *C. atriceps* morta com as mandíbulas presas na lateral da folha. Estroma (**St**) emergente entre a cabeça e o pronoto (aproximadamente uma semana após a morte da formiga). **(C)** *C. atriceps* morta com as mandíbulas presas na nervura foliar principal. Apresenta ascoma (**As**) desenvolvido (de uma a duas semanas após a morte da formiga).

Identificação das espécies e análises genéticas

As formigas foram identificadas através de comparação com espécimes depositados na Coleção Entomológica do INPA e pela confirmação de especialistas. Para a identificação do fungo parasita, foram coletadas 3 formigas infectadas das 3 parcelas mais abundantes (total de 9 indivíduos). As formigas utilizadas para confirmação da espécie também foram incluídas nos resultados do experimento de

campo. As 9 formigas infectadas foram coletadas em tubos de Eppendorf esterilizados assim que o corpo de frutificação foi produzido.

A extração do DNA foi realizada com o material coletado no mesmo dia, seguindo o protocolo do kit de extração DNeasy Plant Mini Kit (disponível em: <https://www.qiagen.com/it/resources/download.aspx?id=6b9bcd96-d7d4-48a1-9838-58dbfb0e57d0&lang=en>) com algumas alterações descritas aqui. Pequenas partes do ascoma foram inseridos em microtubos de 2 ml com duas *beads* de zircônia para ruptura das células, em um macerador de tecidos Precellys®. Após a quebra do material, foi adicionado 400 µl de tampão AP1 e 4 µl de RNase A e a mistura incubada em banho maria por 12 h a 60 °C. Em seguida foi adicionado 130 µl do tampão P3, centrifugado por 5 min em 20000 g e posteriormente incubado em gelo por 5 min. A amostra foi então pipetada em um tubo QIAshredder spin column de 2 ml, centrifugada por 2 min a 20000 g e transferida para um novo tubo QIAshredder adicionando 1,5 volumes (1,5 vezes maior que o volume total da amostra) de tamponador AW1. O conteúdo do tubo foi então transferido para uma coluna DNeasy Mini spin column inserida em um novo tubo coletor de 2 ml, centrifugado a 6000 g sendo o volume líquido descartado após passar pelo filtro do tubo. Essa etapa foi repetida mais uma vez com o remanescente da amostra. A coluna DNeasy spin column foi então inserida em um novo tubo de coleção de 2 ml, adicionando 500 µl do tamponador AW2 e em seguida centrifugado por 1 min a 6000 g. Essa etapa de lavagem do DNA foi repetida mais uma vez com 500 µl de tampão AW2 e centrifugado por 2 min a 20000 g para otimização da extração de DNA. A coluna foi então inserida em um novo microtubo de 2 ml, onde foi adicionado 50 µl de solução tampão AE para eluição da amostra. Em seguida, o conteúdo do tubo foi incubado por 5 min a temperatura ambiente (15 a 25 °C) e centrifugado por 1 min a 6000 g.

PCR e sequenciamento

As regiões ITS (espaçador interno transcritivo), nuc-LSU (subunidade maior ribossomal nuclear – 28S) e RPB2 (segunda subunidade maior da RNA polimerase) foram amplificadas por PCR (Polymerase chain reaction) realizada em termociclador (Veriti 96 Well Thermal Cycler da Applied Biosystems), utilizando *primers* universais já definidos (WHITE et al., 1990; LIU et al., 1999). A reação de PCR foi conduzida utilizando-se volume final de 20µL contendo tampão 1x (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl), 2.5 mM de MgCl₂, 3 mM de dNTP, 2mM de cada primer, 1U Taq DNA Polymerase (Invitrogen) e 5 ng/µL de DNA. O perfil de ciclagem para amplificação de ITS e nuc-LSU consistiu de desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto, e por fim uma etapa de extensão final a 72 °C por 10 minutos. A região RPB2 foi amplificada de acordo com Liu et al. (1999). Para visualização dos fragmentos, 3 µl de GelRED™ foram adicionados a 5 µl dos produtos de PCR, aplicados em gel de agarose 1,5%, que foi submetido a eletroforese por 30 minutos a 80 Volts. Após a separação, os fragmentos foram visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta. O resultado foi avaliado de acordo com a presença ou ausência de banda. A estimativa dos tamanhos dos produtos amplificados foi feita a partir de comparação com o marcador padrão *ladder* 1Kb.

A reação de sequenciamento foi realizada com o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) com volume final de 10 µL contendo 2 µL de tampão BigDye 5X, 5 mM de primer e 0,3 µL de BigDye v3.1. Esta foi conduzida em termociclador *Veriti 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems) seguindo o programa: 96 °C por 2 minutos, 35 ciclos de 96° C por 30 segundos, 55 °C por 20 segundos e 60 °C por 4 minutos. O sequenciamento foi realizado em sequenciador

automático por eletroforese em capilar ABI 3130 Sequence Analyzer (Applied Biosystems).

A visualização da qualidade das sequências, a montagem das sequências consenso e os alinhamentos foram realizados no programa Geneious R9 (KEARSE et al., 2012). Para confirmação das identidades das sequências foram feitas buscas com a ferramenta BLAST do NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para confirmar a identidade do fungo *O. camponoti-atricipis*, as sequências foram submetidas ao BLAST em uma análise de similaridade.

Variáveis climáticas locais

Nós instalamos um par de torres para coletar os dados das variações de umidade relativa, temperatura do ar e luminosidade das parcelas. Uma torre foi posicionada na área sombreada e uma na área controle, ambas centralmente localizadas. Cada torre possuía um sensor responsável por medir a intensidade de luz através da radiação solar incidente (Silicon Pyranometer Sensor modelo S-LIB-M003, conectado a uma micro estação Hobo Micro Station Data Logger modelo H21-002, Onset) e um termo higrômetro Data Logger (marca Icel, modelo HT-4000). Apenas a torre situada na área sombreada estava sujeita à redução da intensidade luminosa. As medições dos sensores foram ajustadas para coletar os dados a cada 5 min. Semanalmente, a cada nova rodada do monitoramento das formigas, as torres eram realocadas para a parcela adjacente. Dessa forma as parcelas tiveram o mesmo intervalo de coleta de dados durante o experimento.

Análises dos dados ambientais

Nós utilizamos Testes t pareados para comparar o número de novos cadáveres de formigas e o número de corpos de frutificação encontrados durante os 6 meses de monitoramento (variáveis dependentes) entre a área sombreada e a respectiva área controle (variável preditora). Nessa análise a unidade amostral foi a parcela.

O efeito da luminosidade na altura dos cadáveres foi investigado por um modelo generalizado misto (GLMM). A variável dependente foi a altura dos cadáveres em relação ao nível do solo. As variáveis preditoras fixas foram os tratamentos (área sombreada ou controle) e a posição do cadáver na parcela (borda ou interior da parcela). Nessa análise a unidade amostral foi o cadáver da formiga e as parcelas foram declaradas como variáveis aleatórias para controlar a dependência espacial dos dados. Análises de resíduos foram realizadas para investigar a adequação do modelo. Gráficos de parciais foram produzidos usando o pacote visreg (BREHENY & BURCHETT, 2017) para cada uma das variáveis preditoras. Esses gráficos representam o efeito de uma variável enquanto a outra variável foi mantida constante (BREHENY & BURCHETT, 2012; BREHENY & BURCHETT, 2013). Além das estimativas de relação das variáveis, o pacote também foi utilizado para criar o intervalo de confiança de 95%.

As variáveis climáticas também foram analisadas por GLMMs. Os valores médios a cada hora do dia a luminosidade, a temperatura e a umidade relativa do ar foram as variáveis dependentes. A variável preditora fixa foi o tratamento (área sombreada e controle) e as parcelas foram declaradas como variáveis randômicas.

Para validar o ajuste dos GLMMs, nós comparamos o *Akaike's Information Criterion* (AIC) de cada GLMM com o AIC de seu respectivo modelo nulo (intercepto e

variável randômica apenas). O GLMM completo foi selecionado quando o delta AIC (diferença entre o modelo completo e nulo) foi maior que 2 (AKAIKE, 1982). Todos os GLMMs foram criados usando o pacote lme4 (BATES et al., 2015) do programa R versão 3.2.3 (R Development Core Team 2016).

Para a orientação dos cadáveres das formigas usamos estatística circular (BATSCHELET, 1981) através do programa PAST 3.15 (disponível para download em <https://folk.uio.no/ohammer/past/>). Essa análise usa dos ângulos dispostos em graus como unidade amostral, e utiliza intervalo de confiança de 95% para estimativa do ângulo médio assumindo distribuição circular normal (FISHER, 1983).

Resultados

Identificação do fungo parasita

As 3 sequências utilizadas (RPB2, ITS e nuc-LSU) para a confirmação da identidade do fungo foram comparadas através do banco de dados do Genbank. A sequência de ITS não foi obtida, mesmo após diversas tentativas de amplificação e sequenciamento. Por outro lado, as sequências de RPB2 e nuc-LSU foram obtidas com sucesso, e utilizadas para busca de similaridade pelo BLAST.

O mecanismo de busca BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) utiliza uma sequência de DNA ou proteína e compara com sequências similares do banco de dados, baseando-se no alinhamento entre estas sequências. A busca resulta do encontro com a sequência mais semelhante e pode ser validada por meio de escores específicos. Quando utilizado para identificação de espécies, procura-se obter a maior porcentagem de similaridade (“Ident”) e o menor *e-value* (probabilidade de a correspondência ter sido ao acaso). No entanto, a eficiência do BLAST depende do banco de dados, se a sequência de uma espécie não estiver disponível, o resultado pode ser incipiente. Neste trabalho, a sequência RPB2 não resultou em uma identificação confiável por não existir

outra sequência RPB2 de *O. camponoti-atricipis* disponível no banco de dados. Por este motivo, a sequência mais similar encontrada para RPB2 foi *Cordyceps* sp. OSC 110997 (número de acesso no Genbank EF468929), com 85% de similaridade. A sequência nuc-LSU por sua vez apresentou 96% de similaridade com *O. camponoti-atricipis*, com $e\text{-value} = 0$.

Os resultados encontrados de similaridade das sequências nuc-LSU (96%) e RPB2 (85%), a especificidade entre a relação formiga (*C. atriceps*) e fungo parasita (*O. camponoti-atricipis*) (EVANS; ELLIOT; HUGHES, 2011), aliados ao fato das coletas terem sido realizadas na mesma região do espécime tipo (ARAÚJO et al., 2015) corroboram com a identificação do fungo como *O. camponoti-atricipis*.

Formigas zumbis e a luz

Novos cadáveres de formigas surgiram somente em 6 das 10 parcelas monitoradas. Conseqüentemente, as análises dos resultados apresentados aqui foram baseadas em seis pares amostrais. Encontramos 162 cadáveres de formigas durante o monitoramento, 109 (67,3% do total) formigas infectadas foram encontradas nas áreas controle e 53 (32,7% do total) nas áreas sombreadas. O número de formigas que desenvolveram corpos de frutificação, 56 no total, também foi maior nas áreas controle (41 formigas, 73,2% do total de formigas que frutificaram) em comparação às áreas sombreadas (15 formigas, 26,8% do total de formigas que frutificaram). Localmente, mais cadáveres de formigas infectadas com mais corpos de frutificação foram encontrados na maioria dos pares experimentais nas áreas controle (Figura 2; $t = 2,385$; $p = 0,031$ e $t = 2,538$; $p = 0,026$, respectivamente). As 15 formigas que frutificaram no lado sombreado das parcelas estavam na área de borda.

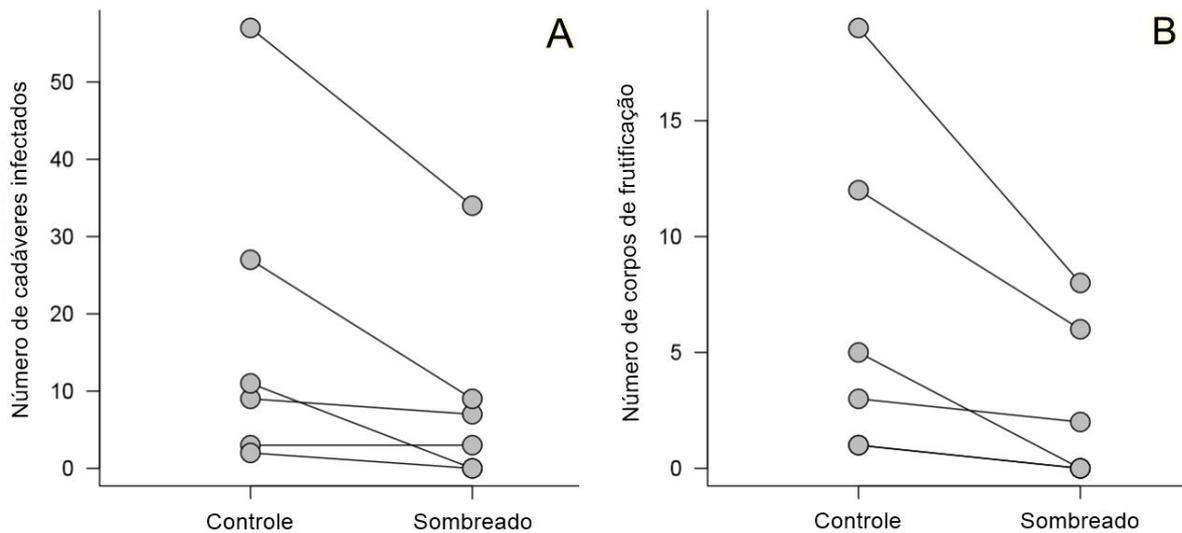


Figura 2. Relação de cadáveres de formigas encontrados por área durante o experimento. Total de cadáveres encontrados nas áreas controle e sombreada (A). Total de cadáveres encontrados que frutificaram durante o experimento (B). Os círculos em cinza representam as 6 parcelas monitoradas que apresentaram novos cadáveres.

Altura dos cadáveres das formigas infectadas

A altura da morte das formigas infectadas também apresentou diferenças em relação as áreas controle e sombreada (Delta AIC = 26,58). As formigas morreram em média a 110 cm de altura nas áreas controle e em torno de 140 cm de altura as áreas sombreadas artificialmente ($p = 0,003$). Entretanto as formigas infectadas encontradas na região da borda das áreas controle e sombreada, morreram aproximadamente a 60 cm de altura em média (Fig.3) e no interior das parcelas ao redor de 100 cm ($p < 0,001$).

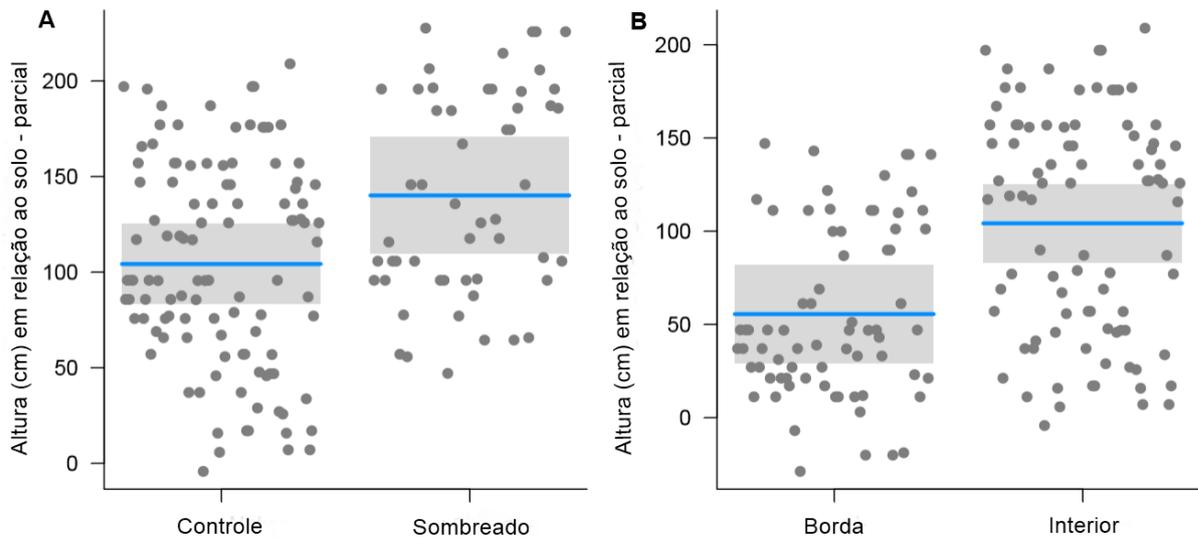


Figura 3. Relação entre a altura dos cadáveres das formigas e as áreas sombreada, controle e borda. Altura dos cadáveres entre os tratamentos, controlando o efeito da borda (**A**). Altura dos cadáveres na área de borda em relação ao interior da parcela, controlando o efeito dos tratamentos (**B**).

Variáveis climáticas

A radiação solar incidente (μE) apresentou valores superiores nas áreas controle ao longo de todas as horas do dia com luz solar ($p < 0,001$). Os horários mais quentes do dia, com maior incidência solar mostraram as maiores discrepâncias entre as áreas sombreada e controle. A temperatura foi relativamente estável entre os tratamentos não apresentando grandes variações entre os horários do dia e da noite ($p > 0,05$). Entretanto a umidade relativa do ar foi mais alta e mais estável nas áreas sombreadas ($p < 0,001$) em relação as áreas controle, que apresentaram maior variação durante o período de coleta (**Figura 4**).

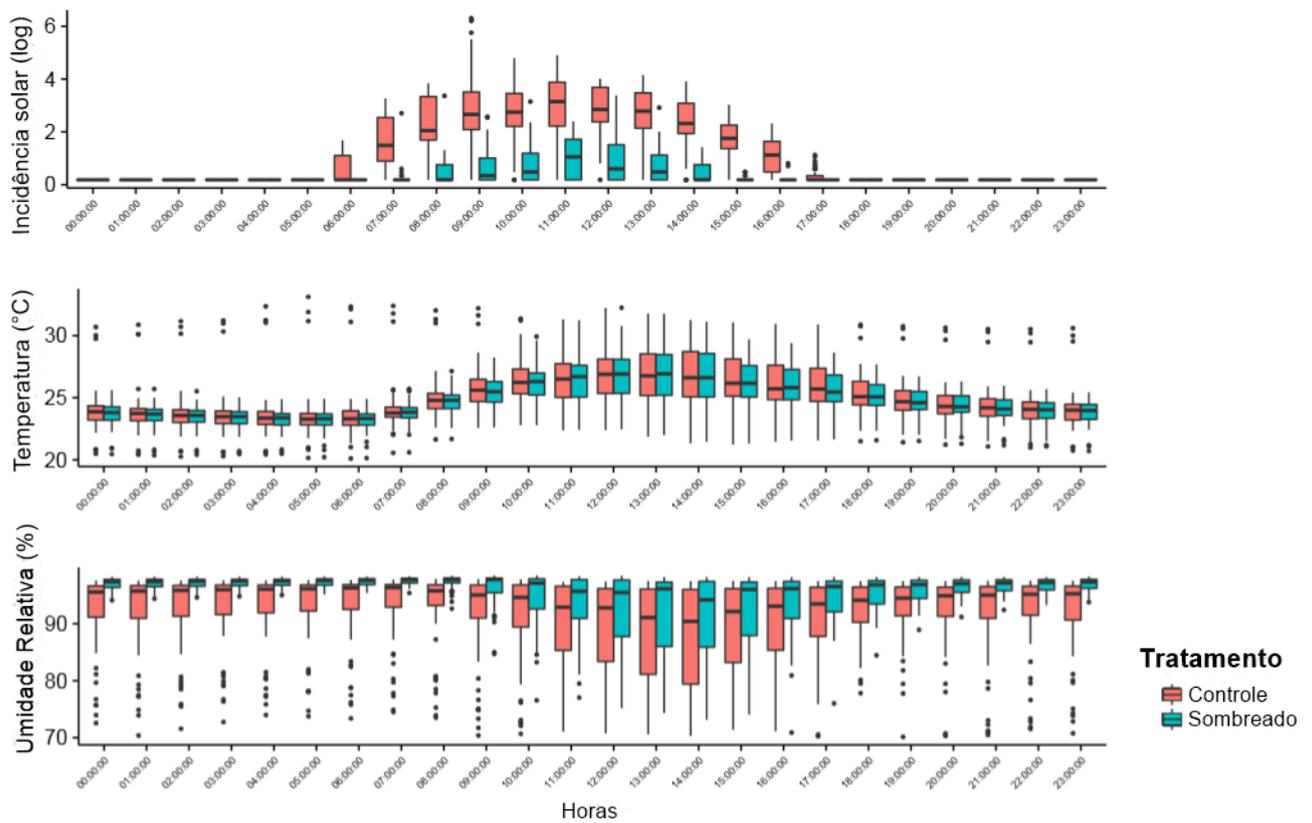


Figura 4. Variáveis climáticas coletadas. Radiação solar incidente, temperatura e umidade relativa do ar coletados pelos sensores ao longo do monitoramento (GLMM).

Orientação dos cadáveres das formigas infectadas

A orientação dos cadáveres das formigas não apresentou padrão consistente para os cadáveres encontrados nas áreas controle (Rayleigh's test: $R = 0,138$, $p = 0,36$) e sombreada (Rayleigh's test: $R = 0,117$, $p = 0,73$) (**Figura 5A e B**). Entretanto, para os cadáveres que produziram corpos de frutificação houve um viés significativo para os quadrantes NO e SO com um ângulo médio de 302° na área de controle (**Figura 6A**) (95% intervalo de confiança = $264^\circ - 341^\circ$; Rayleigh's test: $R = 0,401$, $p = 0,022$). A área sombreada não apresentou uma direção significativa para as formigas infectadas (Rayleigh's test: $R = 0,3201$, $p = 0,56$) (**Figura 6B**).

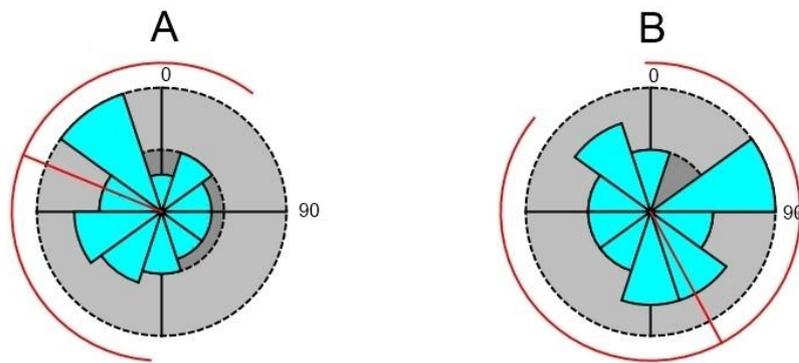


Figura 5. Orientação das formigas mortas infectadas. Total de cadáveres encontrados nas áreas de controle **(A)**. Total de cadáveres encontrados nas áreas sombreadas **(B)**.

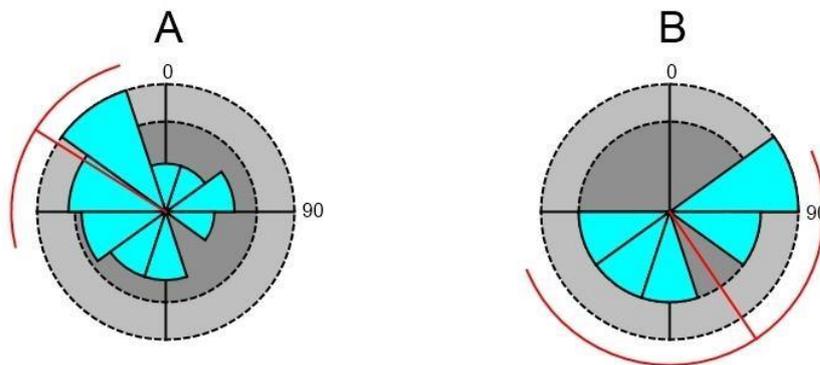


Figura 6. Orientação dos cadáveres de formigas que frutificaram na área controle **(A)**. A seta em vermelho apresenta o ângulo médio de direção de 302° ($264^\circ - 341^\circ$) com intervalo de confiança de 95%. Orientação dos cadáveres de formigas que frutificaram na área sombreada **(B)**. Não apresentou direção significativa.

Discussão

O local da morte das formigas infectadas por fungos do complexo *Ophiocordyceps unilateralis s.l.* é definido no instante em que as mandíbulas são travadas na lateral de uma folha ou em outra região de uma planta. O *death grip* é considerado a manifestação do fenótipo estendido do parasita sob o comportamento do hospedeiro (ANDERSEN et al., 2009). O local específico onde esse comportamento ocorre define o último ato, em vida, da formiga infectada. Após a morte da formiga, se as condições ambientais forem favoráveis, o ascoma irá se desenvolver e liberar os esporos para o exterior do cadáver, completando o ciclo de reprodução do parasita (EVANS; ELLIOT; HUGHES, 2011). Neste trabalho, a redução experimental da intensidade da luz demonstrou ter forte influência no local de morte de *C. atriceps* infectadas por *O. camponoti-atricipis*. As áreas onde a luminosidade foi reduzida, receberam metade dos indivíduos infectados em relação às áreas controle. A altura dos cadáveres registrada para as mesmas áreas também apresentou mudanças quanto à diminuição da luminosidade. Os locais de morte das formigas parasitadas situaram-se em alturas superiores nas áreas sombreadas em relação às áreas controle. Esses resultados sugerem que *C. atriceps* infectadas morrem em locais mais iluminados na Floresta Amazônica Central Brasileira, e que a luz tem inferência sobre a manifestação do fenótipo estendido do parasita *O. camponoti-atricipis*.

O local de morte de *C. leonardi* parasitadas está associado a baixa amplitude entre as mudanças de temperatura e umidade. À 25 cm do nível do solo a temperatura é mais baixa e a umidade relativa mais alta em relação a regiões superiores do dossel, tais características são reconhecidas como favoráveis ao *death grip* de *C. leonardi* infectadas na Tailândia (ANDERSEN et al., 2009). Entretanto, os resultados encontrados no presente trabalho apontam parcialmente, para o oposto em *C. atriceps*

infectadas. Embora a amplitude térmica entre as áreas sombreada e controle não tenha apresentado grandes diferenças, a umidade relativa do ar foi mais alta e variou menos nas áreas sombreadas do experimento. O número de formigas infectadas e o número de corpos de frutificação foram maiores nas áreas controle, onde as flutuações de umidade relativa do ar foram superiores. Esses resultados sugerem que para *C. atriceps* infectadas a luz foi a variável ambiental mensurada com maior inferência na escolha dos locais de morte.

As áreas onde a luminosidade foi reduzida, receberam 53 formigas infectadas das quais apenas 15 desenvolveram corpos de frutificação (26,8% do total de formigas que desenvolveram ascomas). Os Cadáveres foram encontrados em locais mais altos nas áreas sombreadas (média de 140 cm). As formigas infectadas parecem ter procurado por alturas superiores na região sombreada em busca de maior incidência luminosa. Esses resultados sugerem forte influência de fototactismo no comportamento das formigas infectadas, como foi encontrado para as lagartas infectadas por baculovírus (HOOVER et al., 2011) e também para gamarídeos parasitados (PONTON et al., 2006). Os gamarídeos (crustáceos de água doce) quando parasitados por tremátodos nadam até a superfície da água onde se tornam mais expostos aos predadores, potenciais hospedeiros secundários do parasita (PONTON et al., 2006). A altura dos cadáveres encontrados nas áreas de borda corroboram com a hipótese do fototactismo. Os cadáveres foram encontrados em alturas inferiores (60 cm) em relação às formigas encontradas no interior das áreas (100 cm), sugerindo influência da incidência solar lateral nessas regiões.

A fase reprodutiva do fungo (frutificação) parece estar relacionada com a incidência luminosa nos locais de morte das formigas parasitadas. Os mecanismos de foto recepção moleculares, descritos para o ascomiceto *Neurospora crassa*, onde a luz é

responsável por induzir a esporulação e o desenvolvimento sexual desses organismos (BALLARIO; MACINO, 1997; LINDEN; MACINO, 1997; LOROS, 2005; SCHWERDTFEGGER; LINDEN, 2001), é exemplo de como a luminosidade pode interferir nos processos reprodutivos dos fungos. A baixa proporção de 26,8% dos cadáveres que produziram ascomas nas áreas sombreadas em relação as áreas controle (73,2%) pode estar relacionado com esses mecanismos moleculares de foto recepção. Além disso, as 15 formigas que frutificaram nas áreas sombreadas estavam situadas na área de borda e mais expostas a luminosidade lateral.

A orientação dos cadáveres apresentou direção consistente para as formigas que frutificaram nas áreas controle. O ângulo médio encontrado foi de 302 ° em direção à região NO. Resultado similar ao encontrado para *Camponotus leonardi*, que apresentou orientação para o quadrante N-NO e ângulo médio de 345 ° (ANDERSEN et al., 2009). Em *Dolichoderus thoracicus* infectadas com *Ophiocordyceps pseudolloydii* a direção dos cadáveres foi relacionada com a cobertura do dossel nos cemitérios amostrados. A abertura do dossel apresentou correspondência com a direção dos cadáveres sugerindo a influência da luz solar nos locais de morte das formigas infectadas (CHUNG et al., 2017). Nossos resultados não apontaram um direcionamento para os cadáveres que frutificaram na área sombreada, entretanto nesses locais nenhum indivíduo apresentou direção dentro do quadrante predominante da área controle (NO). A cobertura uniforme propiciada pela tela de sombreamento sugere o bloqueio da luminosidade de um dossel muito fechado, o que corrobora com a ausência de direção dos cadáveres infectados, semelhante ao encontrado por CHUNG, 2017. O número reduzido de formigas (15) que produziram corpos de frutificação nas áreas sombreadas é também relevante, uma vez que a estimativa do ângulo médio não é precisa para tamanhos amostrais pequenos e intervalos de confiança maiores do que 45 ° (BATSCHELET, 1981).

Os resultados encontrados neste trabalho expandem as evidências do efeito do ciclo circadiano no controle fino do comportamento estendido pelos parasitas. Em condições controladas de laboratório (formigas *Camponotus* infectadas com *O.unilateralis s.l.*) o *biting behavior* (ato de morder a folha) aconteceu no período da manhã e a morte dos hospedeiros ocorreu no início da tarde (DE BEKKER; MERROW; HUGUES 2014). Entretanto, as formigas infectadas manifestaram o display de morder a folha somente quando foram expostas ao ciclo de 24 h de luminosidade e temperatura (DE BEKKER; MERROW; HUGHES, 2014). Evidências de campo em uma floresta tropical da Tailândia também apontam para um alto sincronismo do horário do *death grip*. Isso foi registrado através de observação focal em que as formigas (*Camponotus*) morderam as folhas ao meio dia (*solar noon*) e morreram ao fim da tarde, próximo ao horário do pôr do sol (HUGHES et al., 2011). As formigas do gênero *camponotus* possuem hábitos noturnos em sua maioria (LEVINGS, 1983), porém nossos resultados indicam que os locais de morte de *C.atriceps* infectadas são influenciados pela incidência luminosa. A mudança de comportamento sugere que o fungo parasita é beneficiado pela alteração do horário de atividade das formigas infectadas baseado no maior número de cadáveres e de corpos de frutificação encontrados nas áreas controle.

A luminosidade, embasada pelo ciclo circadiano é ainda um assunto pouco explorado. Mudanças de comportamento por fototaxia é um dos exemplos mais documentados de indução comportamental de parasitas em invertebrados (MOORE, 2002). Estudos agregados às escalas moleculares e aos caracteres físicos ambientais são necessários para avançar o conhecimento sobre a relação entre fungos parasitas e seus hospedeiros. Os resultados encontrados neste trabalho podem servir de referência a estudos futuros sobre a influência da luminosidade no sucesso reprodutivo de fungos parasitas do complexo *O. unilateralis s.l.* Além disso, mais espécies do gênero

Ophiocordyceps podem exibir influência da luz sob o comportamento estendido do parasita em função do seu sucesso reprodutivo.

Referências

AKAIKE, H. On the fallacy of the likelihood principle. **Statistics and probability letters**, v.1, p. 75-78, 1982.

ALENCAR, J. D. C. Análise de associação e estrutura de uma comunidade de Floresta Tropical Úmida, onde ocorre *Aniba rosaeodora Ducke* (Lauraceae). Manaus.

Dissertação (mestrado) INPA/FUA. 206p, 1986.

ALENCAR, J. C. Fenologia de cinco espécies arbóreas tropicais de Sapotaceae correlacionada a variáveis climáticas na Reserva Ducke, AM. **Acta Amazonica**, v. 24, n. (3/4), p. 161–182, 1994.

ANDERSEN, S. B. et al. The Life of a Dead Ant: The Expression of an Adaptive Extended Phenotype. **The American Naturalist**, v. 174, n. 3, p. 424–433, 2009.

ARAÚJO, J. P. M. et al. Unravelling the diversity behind the *Ophiocordyceps unilateralis* (Ophiocordycipitaceae) complex: Three new species of zombie-ant fungi from the Brazilian Amazon. **Phytotaxa**, v. 220, n. 3, p. 224, 2015.

ARTHURS, S.; THOMAS, M. B. Effects of Temperature and Relative Humidity on Sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* in Mycosed Cadavers of *Schistocerca gregaria*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 78, n. 2, p. 59–65, 2001.

BACCARO, F. B. et al. Limited effects of dominant ants on assemblage species richness in three Amazon forests. **Ecological Entomology**, v. 37, n. 1, p. 1–12, 2012.

BATES, D., MÄCHLER, M., BOLKER, B., WALKER, S. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. **Journal of Statistical Software**, v. 67, n.1, p. 1–48, 2015.

BATSCHELET, E. Circular statistics in biology. **Academic Press**, 1981.

BALLARIO, P.; MACINO, G. White collar proteins: PASSing the light signal in *Neurospora crassa*. **Trends in Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 458–462, 1997.

BIRON, D. et al. Behavioural manipulation in a grasshopper harbouring hairworm: a proteomics approach. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 272, n. 1577, p. 2117–2126, 2005.

BREHENY, P., BURCHETT, W. Visualization of Regression Models Using visreg.

URL: <http://myweb.uiowa.edu/pbreheny/publications/visreg.pdf>. R package version 3.1.0., 2013.

BREHENY, P., BURCHETT, W. Visualizing regression models using visreg.

URL: <http://myweb.uiowa.edu/pbreheny/publications/visreg.pd>, 2012.

BREHENY, P., BURCHETT, W. Visualization of Regression Models. URL:

<http://pbreheny.github.io/visreg>, 2017.

CHUNG, T. Y. et al. Zombie ant heads are oriented relative to solar cues. **Fungal Ecology**, v. 25, p. 22–28, 2017.

COMBES, C. Parasitism: The ecology and evolution of intimate interactions. The University of Chicago Press, 2001.

DAWKINS, R. **The Extended Phenotype**. 1 ed. Oxford University. 1982.

DE BEKKER, C.; MERROW, M.; HUGHES, D. P. From behavior to mechanisms: An integrative approach to the manipulation by a parasitic fungus (*Ophiocordyceps unilateralis* s.l.) of its host ants (*Camponotus* spp.). **Integrative and Comparative Biology**, v. 54, n. 2, p. 166–176, 2014.

EVANS, H. C.; ELLIOT, S. L.; HUGHES, D. P. Hidden diversity behind the zombie-ant fungus *ophiocordyceps unilateralis*: Four new species described from carpenter ants in Minas Gerais, Brazil. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, p. 1–9, 2011.

EVANS, H. C.; SAMSON, R. A. Cordyceps species and their anamorphs pathogenic on ants (Formicidae) in tropical forest ecosystems II. The *Camponotus* (Formicinae) complex. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 82, n. 1, p. 127–150, 1984.

EVANS, H.C. Mycopathogens of insects of epigeal and aerial habitats. **Insect-Fungus Interactions**. Academic Press, London, pp. 205–238, 1989.

- FISHER, N.I. Comment on: a method for estimating the standard deviation of wind directions. **Journal of climate and applied meteorology**, v. 22, n. 11, p. 1971-1971, 1983.
- HOOVER, K. et al. A Gene for an Extended Phenotype. **Science**, v. 333, n. 6048, p. 1401–1401, 9 Sep. 2011.
- HUGHES, D. P. et al. Behavioral mechanisms and morphological symptoms of zombie ants dying from fungal infection. **BMC Ecology**, v. 11, n. 1, p. 13, 2011.
- KEARSE, M., MOIR, R., WILSON, A., STONES-HAVAS, S., CHEUNG, M., STURROCK, S., *et al.* Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012.
- LEFEVRE, T., ADAMO, S.A., BIRON, D.G., MISSÉ, D., HUGHES, D., THOMAS, F. Invasion of the body snatchers: The diversity and evolution of manipulative strategies in host-parasite interactions. **Advances in Parasitology**, v.68, p. 45–83, 2009.
- LEVINGS, S. C. Seasonal, annual, and among-site variation in the ground ant community of a deciduous tropical forest: some causes of patchy species distributions. **Ecological Monographs**, v. 53, n. 4, p. 435-455, 1983.
- LINDEN, H.; MACINO, G. White collar 2, a partner in blue light signal transduction, controlling expression of light regulated genes in *Neurospora crassa*. **Embo J.**, v. 16, n. 1, p. 98–109, 1997.
- LIU, Y. J. *et al.* Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. **Molecular Biology Evolution**, v. 16 n. 12, p. 1799-1808. 1999.
- LOROS, J. A kinase for light and time. **Molecular Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 299–302, 2005.
- MOORE, J. Parasites and the behavior of animals. **Oxford series in ecology and evolution**. London (UK): Oxford University Press, 2002.
- ODUOR, G. I. et al. Production and Germination of Primary Conidia of *Neozygites floridana* (Zygomycetes: Entomophthorales) under Constant Temperatures, Humidities, and Photoperiods. **Journal of invertebrate pathology**, v. 68, n. 3, p. 213–22, 1996.

- OLIVEIRA, M. L.; BACCARO, F. B.; BRAGA-NETO, R.; MAGNUSSON, W. E. **Reserva Ducke: A biodiversidade amazônica através de uma grade**. 1 ed. Manaus: Áttema. 2008.
- PONTON, F, LEFEVRE, T, LEBARBENCHON, C. et al. Do distantly related parasites rely on the same proximate factors to alter the behaviour of their hosts? **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 273, p. 2869–2877, 2006.
- PONTON, F. et al. Water-seeking behavior in worm-infected crickets and reversibility of parasitic manipulation. **Behavioral Ecology**, v. 22, n. 2, p. 392–400, 2011.
- PONTOPPIDAN, M. B. et al. Graveyards on the move: The spatio-temporal distribution of dead ophiocordyceps-infected ants. **PLoS ONE**, v. 4, n. 3, p. 1–10, 2009.
- RIBEIRO, M.N.G. Aspectos climatológicos de Manaus. **Acta Amazonica**, v. 6 n. 2, p. 229-233, 1976.
- SCHWERDTFEGGER, C.; LINDEN, H. Blue light adaptation and desensitization of light signal transduction in *Neurospora crassa*. **Molecular Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 1080–1087, 2001.
- TALARICO, M., SEIFERT, F., LANGE, J. et al. Specific manipulation or systemic impairment? Behavioural changes of three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) infected with the tapeworm *Schistocephalus solidus*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v.71, n. 36, p.1-10, 2017.
- THOMAS, F. et al. Do hairworms (Nematomorpha) manipulate the water seeking behaviour of their terrestrial hosts? **Journal of Evolutionary Biology**, v. 15, n. 3, p. 356–361, 2002.
- THOMAS, F., POULIN, R., BRODEUR, J. Host manipulation by parasites: A multidimensional phenomenon. **Oikos**, 119, 1217–1223, 2010.
- VAN HOUTE, S. et al. Baculovirus infection triggers a positive phototactic response in caterpillars: a response to Dobson *et al.* **Biology Letters**, v. 11, n. 10, p. 01-04, 2015.
- VAN HOUTE, S.; ROS, V. I. D.; VAN OERS, M. M. Walking with insects: Molecular mechanisms behind parasitic manipulation of host behaviour. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 13, p. 3458–3475, 2013.

WEHNER, R. Astronavigation in Insects. **Annual Review of Entomology**, v. 29, n. 1, p. 277–298, 1984.

WHITE TJ, BRUNS TD, LEE S, TAYLOR J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A; Gelfand, D.H; Sninsky, J.J.; White, T.J. eds. **PCR protocols, a guide to methods and applications**. San Diego, California: Academic Press. p. 315-322. 1990.

WYSTRACH, A.; GRAHAM, P. What can we learn from studies of insect navigation? **Animal Behaviour**, v. 84, n. 1, p. 13–20, 2012.

Suplementos



Anexo 1. Parcela montada em campo. A imagem mostra a área sombreada ao norte da área controle. Tela de sombreamento (A) utilizada para bloquear parcialmente (80%) a luminosidade. Torres de coleta (B) utilizadas para o suporte dos sensores de dados climáticos locais.