

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ÁREA: MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**O PAPEL DOS MICROFUNGOS ASSOCIADOS AOS JARDINS
DAS FORMIGAS ATTINI
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**

ANDRE RODRIGUES

The background of the lower half of the page is an abstract geometric pattern consisting of overlapping triangles and lines in shades of light blue and white, creating a complex, crystalline structure.

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área: Microbiologia Aplicada).

Rio Claro
2009

ANDRE RODRIGUES

**O PAPEL DOS MICROFUNGOS ASSOCIADOS AOS JARDINS
DAS FORMIGAS ATTINI
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do
Campus de Rio Claro, Universidade Estadual
Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor em
Ciências Biológicas (Área: Microbiologia Aplicada).

Orientador: Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca

Co-orientador: Prof. Dr. Maurício Bacci Jr.

RIO CLARO

2008

595.796 Rodrigues, Andre

R696p O papel dos microfungos associados aos jardins das formigas Attini (Hymenoptera: Formicidae) / Andre Rodrigues. – Rio Claro : [s.n.], 2009

149 f. :il., figs., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Fernando Carlos Pagnocca

Co-orientador: Maurício Bacci Jr.

1. Formiga. 2. Interação inseto-microrganismo. 3. Fungos filamentosos. 4. Antagonismo. 5. Jardim de fungos. 6. *Escovopsis*. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI – Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

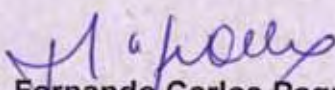
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

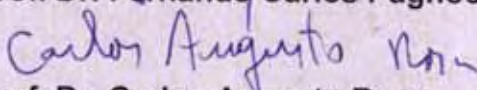
TESE DE DOUTORADO defendida em 12.01.2009

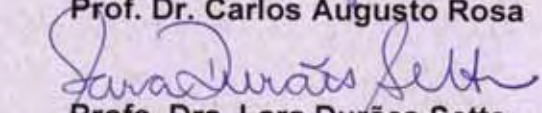
**“O Papel dos Microfungos Associados aos Jardins das Formigas
Attini (Hymenoptera: Formicidae)”**

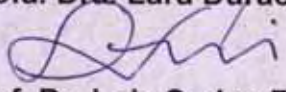
ANDRÉ RODRIGUES

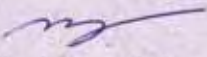
COMISSÃO EXAMINADORA:


Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca


Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa


Profa. Dra. Lara Durães Sette


Prof. Dr. Luiz Carlos Forti


Profa. Dra. Maria José Aparecida Hebling

Procure não se tornar um homem de sucesso, mas um homem de valor

- ALBERT EINSTEIN

A dúvida é o tesouro do cientista

*Dedico esse trabalho a Deus, a minha esposa e a todos os meus amigos que ajudaram a
construir mais um sonho.*

AGRADECIMENTOS

Durante meu doutorado, aprendi que a ciência é construída com idéias e com o esforço de colocá-las em prática. São elas, juntamente com o incessante senso de questionamento, que movem o cientista a entender os fenômenos da natureza. Foi assim que surgiu a presente tese. Em conjunto com meus orientadores, colocamos nossas idéias em prática. Existem muitas pessoas que me ajudaram a concluir esse sonho e que gostaria de manifestar minha gratidão. Assim:

Agradeço a Deus por esse trabalho. Agradeço a minha esposa que comigo venceu e perdeu etapas durante o meu doutorado. À minha família, principalmente meus pais, que sempre me apoiaram e incentivaram a concluir essa tese.

Gostaria de agradecer ao meu orientador e amigo Prof. Fernando C. Pagnocca, que numa bela manhã de janeiro de 2002, aceitou meu pedido para trabalhar em seu laboratório. Sou muito grato a sua pessoa por todas conquistas durante os anos que trabalhei no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS). Agradeço também ao meu co-orientador, Prof. Maurício Bacci Jr., pelas sugestões construtivas nas análises dos meus trabalhos, pelo interesse nessa pesquisa e pelo companheirismo demonstrado durante os anos.

Agradeço ao CNPq pelos auxílios concedidos para realização do meu trabalho. Agradeço especialmente à Capes pela bolsa de doutorado sanduíche que usufruí na University of Texas at Austin (EUA). Durante um ano e meio, tive a oportunidade de trabalhar ao lado do meu supervisor, Dr. Ulrich G. Mueller, que abriu meus olhos para a tamanha complexidade que existe na interação microrganismo – formigas Attini. Em seu laboratório conheci excelentes alunos e colegas, que gostaria de registrar meus agradecimentos: Scott Solomon, Christian Rabeling, Mike Cooper, Alexander Mikheyev, Natalia Biani, Dev Dash, Barrett Klein entre outros.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Área Microbiologia Aplicada) da UNESP – Rio Claro, na pessoa dos coordenadores Prof. Jonas Contiero e Profa. Sandra M. M. Franchetti, que sempre foram receptivos e demonstraram interesse pelo meu trabalho. Agradeço ao Departamento de Bioquímica e Microbiologia, por permitir que eu

ministrasse, na condição de Professor Bolsista, meu primeiro curso de Microbiologia para a graduação.

Agradeço ao pós-doutorando Nilson Satoru Nagamoto do Laboratório de Insetos Sociais-Pragas (UNESP – Botucatu), pelas coletas do material utilizado no Capítulo 4 e a seu orientador, Prof. Luiz Carlos Forti, por apoiar minha pesquisa.

É claro que não posso deixar de mencionar a lista enorme de pessoas do CEIS que fizeram parte da minha vida. Primeiro, agradeço os Profs. Odair C. Bueno, Osmar Malaspina e o supervisor Prof. Mário Sérgio Palma. Agradeço também a Profª. Aline Silva (UESC – BA, viva!) pelas palavras de encorajamento. Agradeço a secretária Necis Miranda que sempre foi prestativa, a Olívia pelo cafezinho de todos os dias. Agradeço ao povo do laboratório: Jocks, Mara, Paula Sanchez, Itamar, Tatiana Carvalho, Carla Carolina, Paula Maria, Nayla, Jacqueline, Cinara, Derlene, Aline, Fábio, Daniel Russ, Eduardo, Diogo, Sandra e a tantas outras pessoas que me ajudaram durante todo meu doutorado.

Agradeço aos outros colegas pós-graduandos que apesar do pouco contato durante esses anos, organizamos em conjunto vários Simpósios de Microbiologia Aplicada que foram importantes na minha formação profissional.

Agradeço ao meu velho amigo, Alessandro Coelho (UFSCar), que sempre demonstrou interesse pelos fenômenos da natureza e colaborou com críticas e sugestões nos meus trabalhos.

RESUMO

As formigas da tribo Attini são conhecidas pela complexa simbiose que mantêm com fungos, os quais cultivam como alimento. É sabido que além desse fungo, outros microrganismos podem ser encontrados nos ninhos desses insetos e estudos prévios apontaram que alguns microfungos (i.e. leveduras e fungos filamentosos) podem ser importantes nessa simbiose. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o papel desses microfungos associados aos jardins dessas formigas. Analisando várias espécies do gênero *Acromyrmex* do sul do Brasil, demonstrou-se que as formigas importam uma comunidade diversa de microfungos para seus ninhos, provavelmente provenientes do solo e do substrato vegetal que as formigas utilizam para cultivar seu fungo. Num segundo estudo, avaliando formigas Attini da América do Norte (*Atta texana*, *Trachymyrmex septentrionalis* e *Cyphomyrmex wheeleri*) observou-se que a estrutura das comunidades de microfungos nos jardins desses insetos não se correlaciona com a variação sazonal, sugerindo que não existam relações espécie-específicas entre as formigas e os microfungos. Apesar de tais microrganismos não serem especialistas dos jardins desses insetos, é sugerido que os microfungos atuem como antagonistas do fungo simbiote. Ainda, descobriu-se que o parasita especializado *Escovopsis* spp. parece ser menos freqüente nas populações de formigas da América do Sul em relação as Attini da América Central, porém estudos adicionais são necessários para estabelecer a epidemiologia desse parasita nos ninhos das Attini. Num terceiro estudo, demonstrou-se que leveduras presentes nos jardins de fungos da formiga cortadeira *A. texana* inibem o crescimento de *Escovopsis* spp., sugerindo que esses insetos utilizam outros microrganismos, além das bactérias presentes em suas cutículas (*Pseudonocardia* spp.), para inibir esse parasita. Esse achado traz importantes implicações para essa simbiose. Finalmente, estudamos as associações entre microfungos e fêmeas aladas de duas espécies de formigas cortadeiras. Os resultados revelaram que no momento que estas deixam os ninhos para a fundação de uma nova colônia abrigam em suas cutículas uma comunidade diversa de fungos filamentosos, porém poucas leveduras. Contudo, não foram encontradas relações espécie-específica entre os microfungos e as fêmeas aladas, indicando que tais insetos atuam somente como vetores de dispersão desses microrganismos. Os resultados certamente terão repercussões na maneira de como compreendemos a simbiose das formigas cultivadoras de fungos.

PALAVRAS CHAVE: antagonismo; leveduras; fungos filamentosos; jardim de fungos; comunidade microbiana; *Escovopsis*

ABSTRACT

Ants in the tribe Attini are well-known social insects that maintain a symbiotic relationship with fungi which they cultivate as food. Besides of the cultivated fungi, fungus gardens contain several other microorganisms considered to be potential players in this symbiosis. The aim of the present study was to evaluate the possible roles of microfungi (i.e. yeasts and filamentous fungi) in attine gardens. Our microbial profiling of gardens from several species in the genus *Acromyrmex* from South Brazil revealed that ants can harbor a diverse community of microfungi that probably originated from the surrounding soil or from the substrate used to manure the cultivated fungus. In this sense, additional studies of North American attine species (*Atta texana*, *Trachymyrmex septentrionalis* and *Cyphomyrmex wheeleri*) demonstrated that the structure of microfungal communities in gardens of these ants did not correlate with seasonal changes over a one year period, again suggesting there are no species-specific relationships among ants and microfungi species. Although, the microfungi are not specialized parasites of the attine ant-fungus symbiosis we suggest they can be considered antagonists to the cultivated fungus. Moreover, we demonstrated that the specialized parasite *Escovopsis* spp. is probably less frequent in South America than in Central America and we reinforce that additional studies are necessary to unravel the epidemiology of this parasite in attine gardens. In another study, we showed that yeasts isolated from gardens of the leafcutter ant *A. texana* can significantly inhibit the growth of *Escovopsis* sp. This interesting finding suggests that attine ants may use additional microbes to protect their gardens against *Escovopsis* spp. and not only actinomycete bacteria (*Pseudonocardia* spp.) found in their cuticles. Finally, we studied microfungi relationships with female alates (gynes) in two leaf-cutting ant's species. Our results demonstrated that gynes can transport a variety of filamentous fungi but few yeast species on their cuticles during the mating flight, probably functioning as vectors of these fungi. Overall, the results presented in this work clearly will influence our current understand of this symbiosis.

KEY WORDS: antagonism; yeasts; filamentous fungi; fungus gardens; microbial community; *Escovopsis*

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	10
INTERAÇÕES ENTRE FORMIGAS DA TRIBO ATTINI E MICRORGANISMOS	
1.1 Resumo	11
1.2 A Tribo Attini.....	11
1.3 Fungicultura das formigas Attini	13
1.4 O parasita dos jardins das formigas Attini	16
1.5 Bactéria protetora no exoesqueleto.....	18
1.6 Comunidade microbiana associada aos jardins de fungos	20
2. RELAÇÃO ENTRE OS CAPÍTULOS	25
3. CAPÍTULO 1	28
MICROFUNGAL “WEEDS” IN THE LEAFCUTTER ANT SYMBIOSIS	
3.1 Abstract.....	30
3.2 Introduction	31
3.3 Material and Methods	33
3.4 Results.....	37
3.5 Discussion.....	39
3.6 Acknowledgements.....	43
4. CAPÍTULO 2	48
ECOLOGIA DOS MICROFUNGOS ASSOCIADOS AOS JARDINS DAS FORMIGAS DA TRIBO ATTINI (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)	
4.1 Resumo	49
4.2 Introdução.....	50
4.3 Material e Métodos	52
4.4 Resultados.....	57
4.5 Discussão	59
4.6 Agradecimentos.....	62

5. CAPÍTULO 3	84
ANTAGONISTIC INTERACTIONS BETWEEN GARDEN YEASTS AND MICROFUNGAL GARDEN PATHOGENS OF LEAF-CUTTING ANTS	
5.1 Abstract.....	86
5.2 Introduction	87
5.3 Material and Methods	89
5.4 Results.....	92
5.5 Discussion.....	94
5.6 Acknowledgements.....	97
6. CAPÍTULO 4	103
YEASTS AND FILAMENTOUS FUNGI CARRIED BY GYNES OF LEAF-CUTTING ANTS	
6.1 Abstract.....	105
6.2 Introduction	106
6.3 Material and Methods	108
6.4 Results.....	111
6.5 Discussion.....	112
6.6 Acknowledgements.....	115
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	120
8. PERSPECTIVAS	123
9. REFERÊNCIAS	125
10. ANEXO	147

1.

INTRODUÇÃO

**INTERAÇÕES ENTRE FORMIGAS DA TRIBO ATTINI E
MICROORGANISMOS**

1.1 Resumo

As formigas da tribo Attini compartilham uma antiga história evolutiva (co-evolução) com fungos que cultivam como alimento. Nessa breve introdução, exploramos as principais características dessa simbiose, bem como as descobertas recentes que alteraram profundamente o conhecimento acumulado em mais de um século de pesquisas. Nesse sentido, além de dois organismos interagindo entre si, estudos recentes revelaram que outros microrganismos estão presentes nos ninhos, participando de uma intrincada rede de interações que provavelmente mantém a estabilidade dessa simbiose. Além disso, apresentamos algumas das questões que permanecem em aberto, as quais foram objeto de estudo na presente tese de doutorado.

1.2 A tribo Attini

As formigas cultivadoras de fungos são insetos sociais pertencentes à tribo Attini (Hymenoptera: Formicidae: subfamília: Myrmicinae), composta por 13 gêneros e aproximadamente 230 espécies (KEMPF, 1972 apud SCHULTZ; MEIER, 1995; BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES, 2001; SCHULTZ; BRADY, 2008). Esse grupo de insetos é encontrado estritamente na região neotropical, apresentando uma ampla distribuição, ocorrendo desde o sul da Argentina até o sul dos Estados Unidos (WEBER, 1966, 1972; MAYHÉ-NUNES; JAFFÉ, 1998). Dentro dessa faixa, as formigas Attini ocorrem nos mais diversos biomas, como por exemplo, na floresta amazônica (SOLOMON et al., 2008) e em ambientes extremos, como o deserto do Arizona (EUA), onde ocorre a formiga *Trachymyrmex arizonensis* (RABELING et al., 2007).

A característica principal desse grupo é o fato dessas formigas cultivarem e se alimentarem de fungos. Comparadas ao homem, essas formigas são consideradas verdadeiras agricultoras, pois nutrem e estimulam o crescimento de seu parceiro, através da adição de substrato e substâncias químicas, sendo chamadas de formigas jardineiras ou formigas cultivadoras de fungos (WEBER, 1972).

O fungo simbiote é o principal alimento das larvas (WEBER et al., 1972). Com um potencial enzimático elevado (RICHARD et al., 2005), o fungo degrada os polissacarídeos vegetais do substrato sendo que os açúcares simples resultantes dessa hidrólise podem ser utilizados pelas operárias como alimento (SILVA et al., 2003), revelando que a simbiose desses insetos também envolve uma integração metabólica. Assim, apesar de outros insetos

sociais tais como, cupins e besouros também cultivarem e se alimentarem de fungos, as formigas da tribo Attini apresentam uma simbiose relativamente complexa, que é objeto de estudo a mais de um século (MÖLLER, 1893; MUELLER; GERARDO 2002; MUELLER et al., 2005).

A tribo Attini é monofilética (SCHULTZ; MEIER, 1995; WETTERER et al., 1998; SCHULTZ; BRADY, 2008) e atualmente considera-se que a fungicultura dessas formigas originou-se através de um único evento que ocorreu no continente sul americano a mais de 50 milhões de anos (MUELLER et al., 2001; SCHULTZ; BRADY, 2008; SOLOMON et al., 2008). Basicamente, existem dois modelos principais que especulam a origem da fungicultura (estes resumidos por MUELLER et al., 2001): No primeiro modelo, considera-se que fungos saprofiticos se desenvolveram no substrato no interior dos ninhos e a partir daí as formigas passaram a se alimentar desses fungos e, conseqüentemente, desenvolveram adaptações para seu cultivo. No segundo modelo, os fungos seriam agentes ativos, os quais utilizariam as formigas como vetores para sua dispersão e somente mais tarde na evolução, as formigas desenvolveram adaptações para o cultivo desses microrganismos.

As formigas cultivadoras de fungos foram anteriormente classificadas em dois grandes grupos filogenéticos (Attini primitivas e Attini derivadas) definidos segundo características do DNA mitocondrial e da morfologia das larvas (SCHULTZ; MEIER, 1995; WETTERER et al., 1998). Recentemente, Schultz e Brady (2008) reconstruíram a história evolutiva das formigas Attini utilizando dados de sequenciamento de quatro genes nucleares bem como dados de fósseis preservados em âmbar (i.e. para fazer a datação dos eventos). Os resultados demonstraram que a tribo divergiu em duas clades (as Paleoattini e Neoattini) a cerca de 50 milhões de anos, confirmando resultados de outros pesquisadores (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). O grupo das “Paleoattini” compreende três gêneros (*Mycocephurus*, *Myrmicocrypta* e *Apterostigma*) morfologicamente distintos que formam um grupo basal monofilético na tribo. No entanto, esses gêneros compartilham certas características em comum, como por exemplo, uma marcante mancha clara nas asas das fêmeas aladas (SCHULTZ; BRADY, 2008). Tais gêneros possivelmente retêm as características mais próximas do ancestral das Attini. O grupo das “Neoattini”, também monofilético, compreende os gêneros primitivos: *Mycetophylax*, *Mycetarotes*, *Mycetasoritis*, *Cyphomyrmex*, *Mycetaphylax* e *Mycetagroicus*. Um grupo de transição dentro das “Neoattini” é composto pelos gêneros *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex* que provavelmente deram origem ao grupo mais derivado dentro da tribo, que é formado pelos gêneros *Acromyrmex* e *Atta*.

Os gêneros considerados primitivos, por exemplo, *Apterostigma*, *Cyphomyrmex* e *Myrmicocrypta*, geralmente possuem colônias pequenas, com poucas câmaras de fungos, com baixo número de indivíduos (100-1000) e as operárias apresentam apenas um tamanho (monomórficas). Por outro lado, gêneros mais derivados como *Acromyrmex* e *Atta*, podem apresentar colônias com várias câmaras subterrâneas de fungos, um elevado número de indivíduos (podendo chegar a milhões de operárias) e as operárias geralmente são polimórficas, apresentando vários tamanhos, dentre eles: operárias de tamanho máxima, médio e mínimo (GONÇALVES, 1961), sendo que cada uma pode apresentar uma função específica na colônia (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; BASS; CHERRETT, 1994; BOT et al., 2001a).

Outra característica comum às formigas Attini é o momento da fundação de uma nova colônia (AUTUORI, 1942; FERNÁNDEZ-MARÍN et al., 2004). Fêmeas e machos alados saem da colônia natal carregando um pequeno fragmento do fungo simbiote, em uma estrutura chamada “cavidade infrabucal”. Após o vôo nupcial, as fêmeas fecundadas (futuras rainhas) iniciam a escavação de uma câmara aonde regurgitam o fragmento de fungo. Dependendo do gênero de formiga, as rainhas podem utilizar diversos substratos para sustentar o frágil micélio que dará início a um novo jardim de fungos; no caso de *Atta* spp. as rainhas depositam o micélio direto no solo (FERNÁNDEZ-MARÍN et al., 2004). Nesse momento crucial da colônia, as rainhas nutrem o fungo com fluído fecal, observado principalmente em *Atta* spp., sendo esse líquido o responsável pelo desenvolvimento inicial do fungo antes da adição de substrato pelas primeiras operárias. Essa adição pode ocorrer somente de três a quatro meses após a fundação da colônia (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Por outro lado, as rainhas de outros gêneros de Attini forrageiam por substrato para seu fungo durante as fases iniciais de fundação de uma nova colônia (FERNÁNDEZ-MARÍN et al., 2004).

1.3 Fungicultura das formigas Attini

Invariavelmente, as formigas Attini cultivam o fungo simbiote numa estrutura de coloração esbranquiçada chamada de “jardim de fungos”, que é constituída pelo substrato coletado e finamente dividido pelas operárias, além do micélio do fungo simbiote (Figura 1).

Os fungos cultivados por todas as Attini, com exceção de um grupo dentro do gênero *Apterostigma*, são basidiomicetos da família Lepiotaceae, relacionados com o gênero *Leucoagaricus* (SINGER et al., 1986; CHAPELA et al., 1994; MUELLER et al., 1998).

Chapela et al. (1994) classificaram os fungos desses insetos em quatro grandes grupos, a saber: G1, que são os fungos cultivados pelas formigas Attini derivadas (*Atta* spp., *Acromyrmex* spp., *Trachymyrmex* spp. e *Sericomyrmex* spp.), G2: são os fungos cultivados por um subgrupo de *Apterostigma* spp., G3: são os fungos cultivados por todos os outros gêneros de Attini primitivas e G4: são os fungos cultivados por um segundo subgrupo de *Apterostigma* sp.

Assim, as Attini primitivas e derivadas praticam diferentes tipos de fungicultura, sendo classificadas segundo o tipo de fungo (G1, G2, G3 ou G4) que cultivam e os substratos utilizados para sua manutenção (CHAPELA et al., 1994; SCHULZT; BRADY 2008). Portanto, as várias agriculturas (ou fungiculturas) podem ser definidas como: (i) a agricultura primitiva desempenhada por gêneros de Attini primitivas; (ii) a agricultura de algumas espécies do gênero *Apterostigma* que cultivam fungos filogeneticamente diferentes das demais formigas (os chamados “Coral fungi”); (iii) um grupo de formigas que cultivam leveduras (ex: formigas do grupo *Cyphomyrmex rimosus*); (iv) a agricultura das formigas Attini derivadas e, finalmente (v) um grupo dentro das formigas derivadas que se adaptaram ao cultivo de fungos especializados (gêneros de formigas cortadeiras).

A agricultura primitiva é realizada pelos gêneros *Apterostigma*, *Mycocepurus*, *Myrmicocrypta*, *Mycetophylax*, *Mycetarotes*, *Mycetasoritis* e *Cyphomyrmex*. Tais gêneros cultivam fungos G3 e utilizam carcaças, fezes de insetos ou até mesmo matéria vegetal morta como substrato para cultivar o fungo simbiote. Apesar do gênero recentemente descrito por Brandão e Mayé-Nunes (2001), *Mycetagroicus* spp., ser filogeneticamente próximo às Attini primitivas, nada se conhece a respeito de qual fungo essas formigas cultivam. O ponto central desse tipo de fungicultura foi o relatado por Mueller et al. (1998). Os autores observaram que formigas não relacionadas filogeneticamente podem cultivar fungos idênticos e que espécies de formigas muito aparentadas, às vezes, podem cultivar fungos geneticamente diferentes. Essas e outras observações forneceram evidências de que as formigas primitivas podem adquirir fungos de outras formigas (GREEN et al., 2002) ou até mesmo do ambiente (MUELLER et al., 1998) e assim, o sistema de agricultura dessas formigas parece ser aberto a aquisições de novos fungos.

Um segundo tipo de fungicultura é o apresentado pelas formigas *Apterostigma* spp. Sendo um grupo de Attini basal, ao longo da evolução, uma linhagem de *Apterostigma* sp. permaneceu cultivando os mesmos fungos G3 da família Lepiotaceae, porém uma outra linhagem que posteriormente se dividiu em duas, cultivam fungos da família Pterulaceae (fungos dos grupos G2 e G4), relacionados com os gêneros basidiomicetos *Pterula* e

Deflexula (MUNKASCI et al., 2004; VILLESEN et al., 2004). Essa substituição de fungos aparentemente ocorreu uma única vez na evolução das Attini e o gênero *Apterostigma* é considerado modelo para o estudo de interações parasito-hospedeiro (descrito na próxima seção, GERARDO et al., 2006a).

O terceiro tipo de fungicultura é característico de um pequeno grupo de formigas chamado de “grupo *Cyphomyrmex rimosus*” que compreende aproximadamente 12 espécies. Diferentemente de todas as formigas Attini que cultivam seus fungos na forma micelial, essas formigas cultivam fungos em forma de levedura, ou seja, fungos unicelulares (MURAKAMI; HIGASHI, 1997; MUELLER et al., 1998). Pouco se conhece a respeito desse tipo de fungicultura, porém, sabe-se que fungos de vida livre da família Lepiotaceae possuem seqüências idênticas a tais leveduras, sendo, portanto considerados fungos G3 (MUELLER et al., 1998). Isso leva a questões de como as formigas conseguem manipular e transformar o crescimento desses fungos.

O quarto tipo de fungicultura é apresentado pelos gêneros derivados de Attini, *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex*. Esses gêneros cultivam fungos do tipo G1 que se originaram dos fungos G3 das Attini primitivas (CHAPELA et al., 1994) e apresentam adaptações morfológicas interessantes. Uma delas é a presença de uma vesícula na extremidade das hifas do fungo, denominada “gongilídeo” (Figura 2) que contém nutrientes necessários para alimentar principalmente as larvas que dependem dessa estrutura para sua nutrição (WEBER, 1972). Esse tipo de fungicultura foi a base para a evolução de um tipo que é o mais derivado. Esse é a fungicultura praticada pelas formigas cortadeiras *Atta* spp. e *Acromyrmex* spp. que cortam e coletam folhas e flores frescas para cultivar seu fungo simbiote. Tais formigas são consideradas pragas no continente americano (FOWLER et al., 1990; DELLA LUCIA; FOWLER, 1993), pois atacam pastagens e áreas cultivadas, sendo responsáveis, por um impacto negativo na economia de certos países, dentre eles, o Brasil. Ao contrário das Attini primitivas, a fungicultura das Attini derivadas parece ser mais fechada em relação a aquisição de novos cultivares do ambiente ou de outras formigas. Apesar de ser observada a troca de cultivares entre formigas cortadeiras no laboratório (ADAMS et al., 2000; BOT et al., 2001b), essa substituição parece não ser freqüente na natureza (MUELLER, 2002).

O fungo cultivado pelas formigas pode ser considerado como uma monocultura. Silva-Pinhati et al. (2004) e Mikheyev et al. (2006) demonstraram que o fungo simbiote de quase todas as formigas cortadeiras pode ser considerado uma única espécie que está distribuída em uma ampla área geográfica no continente americano. Apesar de Mikheyev e colaboradores (2006) encontrarem evidências moleculares que tais fungos possuem a capacidade de se

reproduzirem, parece que o fungo raramente entra no estágio reprodutivo (PAGNOCCA et al., 2001; MUELLER, 2002). Além disso, esses mesmos autores concluem que os jardins das formigas Attini são compostos de apenas um clone do fungo simbiote. Vários são os mecanismos que podem explicar esse fato (MUELLER, 2002), porém dados adicionais demonstraram que tanto a formiga, quanto o fungo possuem várias estratégias para evitar que outros fungos simbiotes sejam cultivados simultaneamente. Com experimentos *in vitro*, Poulsen e Boomsma (2005) demonstraram a incompatibilidade micelial entre fungos simbiotes de *Acromyrmex octospinosus* e *Acromyrmex echinator* provenientes de diversas colônias e ainda, demonstraram que o fluido fecal das operárias dessas colônias está diretamente relacionado com o mecanismo que assegura a compatibilidade entre formiga e fungo, ao permitir que apenas um dos clones se desenvolva nos jardins, pois fungos de *A. octospinosus* não crescem (ou se desenvolvem fracamente) na presença de fluido fecal de *A. echinator* e vice-versa.

O cultivo de apenas uma única linhagem de fungo nos ninhos evita a competição entre diferentes estirpes. Entretanto, teorias evolutivas (HAMILTON et al., 1990) postulam que populações com diversidade genética restrita, como é o caso dos fungos simbiotes, são mais propensas a serem atacadas por parasitas e patógenos. Assim, semelhantemente à agricultura mantida pelo homem, as formigas da tribo Attini apresentam em seus jardins de fungos parasitas que podem prejudicar a simbiose (CURRIE et al., 1999a; CURRIE, 2001a).

1.4 O parasita dos jardins das formigas Attini

Considerado parasita especializado do fungo simbiote, fungos do gênero *Escovopsis* (Ascomycota: Hypocreales) são anamorfos (i.e. fungos que apresentam somente a fase assexuada de reprodução) encontrados nos jardins de quase todas as formigas Attini (CURRIE et al., 1999a). Quando presentes, esses fungos podem ocasionar um decréscimo no acúmulo de biomassa do jardim, diminuição na produção de pupas, larvas e operárias; assim levando a um retardo no crescimento da colônia (CURRIE, 2001b). Evidências sugerem que *Escovopsis* é um fungo micoparasita, que se alimenta indiretamente das hifas do fungo simbiote (REYNOLDS; CURRIE, 2004).

Escovopsis spp. parece ser abundante nos ninhos das Attini. Currie et al. (1999a) observaram que 33 – 51,4 % dos ninhos de diferentes Attini coletadas na América Central estavam infectados com o parasita. Ainda, Gerardo et al. (2006a) estudando formigas do gênero *Apterostigma* observaram que 11 – 67 % das colônias estavam infectadas com esse

fungo. Por outro lado, analisando populações de *A. sexdens rubropilosa* e *Acromyrmex* spp. na América do Sul, Rodrigues et al. (2005a, 2008a) demonstraram que as taxas de infecção dos ninhos são menores (15 – 27 %) e que outros fungos além de *Escovopsis* spp. podem predominar nos ninhos desses insetos. Os estudos acima demonstram uma grande variabilidade nas taxas de infecção, sendo em alguns casos, bastante elevada. Contudo, as técnicas de isolamento de microfungos utilizada por esses pesquisadores foram diferentes. Assim, estudos sistemáticos são necessários para revelar a real abundância desse parasita nos ninhos das formigas Attini.

Sabe-se que *Escovopsis* spp. compartilha uma antiga história evolutiva com as formigas e seus fungos (CURRIE et al., 2003c). Considerando os tipos de fungicultura, cada um deles parece ser parasitado por linhagens diferentes de *Escovopsis* spp. (CURRIE et al., 2003c), o que significa existirem linhagens de *Escovopsis* spp. mais propensas a infectarem os jardins de fungos das formigas cortadeiras do que jardins das Attini primitivas, por exemplo. Esse nível de especificidade também pode ser encontrado nas formigas Attini primitivas (GERARDO et al., 2004). A natureza dessa especificidade pode ser explicada por quimiotaxia do parasita, onde o fungo simbiote libera substâncias que são prontamente reconhecidas por *Escovopsis* spp. que usualmente infectam os ninhos desses insetos (GERARDO et al., 2006b). Levando em consideração essa especificidade, era de se esperar que as filogenias de *Escovopsis* spp. e do fungo simbiote fossem topologicamente congruentes (i.e. semelhantes a uma imagem de espelho). Porém, isso não acontece, pois *Escovopsis* spp. de Attini muito primitivas como é o caso de *Apterostigma* spp. são mais relacionados (grupo irmão) com *Escovopsis* das Attini derivadas (GERARDO et al., 2006a). Isso sugere que ao longo da evolução entre esses dois organismos, ocorreram muitas transferências entre linhagens de *Escovopsis* spp. de várias formigas. Outro exemplo disso é o fato das formigas cortadeiras *Atta* spp. e *Acromyrmex* spp. compartilharem linhagens semelhantes, ou em alguns casos idênticas, do parasita *Escovopsis* spp. (TAERUM et al., 2007).

Até o momento, poucas espécies do gênero *Escovopsis* foram descritas. O primeiro pesquisador a observar esse fungo foi Möller (1893) que naquela época identificou esse fungo como sendo uma fase anamórfica do fungo simbiote. Mais tarde, Muchovej e Della Lucia (1990) descreveram a primeira espécie, *Escovopsis weberi*, isolada de um ninho de *Atta* sp. no Brasil. Posteriormente, Seifert et al. (1995) descreveram uma outra espécie, *Escovopsis aspergilloides*, isolada de *Trachymyrmex ruthae* em Trinidad. Além dessas espécies, muitas outras aguardam descrição (CURRIE, 2001a), mostrando que realmente esse fungo apresenta uma grande diversidade e uma história evolutiva em comum os fungos simbiotes. A exemplo

disso, Gerardo et al. (2006a) encontraram quatro tipos de *Escovopsis* spp. que infectam os ninhos de *Apterostigma* spp. Esses tipos foram definidos segundo a coloração dos esporos (marrom, amarelo, rosa e branco) e não representam espécies formalmente descritas, porém demonstra a diversidade do grupo. Outro dado interessante observado em *Apterostigma* spp., é o fato de *Escovopsis* spp. ocasionar infecções múltiplas; ou seja, diferentes linhagens do parasita presentes na mesma colônia (GERARDO et al., 2006a), sendo observadas em 10% dos ninhos estudados no Panamá (n=350).

Apesar dos trabalhos recentes sobre esse fungo, muitas questões ainda permanecem sem resposta. Por exemplo, (i) estudos epidemiológicos são necessários para caracterizar a taxa de infecção desse parasita de maneira sistemática, pois muitos estudos utilizaram diferentes técnicas de amostragem (CURRIE et al., 1999a; GERARDO et al., 2006a; RODRIGUES et al., 2008a); (ii) não se conhece o reservatório natural desse parasita; (iii) nada se sabe sobre seu ciclo de vida ou transmissão entre colônias; embora quanto a este último aspecto, Currie e colaboradores (1999a) sugerem que *Escovopsis* sp. seja transmitido horizontalmente através de outros insetos que visitam os ninhos; (iv) ainda não se sabe se esse fungo reproduz sexuadamente na natureza (i.e. fase teleomórfica).

1.5 Bactéria protetora no exoesqueleto

Currie et al. (1999b) relataram a presença, em vários gêneros de formigas da tribo Attini, de actinomicetos que vivem na cutícula das operárias. Anteriormente descritos como *Streptomyces* sp. (CURRIE et al. 1999b), tais bactérias filamentosas são pertencentes ao gênero *Pseudonocardia* (família Pseudonocardiaceae) e são encontradas em locais específicos no corpo das operárias (CURRIE et al., 1999b; CURRIE et al., 2003b; CAFARO; CURRIE, 2005). Em alguns gêneros de Attini, as bactérias podem ser encontradas na propleura ou na superfície do mesossoma, onde foram observadas cavidades que abrigam essas bactérias e que provavelmente sustentam o crescimento das mesmas, pois glândulas exócrinas estão associadas a essas estruturas (CURRIE et al., 2006). Em formigas do gênero *Atta*, *Pseudonocardia* sp. é raramente encontrada (ZHANG et al., 2007) ou pode estar completamente ausente (CURRIE et al., 1999b; MUELLER et al., 2008).

Admite-se que as bactérias do gênero *Pseudonocardia* isoladas de formigas Attini desempenham várias funções nos ninhos, sendo o estímulo do crescimento do fungo simbiote uma delas (CURRIE et al., 1999b). Entretanto, a principal função sugerida por Currie e colaboradores (1999b) é a de produzir substâncias que seletivamente inibem o

crescimento de *Escovopsis* spp., protegendo a colônia contra a ação desse fungo. Infectando ninhos de laboratório com esporos de *Escovopsis* sp. juntamente com esporos de *Pseudonocardia* sp. Currie et al. (2003a) demonstraram que tais ninhos tiveram um maior acúmulo de biomassa quando comparado com ninhos nos quais somente foi inoculado esporos do fungo parasita, demonstrando, portanto, a função protetora de *Pseudonocardia* spp. Ainda, actinomicetos com atividade antimicrobiana contra *Escovopsis* spp. também foram encontrados na cavidade infrabucal de operárias de *Trachymyrmex* cf. *zeteki*, porém os autores não identificaram esses microrganismos (LITTLE et al., 2006).

Diferente da transmissão do parasita, *Pseudonocardia* spp. parece ser transmitido verticalmente (da colônia parental para a colônia filha, CURRIE et al., 1999b), sendo que as fêmeas aladas carregam o inóculo da bactéria em suas cutículas e após a fundação do ninho, as futuras rainhas transmitem horizontalmente o actinomiceto para as operárias recém emergidas (POULSEN et al., 2003). Esta associação entre *Pseudonocardia* spp. e formigas parece ser específica. Quando linhagens de *Pseudonocardia* spp. nativas de uma colônia são apresentadas juntamente com linhagens isoladas de outra espécie de formiga (linhagens não nativas), as operárias tem a preferência por manterem a linhagem nativa em suas cutículas (ZHANG et al., 2007).

Devido aos efeitos protetores e ao modo de transmissão dessa bactéria, vários pesquisadores sugerem veementemente que *Pseudonocardia* co-evoluiu com as formigas a milhares de anos (CURRIE, 2001a; POULSEN; CURRIE, 2006), de maneira que somente houve apenas uma única aquisição por parte das formigas desde a origem da simbiose. Esse cenário leva a expectativa de que as filogenias da bactéria e das formigas sejam congruentes. Essa idéia corrobora os resultados de Poulsen et al. (2005) que relataram a presença de apenas uma única linhagem de actinomiceto nos ninhos, que se diversificou ao longo do tempo. Contudo, esses mesmos autores observaram que populações simpátricas de *A. octospinosus* e *A. echinator* compartilham um pool de linhagens de *Pseudonocardia* spp., revelando que existe transmissão horizontal desse microrganismo entre ninhos. Portanto, parece não existir uma co-evolução estrita entre esses dois organismos (CAFARO; CURRIE, 2005). Além disso, já foi observado que muitas linhagens de *Pseudonocardia* spp. não apresentam atividade contra *Escovopsis* (POULSEN et al., 2007), o que não seria esperado se realmente esses microrganismos co-evoluíram com seus hospedeiros. Portanto, após uma década de pesquisa, é levantado o questionamento se realmente as bactérias associadas às Attini compartilham uma antiga história evolutiva com esses insetos, e se sua presença no corpo das

formigas visa exclusivamente ao controle do parasita *Escovopsis* spp. (MUELLER et al., 2008).

Num estudo interessante, Kost et al. (2007) demonstraram que várias linhagens de actinomicetos isolados de *A. octospinosus* tem o potencial de inibir o crescimento de *Escovopsis* sp. O interessante nos dados desses autores, foi constatar que actinomicetos isolados de formigas não relacionadas com Attini (*Myrmica rugulosa* e *Lasius flavus*) também apresentaram efeito inibitório contra *Escovopsis* sp. Porém, os autores não identificaram os actinomicetos (que supostamente tratam-se de *Streptomyces* sp.) tanto das Attini, quanto das outras formigas estudadas. Mesmo assim, os resultados desses autores demonstram que não somente *Pseudonocardia* sp. apresenta efeito antagonista em relação a *Escovopsis* sp., mas outros microrganismos também possuem o mesmo potencial. Esses autores sugerem que a proteção dos ninhos seria realizada através de vários microrganismos, os quais as formigas continuamente adquirem (ou “recrutam”) do ambiente e armazenam em suas cutículas. Portanto, a noção de que existe uma co-evolução entre as formigas e *Pseudonocardia* sp. já é alvo de críticas e precisa ser revista (MUELLER et al., 2008).

Recentemente, Little e Currie (2007) descreveram o que é considerado o quinto simbiote em associação com as formigas Attini. Trata-se de uma levedura negra (relacionada com o gênero *Phialophora*) encontrada nas cutículas das operárias e que possivelmente agiria como um parasita, desestabilizando a associação entre formiga – *Pseudonocardia*. Nesse ponto, tais leveduras utilizariam os actinomicetos, ou algum produto por eles gerado, como fonte de nutrientes (LITTLE; CURRIE, 2008); no entanto, estudos adicionais são necessários para avaliar o real papel dessas leveduras nas cutículas das formigas.

1.6 Comunidade microbiana associada aos jardins de fungos

O jardim de fungos das formigas Attini pode ser considerado um microambiente que abriga uma comunidade de microrganismos (MUELLER et al., 2005; YOUNGSTEADT, 2008). Além do fungo simbiote e do *Escovopsis* spp., outros microrganismos podem ser frequentemente encontrados nos jardins de fungos desses insetos (Figura 1). Assim, existem muitos relatos de bactérias (KYIAN et al., 1969; TAUK; SEZERDELLO, 1975; BACCI et al., 1995; van BORM et al., 2002), leveduras (Craven et al., 1970; FISHER et al., 1996; CARREIRO et al., 1997) e fungos filamentosos (MÖLLER, 1893; KREISEL, 1972; LUCIANO et al., 1995; FISHER et al., 1996; van BORM et al., 2002; RODRIGUES et al., 2005a,b) presentes nos jardins desses insetos. Esses microrganismos foram considerados por

muito tempo contaminantes da fungicultura das formigas Attini (WEBER, 1955; POULSEN; CURRIE, 2006).

Apesar de relatar a presença desses microrganismos, poucos foram os estudos que investigaram o papel deles na simbiose. Assim, é possível que tanto bactérias, quanto os outros fungos encontrados nesse ambiente exerçam funções específicas, como a digestão do substrato vegetal nos jardins de fungos, produção de nutrientes essenciais para as formigas, ou mesmo a produção de substâncias que atuem no controle de microrganismos indesejáveis à cultura do fungo simbiote (MUELLER et al., 2005).

Nesse sentido, bactérias do gênero *Burkholderia* (Figura 1), isoladas de jardins de fungos de ninhos de campo de *A. sexdens rubropilosa* são capazes de produzir antifúngicos que inibem a germinação de esporos de *Metarhizium anisopliae* e *Escovopsis* spp. (SANTOS et al., 2004). Não se sabe detalhes da associação dessa bactéria com as formigas, pois somente foi encontrada em uma espécie de formiga cortadeira; porém, estudos como esse sugerem que existam nas colônias das Attini vários microrganismos a serem estudados, bem como muitas interações microrganismo-microrganismo e microrganismo-inseto a serem caracterizadas.

Assim, a busca por microrganismos presentes nos ninhos das formigas resultou na descrição de duas novas espécies de leveduras, *Cryptococcus haglerorum* (MIDDELHOVEN et al., 2003) e *Symptodiomyces attinorum* (CARREIRO et al., 2004). Foi demonstrado que as leveduras bem como bactérias isoladas de ninhos de laboratório de *Atta sexdens rubropilosa* hidrolisam os polissacarídeos presentes no material vegetal dos jardins de fungos (BACCI et al., 1995; CARREIRO, 2000). Desse modo, foi sugerido que tais microrganismos provavelmente auxiliem o fungo simbiote na degradação das folhas, facilitando o acesso do mesmo aos nutrientes presentes dentro da matéria vegetal. Além disso, Carreiro et al. (2002) verificaram que as leveduras presentes nos jardins de fungos podem inibir o crescimento de outras através da produção de proteínas de baixo peso molecular (i.e. toxinas killer), sugerindo que tal mecanismo pode ser responsável por selecionar as populações de leveduras nos jardins de fungos.

Com exceção dos estudos recentes sobre *Escovopsis* spp., pouco é sabido sobre outros microfungos associados aos jardins. Fisher et al. (1996) demonstraram que em ninhos de *Atta cephalotes*, os microfungos aí presentes são transitórios e são comumente encontrados nas folhas forrageadas pelas operárias. Barbosa (2004) também demonstrou que jardins de fungos de *Atta laevigata* podem ser contaminados com diversos fungos filamentosos, dentre eles *Trichoderma* spp. e *Penicillium* spp. Por outro lado, Rodrigues et al. (2005a, 2008) determinaram que a maioria dos microfungos encontrados nos jardins de *A. sexdens*

rubropilosa e de formigas do gênero *Acromyrmex*, pertence a gêneros comumente encontrados no solo. Alguns desses fungos, tais como *Syncephalastrum racemosum*, encontrado em ninhos de laboratório, e *Trichoderma harzianum*, isolado de ninhos de campo, foram isolados com elevada frequência (56 e 38%, respectivamente). O microfungo *Cunninghamella* sp. também parece estar associado às formigas cortadeiras, e foi observado que esse fungo pode crescer nos jardins rapidamente na ausência das operárias (RODRIGUES et al., 2005a). Como esses microrganismos somente se desenvolvem em determinadas circunstâncias nos jardins de fungos, é provável que eles atuem como antagonistas do fungo simbiote, como demonstrado por Silva e colaboradores (2006a) em experimentos *in vitro*. Essas informações são relevantes, pois poderão servir de base para o desenvolvimento de métodos alternativos de controle de algumas das Attini cortadeiras.

Do exposto, fica claro que os jardins de fungos podem abrigar vários microrganismos. Assim, todos os organismos envolvidos nessa simbiose podem, em conjunto, serem os responsáveis por manter a estabilidade dos ninhos (STOW; BEATTIE, 2008). No entanto, muitas questões ainda permanecem sem resposta: (i) os microfungos antagonistas encontrados nos ninhos ocorrem em outras formigas da tribo Attini em diferentes locais? (ii) como se comporta a microbiota em face ao ambiente dinâmico que são os jardins de fungos?; (iii) existem outros microrganismos nos jardins que auxiliam na proteção dos ninhos? e (iv) qual é a origem dos microrganismos encontrados no jardim? Essas questões foram alvo do presente trabalho.

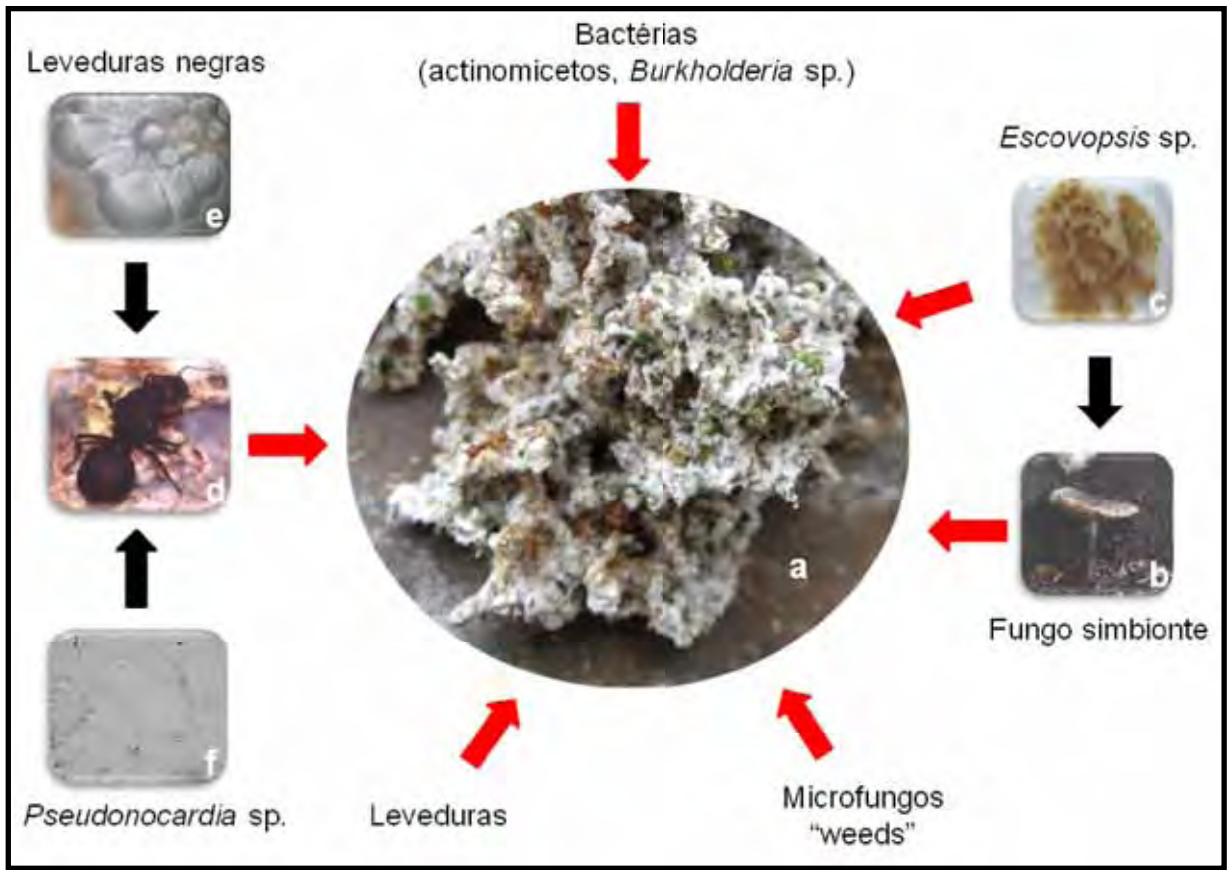


Figura 1. Esquema geral relacionando as interações entre as formigas Attini e microrganismos. a) jardim de fungos; b) fungo simbiote (representado pela estrutura de reprodução sexuada, que é rara na natureza – Foto por Fernando C. Pagnocca); c) parasita especializado, *Escovopsis* sp.; d) Rainha de *Atta sexdens rubropilosa*; e) levedura negra (extraído de Little e Currie, 2007); f) *Pseudonocardia* sp. (foto por Etienne Favarin) Setas vermelhas: indicam os microrganismos presentes nos jardins de fungos. Actinomicetos produtores de antibióticos e leveduras podem ser encontrados nos jardim de fungos, porém sua função ainda é desconhecida. Setas pretas: indicam relações (mutualismo ou parasitismo) entre os organismos.

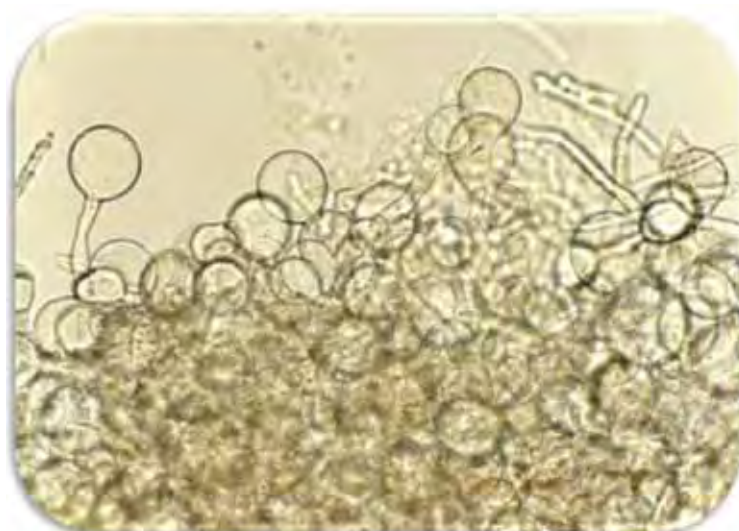


Figura 2. Fotomicrografia apresentando as vesículas (gongilídeos) nas extremidades das hifas do fungos simbiote das formigas cortadeiras. As operárias alimentam as larvas com essas estruturas, as quais são totalmente dependentes para nutrição. Foto por Fernando Carlos Pagnocca.

2.***RELAÇÃO ENTRE OS CAPÍTULOS***

O tema central do presente trabalho foi analisar a microbiota fúngica associada aos ninhos das formigas Attini utilizando métodos dependentes de cultivo. No esforço de abranger esse amplo e fascinante assunto, este estudo foi dividido em quatro capítulos.

O Capítulo 1 complementa trabalhos prévios (RODRIGUES et al., 2005a,b), os quais revelaram que várias espécies de microfungos são encontradas em maior frequência que o parasita *Escovopsis* spp. em ninhos de *Atta sexdens rubropilosa*. Entretanto, estes dados foram obtidos para uma pequena população de formigas do estado de São Paulo. Para responder à pergunta se os microfungos encontrados também estão associados a outras espécies de formigas cortadeiras, o Capítulo 1 traz um estudo baseado em uma maior amostragem de jardins de várias espécies do gênero *Acromyrmex* do estado do Rio Grande do Sul, que coletam diferentes tipos de substrato (monocotiledôneas e dicotiledôneas) e apresentam diferentes tipos de ninhos (i.e. subterrâneos e superficiais). Os resultados indicaram um grande número de microfungos associados aos jardins desses insetos. Nesse capítulo foi possível confirmar que muitos dos microfungos presentes nos jardins dessas formigas, principalmente *Cunninghamella* spp. e *Fusarium oxysporum*, são provenientes do solo ou do substrato coletado pelas operárias para cultivar o fungo simbiote. Os resultados revelaram não haver uma correlação entre espécies de microfungos, tipo de substrato coletado, a estrutura dos ninhos e espécies de formigas. Foi demonstrado que o parasita *Escovopsis* spp. parece ser encontrado em menor frequência e, ainda, apresentamos indícios que existe uma sub-população desse fungo parasitando os jardins dessas formigas. Apesar dos microfungos encontrados serem comumente dispersos no ambiente, é sugerido que esses microrganismos possam atuar como antagonistas (“weeds”, ou seja, como “ervas daninhas”) na agricultura das formigas Attini. Conclui-se que tais microrganismos antagonistas são oportunistas (parasitas ocasionais) e não parasitas especializados como o observado para o fungo *Escovopsis* spp.

Considerando os microfungos como possíveis antagonistas, no Capítulo 2 tentou-se avaliar se tais microrganismos estão presentes nos jardins de diferentes formigas Attini (incluindo Attini primitivas e derivadas) localizadas em outras regiões do continente americano. A questão principal foi avaliar se existem associações espécie-específicas e duradouras entre microfungos e as formigas Attini. Dessa maneira, jardins de três espécies de formigas norte-americanas (*Cyphomyrmex wheeleri*, *Trachymyrmex septentrionalis* e *Atta texana*) foram avaliados quanto à presença de microfungos durante o período de um ano (nas várias estações). Semelhante aos resultados do Capítulo 1, os dados revelaram que os jardins dessas formigas entram em contato com uma elevada diversidade de microfungos, que não

estabelecem relações espécie-específicas com as formigas. Apesar de não haver correlação entre a diversidade de microfungos e as estações do ano, ao contrário dos resultados obtidos no capítulo anterior, cada espécie de formiga apresentou uma comunidade particular, sendo que *T. septentrionalis* e *A. texana* tiveram a tendência de compartilhar comunidades mais homogêneas, sendo o tipo de substrato coletado por essas formigas o provável fator para explicar as diferenças encontradas. *Escovopsis* spp. não foi isolado em nenhum dos ninhos avaliados (n= 36) em diferentes estações do ano, sugerindo que o parasita não é freqüente nos ninhos de Attini do hemisfério norte, quando comparadas com populações da América Central e do Sul.

Em face dos vários microrganismos (*Pseudonocardia* spp. e *Burkholderia* spp.) que podem auxiliar na proteção dos ninhos das formigas Attini, o Capítulo 3 explorou se leveduras isoladas dos jardins de *A. texana* possuem efeito inibitório contra os principais microfungos antagonistas desses insetos. Supõe-se, que as leveduras desempenham funções vitais nos ninhos. Assim, observou-se que os jardins desse inseto abrigam uma comunidade de leveduras de origem diversa e surpreendentemente, constatou-se que membros dessa comunidade podem inibir o desenvolvimento de vários microfungos antagonistas, incluindo *Escovopsis* spp. O fato de existirem leveduras presentes no jardim capazes de inibir esse parasita, tem impactos significativos na maneira como as formigas protegem seus ninhos. Tal aspecto é discutido no Capítulo 3.

Finalmente, apesar dos insetos servirem de vetores para os mais variados microrganismos, nenhum estudo avaliou a possibilidade de fêmeas aladas das formigas Attini de transportarem microrganismos de interesse para a simbiose. Dessa maneira, o intuito do Capítulo 4 foi o de avaliar se fêmeas aladas de *Atta capiguara* e *Atta laevigata* transmitiam leveduras e fungos específicos. Os resultados demonstraram que as futuras rainhas, ao saírem do ninho parental, carregam diversos fungos filamentosos e poucas leveduras em suas cutículas. Além disso, o exame dos pellets carregados pelas fêmeas na cavidade infrabucal revelou que esses insetos transportam o fungo cultivado e poucos microrganismos contaminantes. Esses resultados confirmaram estudos anteriores (CURRIE et al., 1999a), os quais relataram a ausência de *Escovopsis* spp. nas fêmeas aladas de formigas cortadeiras.

3.***CAPÍTULO 1*****MICROFUNGAL “WEEDS” IN THE LEAFCUTTER ANT
SYMBIOSIS**

Microfungal “weeds” in the leafcutter ant symbiosis

A Rodrigues^{1,2}, M Bacci Jr^{1,2} ✉, UG Mueller³, A Ortiz⁴ and FC Pagnocca^{1,2}

(1) Center for the Study of Social Insects, UNESP – São Paulo State University, Rio Claro, SP 13506-900, Brazil (e-mail: andrer@rc.unesp.br)

(2) Department of Biochemistry and Microbiology, UNESP – São Paulo State University, Rio Claro, SP 13506-900, Brazil (e-mail: pagnocca@rc.unesp.br)

(3) Section of Integrative Biology, University of Texas at Austin, Austin, TX 78712, USA (e-mail: umueller@mail.utexas.edu)

(4) Conservación, Usos y Biodiversidad, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, AA 3840, Colombia (e-mail: aortizr@une.net.co)

✉ Correspondence to:

Maurício Bacci Jr.

Centro de Estudos de Insetos Sociais, Universidade Estadual Paulista

Av. 24A, n. 1515 – Bela Vista, Zip Code: 13506-900 – Rio Claro – Brazil.

Tel.: +55 19 3526-4165 ; fax: +55 19 3534-8523 ; e-mail: mbacci@rc.unesp.br

Submission date: August 8th, 2007.

Submission date of the 1st revised version: November 23rd, 2007.

Submission date of the 2nd revised version: February 12th, 2008.

Running head: *Microfungi in attine gardens*

3.1 Abstract

Leafcutter ants (Formicidae: tribe Attini) are well known insects that cultivate basidiomycete fungi (Agaricales: Lepiotaceae) as their principle food. Fungus gardens are monocultures of a single cultivar strain, but they also harbor a diverse assemblage of additional microbes with largely unknown roles in the symbiosis. Cultivar-attacking microfungi in the genus *Escovopsis* are specialized parasites found only in association with attine gardens. Evolutionary theory predicts that the low genetic diversity in monocultures should render ant-gardens susceptible to a wide range of diseases, and additional parasites with roles similar to that of *Escovopsis* are expected to exist. We profiled the diversity of cultivable microfungi found in 37 nests from ten *Acromyrmex* species from Southern Brazil and compared this diversity to published surveys. Our study revealed a total of 85 microfungal strains. *Fusarium oxysporum* and *Escovopsis* were the predominant species in the surveyed gardens, infecting 40.5% and 27% of the nests, respectively. No specific relationship existed regarding microfungal species and ant-host species, ant substrate preference (dicot versus grass) or nesting habit. Molecular data indicated high genetic diversity among *Escovopsis* isolates. In contrast to the garden parasite, *F. oxysporum* strains are not specific parasites of the cultivated fungus because strains isolated from attine gardens have similar counterparts found in the environment. Overall, the survey indicates that saprophytic microfungi are prevalent in South American leafcutter ants. We discuss the antagonistic potential of these microorganisms as “weeds” in the ant-fungus symbiosis.

3.2 Introduction

Insect-fungal mutualisms are interspecies associations of great evolutionary success (BATRA, 1979; BOURTZIS; MILLER, 2006; MUELLER et al., 2005). One such association is the mutualism between the farming ants (Hymenoptera: Formicidae: tribe Attini) and their cultivated fungi, an ancient symbiosis that likely originated about 50 to 65 million years ago (MUELLER et al., 2001). Within the tribe Attini, the leaf-cutting ants represent one of the most derived groups comprised by two ant genera, *Atta* and *Acromyrmex* (SCHULTZ; MEIER, 2005). In many parts of the New World, leafcutter ants are recognized as highly destructive crop pests (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990) because leafcutter nests support millions of individuals and workers forage for large quantities of fresh leaf material that they cut and bring to their underground nests to use as substrate for fungal cultivation (WEBER, 1972).

The cultivated fungus, *Leucoagaricus gongylophorus* (Basidiomycota: Agaricales: Lepiotaceae), together with the plant substrate supplied by the ants to sustain the fungal partner, compose the fungus gardens. The leaf-cutting ants' fungi develop specialized nutritive swellings (gongyliidea) that are used by the ants to nourish their brood (WEBER, 1972). The fungus, in turn, benefits from the association because the ants provide a suitable environment for its growth. The ants also disperse the fungus when young queens carry a small fungal inoculum from their natal-colony for the foundation of a new nest (MUELLER, 2002).

According to Poulsen and Boomsma (2005) and Scott, Cooper & Mueller (in preparation), leaf-cutting ants actively inhibit the growth of multiple strains of fungal cultivars within the nest, thereby maintaining their associated partner as single clones (i.e. monocultures). The resulting lack of genetic diversity in the fungus gardens is expected to render gardens susceptible to diseases and parasites (HAMILTON et al., 1990). An analogous problem exists in human monoculture crops (MUELLER, 2002). Indeed, Currie et al. (1999a), sampling for non-mutualistic fungi associated with attine nests discovered that the attine cultivars are host to a specialized fungal parasite in the genus *Escovopsis* (Ascomycota: anamorphic Hypocreales) that negatively impacts the ant colony. *Escovopsis* infects nests of attine ant species across all genera studied and is the most frequently encountered non-mutualistic fungus found so far in attine gardens of Central America (CURRIE et al., 1999a; 2001b). *Escovopsis* acts as a necrotrophic parasite that destroys the cultivar's hyphae

(REYNOLDS et al., 2004) and exhibits a complex pattern of co-evolution with the cultivar. The original claim of ancient *Escovopsis*-cultivar cocoladogenesis by Currie et al. (2003c) suggested parasite-host specificity at broad phylogenetic levels (four *Escovopsis* clades corresponding to four cultivar clades from four ant clades), but more comprehensive sampling (GERARDO et al. 2006a) revealed occasional switching of *Escovopsis* lineages between cultivar lineages at the finest phylogenetic levels.

In addition to *Escovopsis*, attine ants harbor a community of other microbes in their gardens, including microfungi (filamentous fungi and yeasts) and bacteria (BACCI et al., 1995; CARREIRO et al., 1997; FISHER et al., 1996; RODRIGUES et al., 2005a). Leafcutter ants can regulate the microbiota in gardens, for example by actively combing out unwanted fungal spores (CURRIE; STUART, 2001) or by application of germination-inhibiting secretions (FERNÁNDEZ-MARÍN et al., 2006). However, the function of the associated microbiota in the garden matrix is largely unknown. These additional microorganisms could be harmful invaders (or “weeds”) when found in high frequency in the ants’ gardens (FISHER et al., 1996; POULSEN; CURRIE, 2006), neutral and transient commensals (with negligible effects on garden homeostasis), or potentially beneficial ancillary components serving unknown functions such as production of enzymes or antibiotics (BACCI et al., 1995; MUELLER et al., 2005).

Poulsen and Currie (2006) suggested that the microfungi other than *Escovopsis* are mere transient guests with no active role in the fungus garden. This view is consistent with studies that documented ubiquitous microfungi species in attine gardens that are commonly found also in many other environmental sources. For instance, Carreiro et al. (1997) and Craven et al. (1970) reported ubiquitous yeasts species in the fungus gardens of laboratory nests (e.g., *Candida* spp.). However, in a survey of non-mutualistic filamentous fungi, Rodrigues et al. (2005a) discovered that some microfungi such as *Fusarium oxysporum* and *Trichoderma harzianum* occur in higher frequency in leafcutter gardens than the parasite *Escovopsis* sp. This was observed in nests under stressed conditions (i.e. laboratory nests treated with toxic baits). The same study also documented a high microfungi incidence other than *Escovopsis* sp. in natural *Atta sexdens rubropilosa* colonies. Fungal species such as *Acremonium kiliense*, *Cunninghamella elegans*, *F. oxysporum*, *T. harzianum* and *Syncephalastrum racemosum* were frequently isolated (RODRIGUES et al., 2005a), suggesting that their presence is not casual. In order to further understand the distribution and

prevalence of these and other filamentous fungi in gardens of leaf-cutting ants, we conducted a survey of the microfungal species in field nests of leaf-cutting ants from Southern Brazil.

Previous studies on the microfungal diversity in attine nests focused on specific groups of microorganisms under diverse conditions. For example, several studies sampled natural nests of Central American attine species for the presence of *Escovopsis* (CURRIE et al., 1999a; CURRIE 2001b; GERARDO et al., 2004). Other studies surveyed the yeast diversity in laboratory nests of leaf-cutting ants (CRAVEN et al., 1970; CARREIRO et al., 1997). Fisher et al. (1996) reported changes in the community structure of non-mutualistic filamentous fungi of *Atta cephalotes* laboratory nests when maintained with different types of leaf diets. Lastly, Möeller (1893) reported microfungi species, including *Escovopsis* sp., from leafcutter gardens collected in Southern Brazil and maintained in the laboratory.

The present study differs from the above surveys (MÖELLER, 1893; CRAVEN et al., 1970; FISHER et al., 1996; CARREIRO et al., 1997; CURRIE et al., 1999a; RODRIGUES et al., 2005a) of attine gardens in three main aspects: i) the leaf-cutting ant species surveyed belonged to the genus *Acromyrmex* (*Atta* was largely absent in the surveyed area); ii) the collection sites were located in Southern Brazil (primarily the State of Rio Grande do Sul); and iii) the field nests appeared to be in healthy condition at the time of collection, with no visible signs of disturbance or stress. The survey addresses two primary questions: 1) Are there species-specific relationships among the microfungi and ants? 2) Is *Escovopsis* sp. prevalent in *Acromyrmex* gardens from Southern Brazil, and is its prevalence in Southern Brazil comparable to that of Central America (CURRIE et al., 1999a; CURRIE, 2001b)?

Our study confirms previous reports that the gardens of leaf-cutting ants harbor several soil and plant-borne fungi, but also shows a comparatively low infection rate by *Escovopsis*. The documented diversity of soil and plant-borne fungi may function under certain conditions as opportunistic pathogens in leafcutter gardens, constraining the symbiosis by competing with the fungal cultivar for nutrient resources.

3.3 Material and Methods

Fungus garden sampling

From 4-17 September 2004, gardens from 37 mature nests of ten *Acromyrmex* species were sampled in different localities of the State of Rio Grande do Sul (RS) in Southern Brazil

(see Table 1 for collecting localities). The type of substrate carried by foraging workers at the time of collection was recorded along with the nesting habitat. This information was compared with Gonçalves et al. (1961) who provided detailed descriptions of foraging behavior and nest architecture of Brazilian *Acromyrmex* species. When our observations differed from the species-specific characters reported in the literature (GONÇALVES et al., 1961), our own observations were used in the analyses, as summarized in Table 1. The nests were carefully excavated (in the case of soil-dwelling species) or carefully opened (in the case of mound-building species) (Table 1) in order to prevent contamination of any accessed garden. Large garden fragments (with workers and brood) were immediately transferred whole (without disrupting the garden) with sterilized forceps to sterile plastic containers (volume capacity = 50 ml).

During the two-week field expedition, all garden containers were kept in a cooler in the dark until transported to the “Centro de Estudos de Insetos Sociais” (CEIS) lab at Rio Claro, where they were maintained for an additional 3 days before fungal isolation.

Microfungi isolation

We followed two established isolation techniques (CURRIE et al., 1999a; RODRIGUES et al., 2005b) for profiling the microfungal community in the fungus gardens. From each garden collection, i) ten fragments (3 mm³ in diameter) of the gardens were removed and inoculated in potato-dextrose agar plates (PDA, DIFCO[®]) supplemented with 150 µg.ml⁻¹ of chloramphenicol (US Biological Inc.); ii) six garden fragments (20 mm³ in diameter) were carefully freed of all the workers and brood (by sorting through each fragment with a sterilized forceps) then placed into a sterile, humidified Petri dish. The dish contained a piece of cotton with sterile distilled water, which provided humidity for continued fungal growth (the so-called “wet chamber”). All plates were incubated at 25° C for 7-14 days in the dark.

PDA plates and wet-chambers were checked daily for signs of any filamentous fungal growth. Once a fungus emerged from the garden fragment, an inoculum was transferred to malt agar 2% plates (MA 2%, DIFCO[®]) in order to obtain pure cultures. When morphologically very similar microfungal colonies were characterized in a single ant garden, a unique representative fungal sample was isolated, and the strains were stored in 10% glycerol at -80° C at CEIS. When insufficient garden material was available to conduct both

isolation methods, only one method was used out of necessity, yielding 17 isolations with PDA only, 4 isolations with wet-chambers only, and 16 isolations using both methods.

Fungal identification

i) Morphological methods

Colony macromorphology and micromorphology were used as main characters to identify the isolates. Species were identified with the help of general taxonomic keys (BARRON, 1968; DOMSCH et al., 1980; SAMSON et al., 2000), as well as specific taxonomic treatments for some groups of fungi (KLICH, 2002; LIU et al., 2001; NELSON et al., 1983).

ii) Molecular methods

Microfungi were further identified with the help of DNA sequence information. Genomic DNA was extracted using the CTAB method (GERARDO et al., 2004). Prior to DNA extractions, isolates were grown in aerated liquid cultures (MA 2%) for 7 days at 25° C, and the mycelia were harvested and lyophilized.

A 25 µl polymerase chain reaction was performed using Ready-to-Go™ beads (GE Healthcare) and 1.0 µl of DNA template (~ 40 ng). ITS4 and ITS5 primers (6 pmol each) were used to amplify the internal transcribed spacer regions of the ribosomal DNA [51]. For *Escovopsis* isolates, the primers eafF (5'CATGATCACTGGTACCTCCCAGG3') and eafR (5'GCATGTACCGACGGCGAAACGA3') were used to amplify a fragment spanning the exon 6 of the elongation alpha-1 (EF1-a) gene, modified from (CURRIE et al., 2003c).

The amplification protocol consisted of an initial denaturation step at 94° C for 3 min, followed by 35 cycles of 94° C for 1 min, 50° C for 1 min and 72° C for 1 min, followed by a final extension step of 72° C for 15 min. The amplification products were purified with Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation) following the manufacturer's protocol.

Cloning was necessary in some cases to obtain good sequence reads. In these cases, the amplicons were inserted in pGEM® T-vector (Promega Corporation) and transformed in

competent *Escherichia coli* DH10 β cells. DNA from recombinant cells was purified following the miniprep procedure by Sambrook and Russel (2001).

The 10 μ l cycle sequencing reaction contained 2.5 μ l of Big Dye terminator (Applied Biosystems); 2.5 μ l of 100 mM Tris and 2.5 mM MgCl₂ (pH 9.0), 6 pmol of each primers (the same ones used in the amplification step); and 30-40 ng of the purified PCR products. Reaction conditions included a denaturation step of 96° C for 2 min followed by 28 cycles of 96° C for 45 s, 50° C for 30 s, and 60° C for 4 min. The amplicons were sequenced on an ABI Prism 377 DNA sequencer (Applied Biosystems). For all samples, both forward and reverse sequences were obtained for the ITS and EF1-a regions. Sequences from representative isolates are deposited at Genbank as accessions EU082779 – EU082803.

Sequence analysis

Forward and reverse strands were edited using Bioedit v.7.0.5.3 (HALL, 1999) and the consensus sequence was used in BLASTN similarity searches at the NCBI-Genbank (ALTSCHUL et al., 1997) or at the TrichoKey databases (DRUZHININA et al., 2005) (the latter one just for *Trichoderma* isolates). Sequences presenting 99% similarity with sequences obtained from databases were considered as identified (Table 2).

Phylogenetic analyses were performed for two types of microfungi that occurred in high proportions in gardens (*Escovopsis* sp. and *F. oxysporum*). Sequences were aligned in ClustalW (THOMPSON et al., 1994) using default parameters and analyzed in PAUP* v. 4.0b10 (SWOFFORD, 2002) under the maximum parsimony (MP) criterion. An heuristic search was conducted with 1,000 replicates, random sequence addition, TBR branch swapping, and the *collapse* and *multrees* options implemented. Maximum likelihood (ML) analysis was conducted in GARLI v. 0.951 (ZWICKL, 2006) using default parameters as recommended in the User's Manual. Branch support for MP and ML analyses was calculated using 1,000 non-parametric bootstrap pseudo-replicates (FELSENSTEIN, 1985) using the same settings as for initial searches. Bayesian analyses were carried out in MrBayes v. 3.1.2 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003). Four separate runs were conducted, each with four incrementally heated chains and uninformative, default priors; converge and optimal burn-in were assessed as described in (BROWN; LEMMON, 2007) using the program MrConverge [A Lemmon, in prep.]. After discarding burn-in, the posterior samples of tree topologies for each run were combined in PAUP* to obtain the posterior probabilities of each node.

Sequences from *Escovopsis* isolates published in other studies (CURRIE et al., 2003c; TAERUM et al., 2007) were obtained from Genbank (accessions #: AY172620, AY172622, EF589910-EF589914, EF589916-EF589919 and EF589921-EF589949).

In order to establish the phylogenetic relationships of *F. oxysporum* isolates from attine gardens and *F. oxysporum* from other environmental sources, a median-joining network (BANDELT et al., 1999) was inferred using the Network software v.3.1.1.1 (available at www.fluxus-engineering.com). Sequence information for different *F. oxysporum* strains were retrieved from Genbank as accession #: U34571, AJ853769, U34566, U28161, X94173, AF165875, AF069310 and U28159.

3.4 Results

Microfungal distribution in Acromyrmex nests

Aiming to improve our assessment of the microfungal diversity in the fungus gardens, we have carried out two different isolation techniques. The effect of this strategy can be evaluated by the results obtained from the 16 nests which had enough material to be used in both techniques. These 16 nests were found to contain 22 fungal species, but only four of these species (*C. binariae*, *E. weberi*, *F. oxysporum* and *T. harzianum*) were isolated by both technical procedures; eight species (*Fusarium solani*, *Mucor circinelloides*, *Penicillium* sp. 2, *Penicillium waksmanii*, *S. racemosum*, *Trichoderma* sp., *Xylaria* sp. 1, *Xylaria* sp. 2) were isolated uniquely through the wet-chamber method; and 10 species (*Chaetomium* sp., *Lecithophora* sp., *Moniliella*-like fungi, *Mucor* sp. 1, *Mucor* sp. 2, *M. racemosus*, *Trichoderma spirale*, *Volutella* sp. and 2 isolates of non-identified fungi) were recovered only by the PDA method. These results suggest that the two isolation methods worked complimentary to each other in order to depict the microfungal diversity in *Acromyrmex* gardens.

Application of these two isolation techniques to the gardens of *Acromyrmex* ants resulted in the recovering of 85 microfungal strains. This pool of isolates comprised 33 fungal species from 16 genera that were identified either by morphological or sequencing analyses. In addition, two non-sporulating, morphologically unidentifiable fungal isolates could only be classified based on ITS sequence information (Table 2).

Among the 16 fungal genera found, *Cunninghamella*, *Escovopsis*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium* and *Trichoderma* were the most prevalent, occurring at least in 18% of the gardens (Table 2). *Fusarium* and *Cunninghamella* were isolated in 26% and 19% of grass-cutting ant's gardens, respectively, whereas *Fusarium*, *Mucor* and *Escovopsis* were found in 18.5%, 14.8% and 13% in dicot-cutting ant's gardens, respectively (Figure 1a). Ten out of 16 microfungal genera were observed in monocot-cutting ants, and 14 out of 16 microfungal genera were found in gardens of dicot-cutting ants. Only 8 genera (*Aspergillus*, *Cunninghamella*, *Escovopsis*, *Fusarium*, *Moniliella*-like, *Penicillium*, *Trichoderma* and *Xylaria*) were common in gardens of both monocot and dicot-cutting ants (Figure 1a).

When comparing the microfungi profile between nest-type, *Fusarium* and *Escovopsis* were the most prevalent, occurring in 24% and 15% of mound-building ant species, respectively. *Fusarium* and *Cunninghamella* were the two predominant genera in soil-dwelling ant species (Figure 1b). Ten out of 16 microfungal species were associated with both mound-building and soil-dwelling ant species (Figure 1b).

While ascomycete fungi comprised the majority of the isolates from both monocot and dicot-cutting ants, zygomycetes were not found in high frequency in monocot-cutting ants, with the exception of *Cunninghamella binariae* which was found in *Acromyrmex heyeri* nests (Table 2). On the other hand, zygomycete fungi were found in association with seven out of eight dicot-cutting ant species studied (Table 2).

The most frequent fungal species in the present survey were: *Fusarium oxysporum* from 40.5% of the colonies across seven ant species; *Escovopsis weberi* from 27% of the colonies from six ant species; *Cunninghamella binariae* from 19% of the colonies of three ant species; and *Mucor racemosus* from 10.9% of the colonies of 5 ant species (Table 2). The remaining microfungal species were present in less than 10% of the total nests sampled.

Phylogenetic analyses

Because *F. oxysporum* was the most prevalent species in our survey, we evaluated whether any particular *F. oxysporum* strains were specialized in infecting *Acromyrmex* gardens. This was accomplished by assessing the phylogenetic relationship between ITS haplotypes from our *F. oxysporum* isolates with published ITS haplotypes from *F. oxysporum* strains commonly found in soil or plant substrates. Because ITS2 is known to have paralogous copies in *Fusarium* (O'DONNELL; CIGELNIK, 1998) we confirmed first that the major

ITS2 type present in our isolates were the ITS2 - type I described by O'Donnell and Cigelnik (1998). There was a low polymorphism of the ITS1 and ITS2 regions within the analyzed strains, with one nucleotide difference on average. The median-joining network (not shown) suggested a scenario which is not compatible with specialized infection of *Acromyrmex* by *F. oxysporum*, since no genetic group containing only closely related isolates from leafcutter nests was characterized. In addition, 12 haplotypes were shared by leafcutter isolates and other isolates from several environmental sources, including soil and plant substrates.

We also investigated species-specificity regarding *Escovopsis* strains and leafcutter species, by inferring the phylogenetic relationships among our isolates as well as other previously studied *Escovopsis* strains (CURRIE et al., 2003c; TAERUM et al. 2007). The phylogeny inferred from the EF1-a marker (Figure 2) showed that all of the *Escovopsis* isolates in our survey fall within *Escovopsis* group A, as defined by Taerum et al. (2007). No species-specificity was detected between *Acromyrmex* ants and *Escovopsis* strains from Southern Brazil, since (i) closely related *Escovopsis* strains were associated with different ant species and (ii) gardens of the same ant species were associated with more distantly related *Escovopsis* strains (Figure 2). Although *Escovopsis* isolates from group B did not form a monophyletic clade in our phylogenetic analyses, as they do in previous studies (TAERUM et al. 2007), this discrepancy is a result of the shorter EF1-a fragments used in our analyses (697 base pairs versus ~1400 base pairs in TAERUM et al. 2007).

3.5 Discussion

Microfungi in Acromyrmex nests

Earlier work has shown that attine gardens harbor a complex microbiota, including soil-inhabiting microfungi (CURRIE et al., 1999a; RODRIGUES et al., 2005a,b) as well as epiphytic and endophytic fungi (FISHER et al., 1996). In the present study, we profiled and characterized the cultivable microfungi in the fungus gardens of *Acromyrmex* spp. from Southern Brazil, by using two distinct and complimentary isolation techniques. This allowed the assessment of the microfungal diversity in these gardens through the recovering of several microfungal isolates.

Gardens of monocot or dicot-cutting and mound-builder or soil-dweller leafcutter ants harbored slightly distinct microfungal communities, as would be expected if garden substrate

and nest-type influenced microfungal contamination (Table 2, Figure 1b). Eight genera of microfungi occurred in gardens of both monocot- and dicot-cutting ants (Figure 1a) and 10 out of 16 genera occurred in both mound-building and soil-dwelling species. No microfungal lineage was clearly specialized on either garden substrate or nest-type. Other factors such as specific plant species harvested by the ants, the age of the colony, and infestation by arthropod garden commensals that may vector contaminants into the garden, or interactions between some of these factors, may have determined the microfungal garden community. As a classical example of factors influencing the garden microbiota, Fisher et al. (1996) concluded that changes in microfungi species composition associated with *Atta cephalotes* nests reared in the laboratory were due to changes in the plant substrate offered to the ants.

Microfungal profiles also revealed no ant-fungal species specificity with fungi having instead a rather diffuse association with *Acromyrmex* spp. (Table 2). For example, fungi such as *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp. and others were isolated from different ant species independent of nest-type (mound versus soil) or the leaf substrate (monocot versus dicot). Also, most microfungi in *Acromyrmex* gardens from this study are species commonly found in the environment (DOMSCH et al., 1980), suggesting no apparent specialization to the symbiosis. This ubiquity is generally due to the strategy as saprophytes, i.e. they are important due to its general role in the nutrient cycling in ecosystems. For instance, fungi in the genus *Xylaria* are well-known saprophytes, decaying wood of living or dead plants (LEE et al., 2000).

Despite the lack of specificity between ant and fungal species found in our survey, there are some interesting fungi that deserve closer consideration. First, the soil-borne fungal genus *Cunninghamella* was found in 19 % of the leafcutter gardens, a figure rather comparable to the levels of infection by *Escovopsis* observed in this study (27 %) and previous studies (CURRIE et al., 1999a; RODRIGUES et al., 2005a,b; see further discussion below). Like *Escovopsis*, *Cunninghamella* species can have drastic effects on leafcutter gardens, overrunning gardens of laboratory nests within a few days after insecticide treatment (RODRIGUES et al., 2005a), thus suggesting these fungi may have an important role within the attine ant microbe symbiosis. However, parsimony analysis (data not shown) indicated that *Cunninghamella* isolates from leafcutter gardens clustered with several isolates of the same genus found in other plant substrates such as nuts (LIU et al., 2001), indicating that our *Cunninghamella* strains isolated from gardens are not specialized on the ant-fungus symbiosis.

Second, *F. oxysporum* was isolated in 40.5 % of the nests, a percentage somewhat higher than the 23 % found in field colonies of *A. sexdens rubropilosa* in southeast Brazil (RODRIGUES et al., 2005a). Apparently, *F. oxysporum* is a soil-borne fungus that has a high prevalence in attine gardens [RODRIGUES et al. 2005a, this study] but there is currently no evidence that *F. oxysporum* plays a detrimental role in ant gardens. Because *F. oxysporum* varieties are disease-causing fungi on plants such as cotton wilt (SKOVGAARD et al., 2001) and soil is a natural reservoir for this fungus, we tested whether the strains associated with attine gardens form a specific group. A haplotype analysis revealed that all attine-associated *F. oxysporum* strains have plant-associated counterparts (including identical-sequence strains) which can exist either in soil or in plants, thus outside of the association with leaf-cutting ants. Although the analysis is based on few strains, it suggests that *F. oxysporum* can enter nests from the surrounding environment, and not via nest-to-nest transmission as hypothesized for *Escovopsis* (CURRIE et al., 1999a).

Escovopsis natural infection rates and diversity

Since 1999, our knowledge on the microfungus genus *Escovopsis* has been growing (CURRIE et al, 1999a; CURRIE et al., 2003c; GERARDO et al., 2004; 2006a; TAERUM et al., 2007). The main reason for the advances on *Escovopsis* biology and ecology is due to several studies that have specifically surveyed for *Escovopsis* diversity, revealing that this fungus is present in gardens of most attine species. This fungus is currently the best well known pathogen in the attine ant-microbe symbiosis.

Currie et al. (1999a) studied *Escovopsis* distribution in a variety of attine genera, mostly from Central America and adjacent areas, and established that *Escovopsis* could be isolated in 33%-51% of the nests, depending on the ant genus. With respect to just the leaf-cutting ants (*Atta* spp. and *Acromyrmex* spp.), Currie et al. (1999a) and Currie (2001b) reported *Escovopsis* infection rates ranging from 51% in some *Atta* species to as high as 68.4% in *Acromyrmex octospinosus* and 75% in *Acromyrmex echinatior*. Our study found comparatively lower *Escovopsis* infection rates (27%). It is unclear whether the levels of *Escovopsis* infection of Brazilian subtropical *Acromyrmex* spp. are naturally lower compared to Central American attines, and whether these differences are due to (i) different feeding habits exhibited by the ants, (ii) nest density differences, (iii) microhabitat variations (iv) nest age, or even (v) antagonism by other alien microorganism. The fact that the present study

made use of two types of isolation methods (in contrast to other studies that used one method, CURRIE et al., 1999a; CURRIE 2001b) could be another factor contributing to the observed differences.

Our phylogenetic analyses (Figure 2) corroborate results by Taerum et al. (2007) in which Brazilian isolates all fell into a single group named clade A, which also contained isolates from Argentina, Ecuador and Panama. However, our survey in southern Brazil did not discover any isolates in Taerum et al.'s clade B, which contained *Escovopsis* from Argentina, Ecuador and Central America. Thus, our results suggest that ants in the geographic region in Rio Grande do Sul are exclusively infected by *Escovopsis* strains in the clade A, which is compatible with some geographic structure in this parasite's distribution. More extensive sampling is needed, especially in other regions of Brazil, to investigate whether other cases of *Escovopsis* geographic structuring exist. Furthermore, the antibiotic-producing bacteria that the ants carry on their cuticle as a defense against *Escovopsis* are predicted to having corresponding geographic structure (CAFARO; CURRIE, 2005).

Microfungi as antagonists in the ant farm

According to Poulsen and Boomsma (2005) and Scott, Cooper & Mueller (in preparation), leafcutter cultivars are maintained by the ants as single-genotype fungus garden (monoculture), conditions that are predicted to facilitate the spread and coevolution of pathogens (HAMILTON et al., 1990). Our results indicate that other non-mutualistic fungi in *Acromyrmex* nests are indeed prevalent in leafcutter gardens, but also that these potential pathogens do not appear to be as specialized as *Escovopsis* (CURRIE et al., 2003c; GERARDO et al., 2006a).

Some of the garden weeds appear to act as antagonists of the ant-cultivated fungi, as already documented by Silva et al. (2006a). For example, attine gardens can be overgrown by several microfungi, all causing garden death (RODRIGUES et al., 2005a,b) similar to garden destruction by *Escovopsis* sp. (CURRIE et al., 1999a). Fungi such as *Cunninghamella* species are considered sugar-free fungi and can readily assimilate simple sugars, quickly building up a large biomass of mycelia (DOMSCH et al., 1980). It is known that fungus gardens of attine ants contain high levels of simple sugars (i.e. glucose; SILVA et al., 2003), and for most fungi ant gardens are therefore a suitable environment for growth. Future studies should address whether the sugars available in the fungus gardens help non-cultivar fungi to outgrow the

ants' defense mechanisms of constant weeding. Within this nutritional milieu of attine gardens, microfungus weeds therefore can critically impact garden health.

Considering the ecological roles of *F. oxysporum* and *Cunninghamella* sp., we hypothesize that these microorganisms act as antagonists in the attine-microbe symbiosis. However the negative impact of *F. oxysporum* and *Cunninghamella* sp. appears to be due to nutritional competition and is not as specific as the impact of the cultivar-infecting parasite *Escovopsis*, yet some degree of adaptation and pathogenicity of *F. oxysporum* and *Cunninghamella* species is implied. Future studies should evaluate the extent of negative impacts of these fungi on the leafcutter ants' fitness and their usefulness in the biological control of these agricultural pests.

3.6 Acknowledgements

We would like to thank the “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)” for a scholarship supporting A Rodrigues, “Fundação de Amparo a Pesquisa Científica do Estado de São Paulo” (FAPESP) for funding the fieldwork; and DC Marini and J Martins Jr for laboratory support. We are also grateful to A Silva for comments on earlier versions of this manuscript as well as NM Gerardo and one anonymous referee for kindly reviewing this manuscript. We also thank SE Solomon for helping with the phylogenetic analyses.

Table 1. General characteristics of the ant species used in this study.

<i>Acromyrmex</i> species	City/State ^{††}	Nest location ^{†††}	Substrate	Nest type
<i>A. ambiguus</i> (2) [†]	Nova Petropolis/RS	S 29° 22' 38.2"; W 50° 57' 18.1"	Dicot	Mound-builder
	near Pelotas/RS	S 30° 50' 10.2"; W 51° 55' 10.4"	Dicot	Mound-builder
<i>A. aspersus</i> (2)	Sao Marcos/RS	S 28° 58' 05.6"; W 51° 07' 58.0"	Dicot	Soil-dweller
<i>A. coronatus</i> (9)	near Registro/RS	(2) S 25° 25' 50.5"; W 49° 04' 56.4"	Dicot	Mound-builder
	Itajai/RS	S 25° 25' 50.5"; W 49° 04' 56.4"	Dicot	Soil-dweller
	near Pelotas/RS	S 30° 50' 10.2"; W 51° 55' 10.4"	Dicot	Mound-builder
	Vacaria/RS	(2) S 28° 27' 51.7"; W 50° 53' 07.0"	Dicot	Mound-builder
	Blumenau/SC	(2) S 26° 53' 37.8"; W 49° 11' 29.0"	Dicot	Mound-builder
	Blumenau/SC	S 26° 51' 48.3"; W 49° 16' 15.0"	Dicot	Mound-builder
<i>A. crassispinus</i> (1)	Nova Petropolis/RS	S 29° 23' 51.4"; W 50° 54' 27.3"	Dicot	Soil-dweller
<i>A. disciger</i> (2)	Blumenau/SC	S 26° 54' 04.9"; W 49° 10' 51.2"	Dicot	Mound-builder
<i>A. hispidus falax</i> (2)	Londrina/PR	S 22° 47' 22.0"; W 51° 36' 01.6"	Dicot	Soil-dweller
<i>A. laticeps</i> (5)	Nova Petropolis/RS	(2) S 29° 19.05' 9"; W 51° 10' 13.6"	Dicot	Soil-dweller
	Sao Marcos/RS	S 28° 57' 16.5"; W 51° 08' 20.0"	Dicot	Soil-dweller
	Alto da Serra/RS	(2) S 28° 12' 26.2"; W 50° 45' 27.4"	Dicot	Mound-builder
<i>A. lundii</i> (3)	Sao Marcos/RS	(2) S 28° 58' 02.8"; W 51° 08' 08.8"	Dicot	Soil-dweller
	Chuívisca/RS	S 30° 50' 10.2"; W 51° 55' 10.4"	Dicot	Soil-dweller
<i>A. heyeri</i> (10)	Sentinela do Sul/RS	(4) S 30° 37.57' 9.0"; W 51° 33' 18.2"	Monocot	Soil-dweller
	Chuívisca/RS	S 30° 50' 10.2"; W 51° 55' 10.4"	Monocot	Mound-builder
	near Pelotas/RS	(4) S 30° 50' 10.2"; W 51° 55' 10.4"	Monocot	Mound-builder
	Santana da Boa Vista/RS	S 30° 56' 40.0"; W 53° 05' 10.3"	Monocot	Mound-builder
<i>A. landolti</i> (1)	Taquara/RS	S 29° 42' 55.7"; W 50° 50' 21.5"	Monocot	Soil-dweller

[†] Figures in parentheses (column 1) indicate the number of colonies sampled for each ant species. ^{††} State abbreviations, PR: Paraná; RS: Rio Grande do Sul; SC: Santa Catarina. ^{†††} Figures in parentheses (column 3) indicate the number of colonies found at the same locality.

Table 2. Microfungi species in fungus gardens of *Acromyrmex* species from Southern Brazil

Fungi classified as	Closest identified relative (based on ITS sequences)											% of nests (n=37) with the specified microfungus		
	<i>Acromyrmex</i> spp.†													
	Fungal species	Accession # - % identity	n=2	n=2	n=9	n=1	n=2	n=2	n=2	n=5	n=3	n=10	n=1	
			<i>ambiguus</i>	<i>aspersus</i>	<i>coronatus</i>	<i>crassispinus</i>	<i>disciger</i>	<i>hispidus</i>	<i>laticeps</i>	<i>lundii</i>	<i>heyeri</i>	<i>landolii</i>		
Zygomycota	<i>Cunninghamella binariae</i>			1††	1						5		19.0	
	<i>Cunninghamella blakesleana</i>	AF254935 – 98%											2.8	
	<i>Cunninghamella echinulata</i>	AF254932 – 97%			1								8.0	
		AF254938 – 95%				1			1	1	1			
		<i>antartica</i>												
	<i>Micor circinelloides</i>	DQ118966 – 99%							1					2.8
	<i>Micor racemosus</i>	AJ271061 – 99%		1	1			1	1	1	1			10.9
	<i>Micor</i> sp. 1	AF412294 – 92%			1									2.8
	<i>Micor</i> sp. 2	n.d.†††			1									2.8
	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	n.d.			2									5.4
		<i>Aspergillus flavus</i>	AM745114 – 100%	1				2						8.0
	<i>Aspergillus versicolor</i>	AJ937750 – 99%										1		2.8
	<i>Escovopsis</i> sp.	See text and figure 2 for details		1	2	1	1	1	1	1	2	3		27.0
<i>Epipenicillium javanicum</i>	U18358 – 100%						1						2.8	
<i>Chaetomium</i> sp.	AJ279468 – 89%										1		2.8	
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	AF393691 – 100%						1						2.8	
<i>Fusarium oxysporum</i>	AY462580 – 100%		1	1	1	1	2	3	2	2	6		40.5	
<i>Fusarium equiseti</i>	AY147362 – 100%		1										2.8	
<i>Fusarium solani</i>	AM412639 – 100%										1		2.8	
<i>Trichoderma hamatum</i>	DQ238602 – 100%								1				2.8	
<i>Trichoderma harzianum</i>	AF443922 – 100%			1							1	1	8.0	
<i>Trichoderma spirale</i>	AY154939 – 99%										1		2.8	
<i>Trichoderma</i> sp.	AY154942 – 99%			1	1	1	1	1	1	1	1		5.4	
<i>Trichoderma virens</i>	AF099007 – 100%						1						2.8	
<i>Lecythophora</i> sp.	AY219880 – 94%										1		2.8	
<i>Moniteila-like fungus</i>	AF055297 – 82%			1						1	1		8.0	
<i>Paeclomyces lilacinus</i>	n.d.												2.8	
<i>Penicillium citrinum</i>	EF127876 – 99%							1	1	1			5.4	
<i>Penicillium</i> sp. 1	DQ092545 – 99%								1				2.8	
<i>Penicillium</i> sp. 2	DQ279802 – 100%										1		2.8	
<i>Penicillium waksmanii</i>	AY373940 – 99%				1								2.8	
<i>Penicillium</i> sp. 3	AY213674 – 97%					1							2.8	
<i>Volvatella</i> sp.	EF029211 – 99%								1				5.4	
<i>Xylaria</i> sp. 1	EF423534 – 89%					1					1		5.4	
<i>Xylaria</i> sp. 2	n.d.										1		2.8	
n.i. ascomycetes 1†††	n.i. ascomycete					1							2.8	
n.i. ascomycetes 2	uncultured ascomycete												2.8	
	EF027379 – 89%													

† Ant species marked in dark-grey and black are dicot and grass-cutting ants, respectively (for further details see Table 1). (n) indicates the number of nests sampled for each ant species.

†† Number of colonies of a particular ant species from which was observed the specified microfungus.

††† n.d., no data.

†††† n.i., not identified.

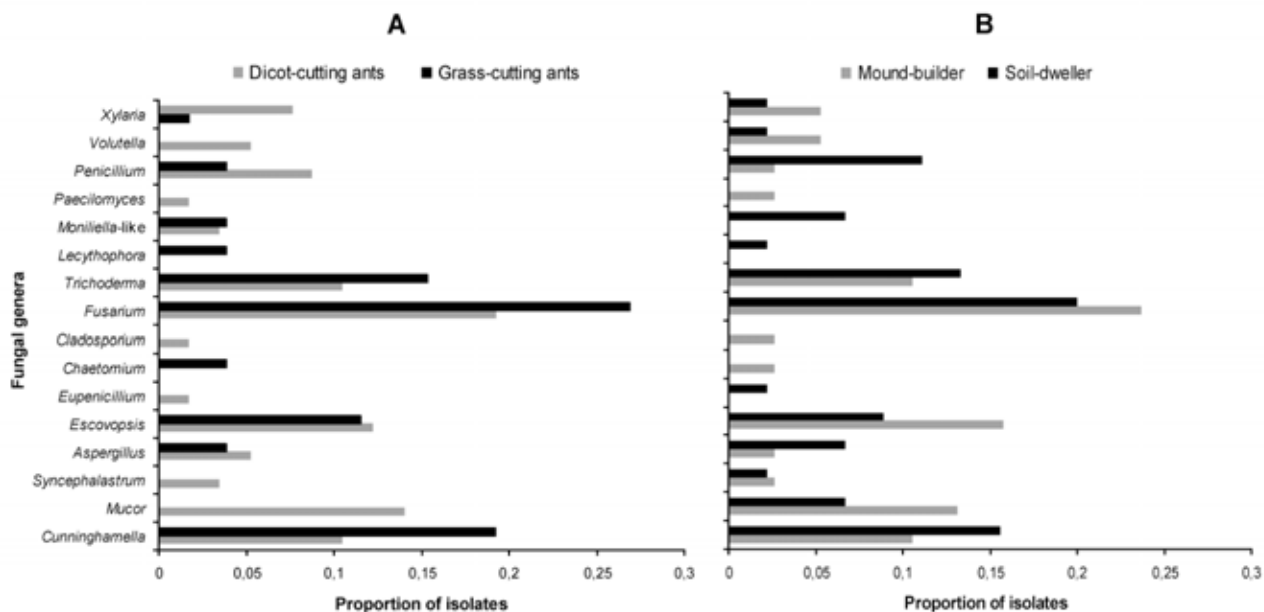


Figure 1. Relative abundance of fungal isolates (grouped by genus) found in *Acromyrmex* leafcutter-ant nests in Southern Brazil. Ant species are grouped according to: (A) the type of plant material used by the workers to nourish their cultivars, dicot-cutting ants (n= 57 fungal isolates) and grass-cutting ants (n= 26 fungal isolates). (B) nesting habit, mound-builder (n= 38 fungal isolates) and soil-dweller (n= 45 fungal isolates). Unidentified ascomycete fungi are not included.

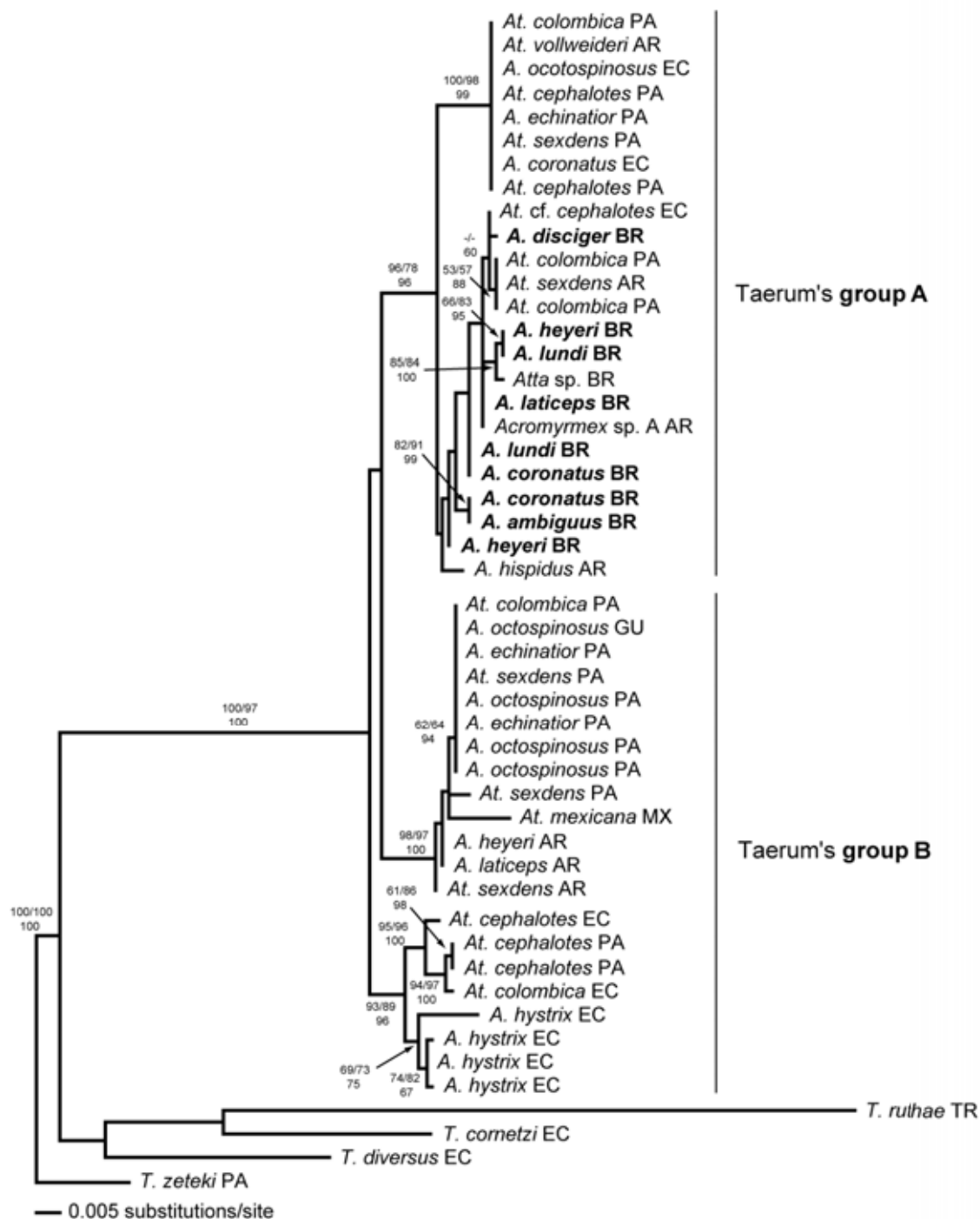


Figure 2. Maximum likelihood tree of *Escovopsis* isolates inferred from a 697 base-pair fragment of the elongation factor 1-alpha. Numbers on branches are bootstrap support under maximum parsimony (top, left) and maximum likelihood (top, right) criteria (values under 50% are not shown) and Bayesian posterior probabilities (below). The fungi are named after the ant species from which they were isolated (At.: *Atta* sp.; A.: *Acromyrmex* sp.; T.: *Trachymyrmex* sp.) followed by the country of origin (AR: Argentina; BR: Brazil; EC: Ecuador; GUI: Guiana; MX: Mexico; PA: Panama; TR: Trinidad). *Escovopsis* isolates from the present study are shown in bold face and cluster in the group A as described by Taerum et al. (2007).

4.***CAPÍTULO 2***

**ECOLOGIA DOS MICROFUNGOS ASSOCIADOS AOS
JARDINS DAS FORMIGAS DA TRIBO ATTINI
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**

4.1 Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil da comunidade de microfungos encontrados nos jardins de fungos de três espécies de formigas da tribo Attini e investigar se existem relações espécie-específicas entre os dois grupos de organismos. Para tanto, foram isolados os microfungos dos jardins de 16 ninhos de *Cyphomyrmex wheeleri* (Attini primitiva), 16 ninhos de *Trachymyrmex septentrionalis* (Attini derivada) e quatro ninhos de *Atta texana* (formiga cortadeira), durante o período de um ano (entre 2005 e 2006). Os resultados indicaram que as formigas da tribo Attini continuamente entram em contato com diversos microfungos, pois: (i) a proporção de fragmentos de jardins com microfungos variou segundo as estações do ano em todas as espécies de formigas analisadas; sendo que para *C. wheeleri* e *T. septentrionalis*, a proporção foi maior durante o verão e no outono, já para *A. texana* a proporção foi maior no inverno; (ii) a diversidade de microfungos também variou segundo as estações do ano para as três espécies de formigas, porém não houve correlação entre o número de espécies recuperadas em cada estação e o padrão de forrageamento das formigas, as quais tendem a coletar mais substrato para cultivar seu fungo simbiote nas épocas mais quentes do ano (iii) de maneira geral, a composição das comunidades de microfungos foi diferente para as três formigas Attini, porém houve uma tendência de *A. texana* e *T. septentrionalis* compartilharem uma comunidade mais homogênea em relação à comunidade de microfungos obtida de *C. wheeleri*, sendo essas diferenças relacionadas com o tipo de substrato coletado pelas formigas (i.e. sementes e carcaças de insetos em *C. wheeleri* e substrato vegetal no caso das outras formigas). Interessante foi o fato de *Escovopsis* spp., fungo parasita especializado da simbiose das formigas Attini, não ser isolado neste estudo, sugerindo uma baixa frequência nas populações dessas formigas. Esse estudo demonstra que a interação entre as formigas e os microfungos pode ser considerada diversa e efêmera, de modo que as formigas necessitam de uma ampla gama de mecanismos para controlar o crescimento desses microfungos, que de outra maneira poderiam agir como antagonistas do fungo cultivado pelas formigas.

Palavras chave: *Atta*; *Cyphomyrmex*; *Escovopsis*; formigas; diversidade; fungos filamentosos; interação; *Trachymyrmex*

4.2 Introdução

As formigas da tribo Attini (Hymenoptera: Formicidae) são insetos sociais conhecidos por manterem uma simbiose com fungos, que se originou há aproximadamente 50 milhões de anos (SCHULTZ; BRADY, 2008). No interior de câmaras subterrâneas, esses insetos cultivam um fungo basidiomiceto utilizado como a única fonte de alimento para as larvas (SILVA et al., 2003). Para estimular o crescimento fúngico, as operárias utilizam diversos tipos de substratos que coletam e trazem para seus ninhos. Dependendo da espécie de formiga, o tipo de substrato coletado pode variar; por exemplo, as Attini primitivas coletam carcaças e fezes de insetos, bem como material vegetal seco; já as Attini consideradas derivadas, utilizam matéria vegetal fresca, como folhas e flores para cultivar seu fungo (WEBER, 1972). Uma vez no interior do ninho, o substrato é processado pelas operárias e incorporado no “jardim de fungo”, estrutura composta pelo micélio do fungo e do substrato coletado (ANDRADE et al., 2002).

Na última década, o conhecimento dessa simbiose mudou drasticamente, revelando que a interação entre as formiga e o fungo é mais complexa do que outrora se pensava. Mikheyev e colaboradores (2006) demonstraram que as formigas cortadeiras (um subgrupo das Attini derivadas) do gênero *Atta* e *Acromyrmex* distribuídas em uma ampla região geográfica, cultivam uma única linhagem do fungo simbiote, sendo, portanto, a “agricultura” dessas formigas considerada uma monocultura (MUELLER et al., 2002; SCHULTZ et al., 2005). A exemplo das monoculturas mantidas pelo homem, do mesmo modo, os jardins de fungos das formigas Attini são constantemente ameaçados por patógenos e parasitas (MUELLER et al., 2005).

Assim, foi descoberto que fungos filamentosos do gênero *Escovopsis* são parasitas especializados do fungo simbiote, sendo apenas encontrados nos jardins de fungos dessas formigas (CURRIE et al., 1999a). Evidências demonstram que *Escovopsis* spp. compartilha uma antiga história evolutiva com o fungo cultivado (GERARDO et al., 2006a) e, em muitos casos, tal fungo pode ocasionar um impacto significativo nas colônias, potencialmente levando-as a morte (CURRIE, 2001b). Para proteger os ninhos desse parasita, as formigas apresentam em suas cutículas, uma bactéria filamentosa (actinomiceto do gênero *Pseudonocardia* spp.) que produz substâncias antimicrobianas que inibem o crescimento de *Escovopsis* spp. (CURRIE et al., 1999b; CAFARO; CURRIE, 2005)

Com a descoberta desse parasita, os jardins de fungos passaram a ser considerados como um ecossistema em miniatura (SCHULTZ et al. 2005; YOUNGSTEADT, 2008), pois,

apesar da escala reduzida, é um ambiente dinâmico e complexo que abriga microrganismos que interagem entre si (MUELLER et al., 2005). Assim, é sabido que os jardins de fungos podem abrigar outros microrganismos, tais como bactérias (BACCI et al., 1995), fungos filamentosos (RODRIGUES et al., 2005a) e leveduras (CRAVEN et al., 1970; CARREIRO et al., 1997), os dois últimos aqui chamados de “microfungos”. Contudo, o papel que esses microrganismos eventualmente desempenham na simbiose das formigas Attini ainda não foi investigado em detalhes. Santos et al. (2004) e Rodrigues et al. (capítulo 3) demonstraram que bactérias e leveduras presentes nos jardins de formigas cortadeiras podem inibir o crescimento de *Escovopsis* spp., sugerindo que esses microrganismos auxiliem na proteção dos ninhos contra esse parasita. Ainda, foi relatado que as leveduras presentes no jardim de fungos podem auxiliar o fungo simbiote a digerir o substrato coletado pelas operárias, através da produção de enzimas hidrolíticas (CARREIRO, 2000).

Apesar dos benefícios que os microrganismos podem trazer para a associação, alguns deles podem atuar de maneira antagonista ao fungo cultivado (SILVA et al., 2006a). Por exemplo, microfungos presentes no solo e no substrato utilizado para cultivar o fungo simbiote são constantemente incorporados nos jardins de fungos, e estes podem encontrar neste ambiente um local ideal para seu desenvolvimento (FISHER et al. 1996; RODRIGUES et al. 2005a, 2008a). Apesar dos diversos mecanismos físicos e químicos apresentados pelas operárias para remover esses microfungos (CURRIE; STUART, 2001; BOT et al., 2002; FERNANDEZ-MARÍN et al., 2006; RODRIGUES et al., 2004, 2008b; STOW; BEATTIE, 2008), por motivos ainda desconhecidos, alguns deles permanecem. De fato, microfungos do gênero *Cunninghamella* spp., e *Syncephalastrum* spp. são frequentemente encontrados em ninhos *Atta sexdens rubropilosa* mantidos no laboratório (RODRIGUES et al., 2005a). Já os microfungos *Cunninghamella* spp., *Fusarium* spp. e *Trichoderma* spp. estão frequentemente associados com ninhos de campo de *Acromyrmex* spp. e *A. sexdens rubropilosa* (RODRIGUES et al., 2005a; 2008a). No entanto, pouco se sabe como as formigas interagem com esses microfungos e se de fato alguns deles podem ser considerados parasitas especializados. As evidências demonstram que muitos desses microfungos não são parasitas especializados do fungo cultivado (POULSEN; CURRIE, 2006; RODRIGUES et al., 2008a).

Na tentativa de entender as possíveis interações entre as formigas e os microfungos potencialmente antagonistas, o presente estudo avaliou a diversidade e a estrutura das comunidades de microfungos presentes nos jardins de três espécies de formigas Attini. O principal objetivo do trabalho foi verificar se existem associações espécie-específica entre os microfungos e as formigas e se tais associações permanecem ao longo do tempo (i.e.

duradouras). Para tanto, a composição das comunidades microfúngicas foram observadas durante quatro estações do ano e correlacionadas com o padrão de forrageamento esperado e o tipo de substrato coletado para cada espécie de formiga (WEBER, 1956; MINTZER, 1979; WEBER, 1972).

Os resultados demonstraram que as formigas abrigam em seus jardins uma comunidade dinâmica e diversa de microfungos, com a qual entram em contato ao longo do ciclo de vida da colônia e que devem controlar para não afetar o crescimento do fungo cultivado. Mecanismos utilizados pelas operárias para controlar essa microbiota ampla e diversificada são discutidos nesse trabalho.

4.3 Materiais e métodos

i) Coletas das amostras

Para avaliar o perfil da comunidade de microfungos presentes nos jardins das formigas Attini, foram estudadas três espécies: *Cyphomyrmex wheeleri* (Attini primitiva), *Trachymyrmex septentrionalis* (Attini derivada) e *Atta texana* (formiga cortadeira, i.e. um grupo dentro das Attini derivadas). As formigas escolhidas correspondem a três tipos mais freqüentes de agricultura observados nesses insetos (SCHULTZ; BRADY, 2008).

Os jardins de fungos foram amostrados em quatro períodos: (i) inverno (entre 12 de dezembro de 2005 a 21 de janeiro de 2006), (ii) primavera (entre 27 de março a quatro de maio de 2006), (iii) verão (entre 21 e 22 de junho de 2006) e (iv) outono (entre 30 de setembro a 20 de outubro de 2006).

Em cada estação do ano, quatro colônias de *C. wheeleri* foram escavadas no Bull Creek Park (Austin, Texas – GPS: 30° 22' 16" N, 97° 47' 08" O) e quatro colônias de *T. septentrionalis* foram escavadas no Stengl “Lost Pines” Biology Station (Smithville, Texas – GPS: 30° 05' 13" N, 97° 10' 15" O), totalizando 16 colônias para cada espécie de formiga no período de estudo. *C. wheeleri* é especializada em habitat secos, abertos, de solo arenoso, no qual existe uma vegetação esparsa, como ocorre no Bull Creek Park. Nesse ambiente, as operárias de *C. wheeleri* já foram observadas forragearem por sementes de gramíneas, carcaças de larvas de borboleta e material vegetal fibroso (U. G. MUELLER, observação pessoal). Os ninhos de *T. septentrionalis* encontravam-se em solo arenoso num ambiente dominado por pinheiros, portanto, um ambiente bem diferente do primeiro. As operárias de *T. septentrionalis* forrageam por pequenos fragmentos de folhas secas e sementes (SEAL;

TSCHINKEL, 2008; MIKEYHEV et al., dados não publicados). As colônias de *C. wheeleri* e *T. septentrionalis* geralmente apresentam uma ou duas câmaras com jardins de fungos. Foi dada a preferência para escavar e coletar os jardins presentes nas primeiras câmaras.

Devido à presença de várias câmaras nos ninhos de *A. texana*, quatro colônias foram amostradas repetidas vezes nos diferentes períodos de coleta. Este procedimento permitiu avaliar durante um ano, as diferenças no perfil da comunidade de microfungos nos mesmos ninhos. Assim, três colônias foram escavadas no Hornsby Bend Environmental Research Center (Austin, Texas – GPS: 30° 14' 00" N, 97° 39' 03" O) e a outra próxima a Buescher State Park (Bastrop County, Texas – GPS: 30° 06' 20" N, 97° 13' 46" O), locais onde o solo é bastante arenoso. O ambiente no Hornsby Bend Environmental Research Center é composto, principalmente, por carvalhos e uma planta chamada (“pecan”). Já o ambiente no Buescher State Park é semelhante ao ambiente das *T. septentrionalis*.

Os ninhos foram escavados próximo da região onde estava concentrada a maior atividade (i.e. presença de várias entradas e/ou operárias). Após abertura de uma trincheira (ver Anexo), a escavação continuou lateralmente em direção ao túnel até encontrar a câmara contendo o jardim de fungos. O método de escavação empregado evitou que o solo adjacente às câmaras caísse sobre o jardim de fungo, evitando assim a contaminação por outros microrganismos (ver Anexo). Após a abertura das câmaras e exposição dos jardins de fungos, fragmentos do centro do jardim contendo operárias, larvas e pupas foram coletados com espátula estéril e armazenados em recipientes estéreis até o transporte ao laboratório (que ocorreu num período de no máximo quatro a oito horas). As amostras foram descartadas quando, no momento da coleta, o jardim de fungo tocou as paredes da câmara; nesses casos uma nova câmara de fungo foi escavada para coletar nova amostra.

No caso de *A. texana*, os jardins de fungos apresentaram aspectos diferentes durante as estações do ano. Na maioria das vezes, foram coletados jardins com coloração marrom – esbranquiçada, que significa que as formigas não adicionaram muito substrato. Porém, para os ninhos UGM060121-01 e UGM060121-02, na primavera, foram coletados jardins com coloração marrom – escura, que significa que as operárias adicionaram substrato vegetal. No outono, o mesmo tipo de jardim foi encontrado no ninho UGM060121-02.

Devido às repetidas escavações dos ninhos de *A. texana*, todas as trincheiras escavadas foram fechadas após cada coleta, com o intuito de evitar que os ninhos se mudassem para um novo local (devido à perturbação do ninho com a escavação). No outono de 2006, foram encontrados jardins de fungos em três ninhos de *A. texana*, porém, em um ninho (código: AR060123-01) não foi encontrado o jardim de fungos. A escavação desse ninho revelou a

presença de várias câmaras contendo um substrato com aspecto semelhante ao de jardim de fungos, porém seco e deteriorado. Portanto, nas análises referentes ao outono foram considerados apenas três ninhos de *A. texana*.

ii) Isolamento dos microfungos

Com auxílio de uma pinça esterilizada, as operárias, larvas e pupas foram removidas dos jardins de fungos, e fragmentos do mesmo, com aproximadamente 3 mm³ (CURRIE et al., 1999a), foram inoculados em três meios de cultivo: (i) ágar malte 2 % (MA 2 %, EMBL-DIFCO), (ii) ágar Batata-Dextrose (PDA, EMBL-DIFCO) e (iii) ágar nutriente sintético – (SNA, contendo em g.L⁻¹: 1 KH₂PO₄; 1 KNO₃; 0,5 MgSO₄.7H₂O; 0,5 KCl; 0,2 glicose; 0,2 sacarose), todos suplementados com 150 µg.ml⁻¹ de cloranfenicol (Sigma) (GAMS, 1998). Vinte fragmentos de jardins de fungos de *C. wheeleri* e *T. septentrionalis* e 25 fragmentos de jardins de fungos de *A. texana* foram inoculados nos três meios de cultura em cada estação do ano. No inverno de 2005, os jardins de fungos de *T. septentrionalis* se apresentavam com tamanho reduzido, pois as operárias diminuem o forrageamento nesse período, assim não adicionando substrato nos jardins de fungos (WEBER, 1956; U. G. MUELLER, observação pessoal). Desse modo, somente 10 fragmentos de jardins de fungos por ninho de *T. septentrionalis* foram utilizados para os isolamentos nessa estação do ano.

As placas de isolamento foram observadas diariamente e uma vez constatado o crescimento de algum microfungo, este foi transferido para uma nova placa de MA 2 % para confirmar a pureza da cultura. Todas as placas foram incubadas a 25° C de sete a dez dias, com regime de 12 horas luz e 12 horas escuro. Os isolados mais representativos nesse estudo foram preservados em glicerol 10 % e estocados a – 80° C, para posterior identificação.

iii) Identificação através de marcadores morfológicos

O presente estudo utilizou uma abordagem conjunta para identificar os microfungos isolados, baseando-se tanto em caracteres morfológicos, quanto moleculares.

Após a confirmação da pureza, os isolados foram inoculados em MA 2 % e em ágar aveia (OA) e incubados nas mesmas condições descritas no item (ii). Tais culturas foram examinadas e os principais gêneros foram determinados com o auxílio de chaves de identificação (SUBRAMANIAN, 1971; ELLIS, 1971, 1976; DOMSCH et al., 1980; SAMSON et al., 2000). Nessa triagem, os gêneros reconhecidos foram posteriormente

inoculados nos meios apropriados e características macroscópicas e microscópicas da colônia foram utilizadas para a identificação, de acordo com os tratados taxonômicos de cada grupo de fungo, por exemplo: *Aspergillus* spp. (KLICK, 2002), *Cunninghamella* spp. (SAMSON, 1969; LIU et al., 2001), *Fusarium* spp. (NELSON et al., 1983), *Penicillium* spp. (PITT, 1988), *Phoma* spp. (BOEREMA et al., 2004), Mucorales (ZYCHA, 1935), fungos entomopatogênicos (SAMSON et al., 1988), entre outros.

Os fungos que não foram identificados durante a triagem, devido à ausência de caracteres morfológicos, por exemplo, fungos que não produzem as estruturas de reprodução assexuada em cultura, foram inoculados em OA e ágar batata-cenoura (PCA, HIMEDIA) e incubados a 25° C durante vários meses. Essas culturas foram examinadas por vários meses a procura das estruturas de reprodução que eventualmente se formassem.

iv) Identificação através de marcadores moleculares

Para auxiliar o processo de identificação, foi seqüenciada a região ITS (intergenic spacer region) do DNA ribossomal da maioria dos microfungos isolados. Essa região apresenta cerca de 400-800 pares de bases e é tradicionalmente utilizada para separar espécies de fungos, em alguns grupos (LIU et al., 2001; DRUZHININA et al., 2005). As extrações de DNA seguiram o protocolo de Mikheyev et al. (2006), que consiste no aquecimento (60° C, durante uma hora e meia) de uma pequena fração de micélio do microfungo (cultivado em MA 2 %, a 25° C, durante sete dias) na presença de 100 µL de solução de resina Chelex a 5% (Sigma). Após o aquecimento inicial, a solução foi fervida a 99° C por dez minutos e uma alíquota de 1.0 µL do extrato bruto foi utilizada na amplificação da região ITS. Os iniciadores (primers) ITS4 e ITS5, descritos por White et al. (1990), foram escolhidos para este estudo. As reações de amplificação com 10 µL de volume final incluíram: tampão KCl 10x, 0,8 µM de cada primer, 1 mM de cada dNTPs, 2,5 mM de MgCl₂, e 1U da enzima Taq polimerase (Bioline). As condições da reação de amplificação foram: desnaturação inicial de 94° C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos a 94° C por 1 minuto, 52° C por 1 minuto e 72° C por 2 minutos. As purificações dos produtos de amplificação, eletroforese em gel de agarose (1%) e as condições das reações de seqüenciamento seguiram o descrito por Mikheyev et al. (2006). Tanto as seqüências forward, quanto as seqüências reverse foram geradas em seqüenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems).

As seqüências consenso foram editadas no programa BioEdit v.7.0.5.3 (HALL, 1999) e utilizadas na comparação com a base de dados do NCBI – GenBank através do aplicativo

BLASTn (ALTSCHUL et al., 1997). As seqüências dos fungos do gênero *Trichoderma* foram comparadas com outras depositadas no banco de dados do International Subcommission on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy (ISTH), utilizando o aplicativo *TrichOKEY* (DRUZHININA et al., 2005). As seqüências mais próximas encontradas nos bancos de dados às seqüências de estudo foram consideradas como o resultado da identificação molecular (confira as Tabelas 2, 3 e 4 para os códigos de acesso das seqüências). Para muitos dos fungos seqüenciados, não foram encontradas as seqüências mais próximas às seqüências de estudo. Nesses casos e naqueles onde o BLASTn recuperava seqüências de microrganismos não cultiváveis (um exemplo comum de resultado foi: “uncultured ascomycetes” na base de dados do GenBank), os fungos deste estudo foram, portanto, considerados como não identificados e estão sob a terminologia de “n.i. ascomycetes” (Tabelas 2, 3 e 4).

v) *Predominância de microfungos nos jardins das formigas Attini*

O número de microfungos que cresceram nos fragmentos de jardins foi utilizado como uma medida para avaliar a carga de microfungos presentes nos ninhos de *C. wheeleri*, *T. septentrionalis* e *A. texana*. Esses valores foram transformados em proporções em relação ao número total de fragmentos analisados para cada ninho de cada espécie de formiga e, em seguida as médias foram utilizadas para comparação dessas proporções. Além disso, foi avaliada a proporção média de fragmentos com microfungos entre as estações do ano para cada espécie de formiga, bem como as proporções médias de microfungos nos diferentes meios de cultura utilizados para o isolamento. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para verificar diferenças significativas entre as proporções médias e o teste de comparação múltipla de Dunn para verificar diferenças entre as estações do ano e nos meios de cultura, sendo ambos realizados no programa BioEstat v. 5.0 (AYRES et al., 2007).

iv) *Análise da diversidade e do perfil da comunidade de microfungos*

Para comparar a diversidade de microfungos entre as diferentes épocas do ano nas três formigas Attini, o algoritmo de rarefação foi empregado nos dados apresentados nas tabelas 2, 3 e 4. A técnica de rarefação é utilizada nos estudos de ecologia para comparar comunidades com diferente esforços amostrais (diferentes números de indivíduos amostrados, N) onde o número esperado de espécies, $E(S)$, é estimado a partir de sub-amostragens aleatórias das comunidades que apresentam maior número de indivíduos (MAGURRAN et al., 2004). O

programa EcoSim v. 7.72 (GOTELLI; ENTSMINGER, 2008, disponível em <http://www.garyentsminger.com/ecosim/index.htm>) implementa o algoritmo de rarefação e o resultado pode ser facilmente expresso graficamente.

Além da análise de diversidade, foi realizada análise de correspondência para investigar o perfil da comunidade de microfungos em cada espécie de formiga e para avaliar as interações não aparentes entre os perfis de microfungos vs. estações do ano vs. espécie de formiga. A análise de correspondência foi realizada no programa JMP[®] in versão 4.0.3 (SAS Institute Inc.).

4.4 Resultados

i) Predominância de microfungos

Foram isolados vários microfungos dos fragmentos de jardins inoculados nos meios de cultivo das três espécies de formigas analisadas. Foram recuperados mais microfungos nos fragmentos de jardins de *C. wheeleri*, quando comparado aos jardins de fungos de *T. septentrionalis* e *A. texana* (Figura 1). Com relação aos três meios de cultura empregados nesse estudo, os isolamentos mostraram que existiram pequenas diferenças nas proporções de microfungos isolados dos fragmentos de jardins, porém essas diferenças não foram estatisticamente significativas para todas as formigas: *C. wheeleri* (Kruskal-Wallis, $H= 0,22$, $p= 0,89$), *T. septentrionalis* (Kruskal-Wallis $H= 0,65$, $p= 0,72$) e *A. texana* (Kruskal-Wallis $H= 1,13$, $p= 0,56$) (Figura 2).

Ainda, os dados indicaram que os jardins de fungos *C. wheeleri* (Kruskal-Wallis $H= 12,26$, $p= 0,006$), *T. septentrionalis* (Kruskal-Wallis, $H= 11,45$, $p= 0,009$) e *A. texana* (Kruskal-Wallis, $H= 7,91$, $p= 0,04$) tiveram diferenças significativas na prevalência de microfungos entre as estações do ano (Figura 3). Na primavera, houve uma menor proporção de microfungos do que no verão (teste de Dunn, $z= 2,82$, $p< 0,05$) e outono (teste de Dunn, $z= 2,89$, $p< 0,05$) nos jardins de fungos de *C. wheeleri*. Por outro lado, no inverno recuperou-se menos microfungos do que no verão (teste de Dunn, $z= 3,04$, $p< 0,05$) nos ninhos de *T. septentrionalis*. Já nos jardins de fungos de *A. texana*, houve uma tendência de se recuperar menos fungos no verão e no outono, porém as diferenças observadas não foram suficientes para o teste de comparações múltiplas de Dunn encontrar significância a 5%.

ii) *Diversidade de microfungos nos jardins das formigas Attini*

Foi gerada uma coleção de microfungos com 1437 isolados provenientes das três espécies de formigas avaliadas (Tabela 1). Um total de 99 gêneros e 168 espécies foi obtido. Dos 531 isolados de *C. wheeleri*, 94 deles foram de fungos não identificados e o restante dos isolados compreenderam 59 gêneros e 66 espécies. Em média, a riqueza de táxons nesses ninhos foi de 11,5; 10,25; 14,5; 15; no inverno, primavera, verão e outono, respectivamente. Os microfungos predominantes em cada estação do ano nos jardins dessa formiga foram: uma espécie de zigomiceto não identificada (13%) e *Nigrospora oryzae* (11%) no inverno (Tabela 2a); o complexo de espécie *Verticillium* spp.* (16%) e *Cladosporium cladosporioides* (13%) na primavera (Tabela 2b); *Ampelomyces* sp. 1 (11%) e *Curvularia inaequalis* (12,5%) no verão (Tabela 2c); e *Nigrospora oryzae* (27%) e *Ampelomyces* sp. 1 (8,2%) no outono (Tabela 2d).

Dos 385 isolados obtidos dos jardins de fungos de *T. septentrionalis*, 52 não foram identificados e o restante deles compreendeu 50 gêneros e 71 espécies. Em média, a riqueza de táxons nesses ninhos foi de 5,25; 12,5; 11,75; 16,54; no inverno, primavera, verão e outono, respectivamente. Os microfungos predominantes em cada estação do ano nos jardins dessa formiga foram: *Penicillium restrictum* (18%) e *Ceratocystis fimbriata* (9%) no inverno (Tabela 3a); *P. restrictum* (8,3%), *Penicillium dravuni* (13,3%) e *Mortierella* sp. 1 (13,3%) na primavera (Tabela 3b); o anamorfo de *Gloeotinia* (18%) e *Penicillium verruculosum* (10%) no verão (Tabela 3c); e o “complexo *Verticillium* sp.” (9%) e *Penicillium decumbens* (7%) no outono (Tabela 3d).

No caso de *Atta texana*, dos 521 isolados obtidos, 45 deles não foram identificados e o restante compreendeu 54 gêneros e 81 espécies. Em média, a riqueza de táxons nesses ninhos foi de 15,5; 18,35; 12; 11,6; no inverno, primavera, verão e outono, respectivamente. Os microfungos predominantes em cada estação do ano foram: *Cladosporium cladosporioides* (17%), *Aspergillus ustus* (12%) e *Aspergillus ochraceus* (11,5%) no inverno (Tabela 4a). Nessa estação do ano, do total de isolados obtidos (n= 225, Tabela 1), grande parte pertencia a esses gêneros. *C. cladosporioides* (8%) e *Alternaria alternata* (7,3%) na primavera (Tabela 4b); *Phialophora* spp. (9,4%) e *Chaetomium* spp. (8,2%) no verão (Tabela 4c); e *Cladosporium* sp. (13%) e *Cochliobolus australiensis* (10%) no outono (Tabela 4d).

O parasita especializado *Escovopsis* spp. não foi isolado de nenhum ninho das três espécies de formigas estudadas durante as várias estações do ano.

* *Verticillium* sp. é considerado um *form-genus*, ou seja, um gênero que abriga fungos não relacionados mas com morfologia semelhante. Atualmente, esse gênero foi dividido em dois outros: *Lecanicillium* e *Simplicillium* (ZARE; GAMS, 2001). Neste trabalho, adotamos a terminologia “complexo *Verticillium* sp.” para relacionar fungos anamórficos que produzem fialides em vertice e com morfologia semelhante a *Verticillium* sp.

iii) Microfungos e sua relação com as estações do ano

As comunidades de microfungos apresentaram diversidades diferentes entre as estações do ano nos jardins de fungos de *C. wheeleri*, *T. septentrionalis* e *A. texana* (Figura 4). Em *C. wheeleri* a diversidade de microfungos foi maior no inverno e na primavera quando comparada com as outras estações do ano (Figura 4a). Em *T. septentrionalis*, a diversidade de microfungos foi maior na primavera e no outono (Figura 4b) e em *A. texana* a diversidade foi maior na primavera e no verão (Figura 4c).

A análise de correspondência revelou que os jardins de fungos de *C. wheeleri* apresentaram uma comunidade de microfungos heterogênea (Figura 5). Os resultados sugerem que as comunidades do inverno e outono pareceram ser mais semelhantes entre si do que as comunidades apresentadas na primavera e verão. No caso de *T. septentrionalis*, as comunidades de microfungos isoladas no inverno e na primavera são mais semelhantes entre si do que as comunidades observadas no verão e no outono (Figura 6). O mesmo ocorreu com as comunidades de microfungos isoladas dos jardins de *A. texana* (Figura 7).

A análise de correspondência geral (Figura 8) dos dados de diversidade provenientes das três espécies de formigas revelou que todas as formigas apresentaram comunidades bastante heterogêneas, sendo que as comunidades de *T. septentrionalis* e *A. texana* têm uma maior tendência a compartilharem mais espécies de microfungos (Figura 8).

4.5 Discussão

O jardim de fungos das formigas Attini constitui-se num consórcio de microrganismos provenientes de diversas origens e que podem interagir entre si (MUELLER et al., 2005; GERARDO et al., 2006b; YOUNGSTEADT, 2008). Nesse sentido, muitos desses microrganismos podem ser apenas transientes ou alguns deles podem efetivamente desempenhar uma função que os torne mais frequentes nos ninhos, como é sabido para o parasita *Escovopsis* spp. (CURRIE, 2001a,b).

No caso dos microfungos, sabe-se que o número desses microrganismos nos jardins de fungos é elevado, pois cerca de 55 %, 45% e 35% dos fragmentos de jardins de *C. wheeleri*, *T. septentrionalis* e *A. texana* continham esses microrganismos, respectivamente (Figura 1). Currie et al. (1999a), estudando formigas Attini da América Central, observaram resultado semelhante, pois as proporções de microfungos isolados dos jardins das formigas mais primitivas, como é o caso de *C. wheeleri*, tendem a ser mais altas quando comparadas às taxas

de isolamento dos microfungos nas Attini derivadas. De fato, Currie (2002) observaram que ninhos das Attini primitivas mantidos no laboratório são freqüentemente infectados por outros fungos além de *Escovopsis* spp., mesmo na presença das formigas. Isso sugere que as Attini primitivas devem encontrar mais dificuldades para remover esses fungos dos jardins (CURRIE, 2002).

Considerando a diversidade de microfungos encontrada, percebe-se que a grande maioria dos isolados são reconhecidamente cosmopolitas (de distribuição mundial), sendo encontrados no solo e nas superfícies das plantas (DOMSCH et al., 1980). O número dessas espécies de fungos varia com as estações do ano, sendo poucas as espécies persistentes durante os períodos avaliados. Embora, não haja aparentemente uma relação espécie-específica (POULSEN et al., 2007; RODRIGUES et al., 2008a) entre os microfungos e as formigas, notou-se que no caso de *C. wheeleri*, alguns táxons como *C. cladosporioides*, *N. oryzae*, *Paecilomyces lilacinus* e fungos do gênero *Penicillium*, foram recuperados sistematicamente dos jardins em todas as estações do ano. Isso sugere que esses fungos podem persistir ao menos na forma latente, por um período no interior dos ninhos, principalmente no inverno, período de menor forrageamento pelas formigas.

Outro dado interessante e que confirma a hipótese acima, é o fato que as diferenças observadas na diversidade de microfungos nas três espécies de formigas para cada estação do ano não foram correlacionadas com o comportamento de forrageamento das formigas. No hemisfério norte, as formigas Attini tendem a diminuir a coleta de substrato durante o inverno (MINTZER, 1979) e, em alguns casos, por exemplo, *T. septentrionalis* cessam completamente sua atividade (WEBER, 1956). Portanto, era de se esperar que nos meses com temperaturas mais baixas e com pouca adição de substrato aos jardins, que os mesmos apresentariam uma menor diversidade de microfungos em relação às outras épocas do ano, quando as operárias forrageam mais (WEBER, 1972). Isso foi verdadeiro para a diversidade recuperada na primavera nos jardins de *C. wheeleri* e *T. septentrionalis*, mas não para a diversidade recuperada no inverno para *C. wheeleri* e no outono para *T. septentrionalis*, segundo as curvas de rarefação (Figura 4a e 4b). Por outro lado, em ninhos de *A. texana* uma maior diversidade de microfungos foi recuperada, com diferenças significativas entre as estações do ano (Figura 6c).

Além da diversidade, os perfis de espécies de microfungos obtidos para cada espécie de formiga demonstraram que os jardins não compartilharam uma comunidade homogênea durante cada estação (Figuras 5, 6 e 7). Isso demonstra que as formigas importam para seus jardins diferentes espécies de fungos em cada estação do ano, ou seja, as formigas levam para

o interior dos ninhos microfungos presentes no material coletado, o que deve variar segundo o ciclo de cada microfungo na natureza. Dado interessante foi observar que as três formigas possuem comunidades de microfungos diferentes (Figura 8), com poucas espécies em comum; a exceção foi que *A. texana* e *T. septentrionalis* apresentam mais espécies em comum. As duas hipóteses mais plausíveis para explicar esses dados são: (i) as formigas foram coletadas em locais diferentes, portanto com disponibilidade de fungos diferentes no ambiente durante as estações do ano e (ii) as formigas forrageiam substratos diferentes, os quais possuem composição diferente e variada de microfungos. Esta última hipótese está de acordo com o observado, pois *T. septentrionalis* também pode forragear substrato vegetal fresco, um comportamento mais derivado também encontrando nas formigas cortadeiras (WEBER, 1972).

As análises de diversidade mostraram que a comunidade de microfungos nos jardins desses insetos tem origem diversa e polifilética. Starmer et al. (2003), estudando comunidades de leveduras associadas aos cactos, observaram que muitas das espécies presentes nesse ambiente vieram de outros locais através da dispersão por drosófilas. Observaram ainda que somente poucos táxons eram específicos de um tipo de tecido vegetal do cacto. Associações entre fungos e insetos parecem seguir esse padrão. Nesse caso, o que resta é saber qual é a influência das poucas espécies que estão especificamente ou constantemente associadas com os insetos, por exemplo, *C. cladosporoides* e *P. lilacinus*.

Um resultado interessante foi a ausência do parasita *Escovopsis* spp. nos ninhos das formigas analisadas. Análises adicionais em 12 ninhos jovens de *A. texana* (aprox. 6 meses de idade, A. Rodrigues – dados não publicados) coletados no estado do Texas e empregando os mesmos métodos de isolamento, também resultaram no não isolamento desse fungo. Mikheyev et al. (2008) estudando populações de *T. septentrionalis*, também não encontraram o parasita associado aos jardins dessa formiga. Segundo Currie et al. (1999a), *Escovopsis* spp. é encontrado com grande frequência nas formigas da América Central, sendo isolado em mais de 50 % das colônias analisadas, dependendo do gênero de formiga. Gerardo et al. (2006a) trabalhando com *Apterostigma* spp. (uma Attini primitiva) também na região da América Central, revelou uma taxa de infecção por *Escovopsis* de 52 % nessas formigas. No Brasil, a frequência de *Escovopsis* spp. parece ser mais baixa, sendo encontrado em 15 % e 21 % em ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* de campo e de laboratório, respectivamente (RODRIGUES et al., 2005a). Para diversas espécies de *Acromyrmex* coletadas no campo, a frequência de *Escovopsis* spp. foi de 27 % (RODRIGUES et al., 2008a). Os valores apresentados demonstraram a necessidade que estudos epidemiológicos mais sistemáticos

sejam realizados, pois (i) as diferenças nos métodos de isolamento entre os estudos dificultam a comparação das taxas de infecção; (ii) existe o risco de infecção aparente por *Escovopsis* spp., ou seja, o parasita encontra-se no ninho, porém não é detectado pelos métodos de isolamento (GERARDO et al., 2004) e (iii) Currie e colaboradores (1999a) estudaram várias Attini primitivas na América Central e no Brasil não foram realizados estudos sobre infecção de *Escovopsis* spp. em ninhos das Attini primitivas, mas somente em ninhos de formigas cortadeiras, como *Atta* e *Acromyrmex* sp. (RODRIGUES et al., 2005a; 2008a).

A não ocorrência de *Escovopsis* spp. encontrada nesse estudo, somado com resultados negativos ou de baixa frequência em estudos prévios, podem indicar que o parasita não seja um patógeno consistente para as populações de formigas cultivadoras de fungos em toda a extensão da distribuição das Attini no continente americano. Assim, o cenário atual apresenta: *Escovopsis* sp. pouco freqüente na América do Norte, freqüência moderada de *Escovopsis* spp. nas populações de formigas da América do Sul (Brasil) e um alta prevalência desse parasita nas populações da América Central. Mais interessante foi o encontrado por Mikheyev et al. (2008): estudando populações de *T. septentrionalis* em diversos estados dos EUA verificaram a ausência de *Escovopsis* spp. nos ninhos, porém observaram a presença do actinomiceto *Pseudnocardia* spp. Esse dado interessante sugere que outros microrganismos podem ser responsáveis pela proteção dos ninhos contra microrganismos antagonistas (Capítulo 3). Em vista dos resultados acima, percebe-se que a simbiose das formigas Attini é complexa e muitos estudos irão demonstrar que os microrganismos constituem uma parte essencial nessa simbiose.

4.6 Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer K. Anderson pela permissão para trabalhar no Hornsby Bend Environmental Research Center e a Phil Schappert pela permissão de trabalhar no Stengl “Lost Pines” Biology Station. Este trabalho foi financiado por uma bolsa de Cooperação Internacional Capes – University of Texas at Austin (02/05). Agradecemos também ao Conselho Nacional de Pesquisa Científica e Tecnológica (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro prestado durante o período de doutorado.

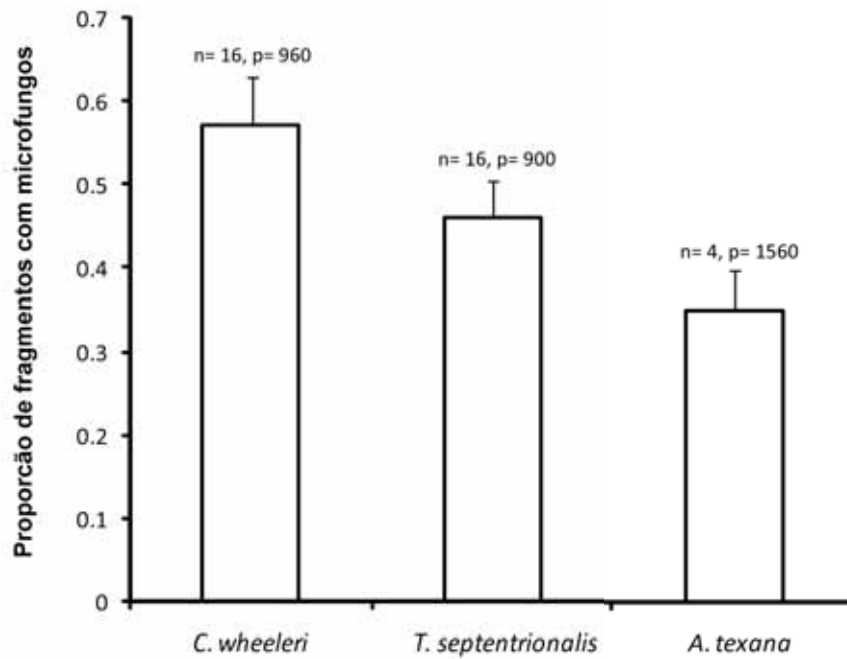


Figura 1. Proporção de fragmentos de jardins de fungos das formigas *Cyphomyrmex wheeleri*, *Trachymyrmex septentrionalis* e *Atta texana* contendo microfungos (Barras indicam erro padrão, n= número de ninhos e p= total de fragmentos analisados).

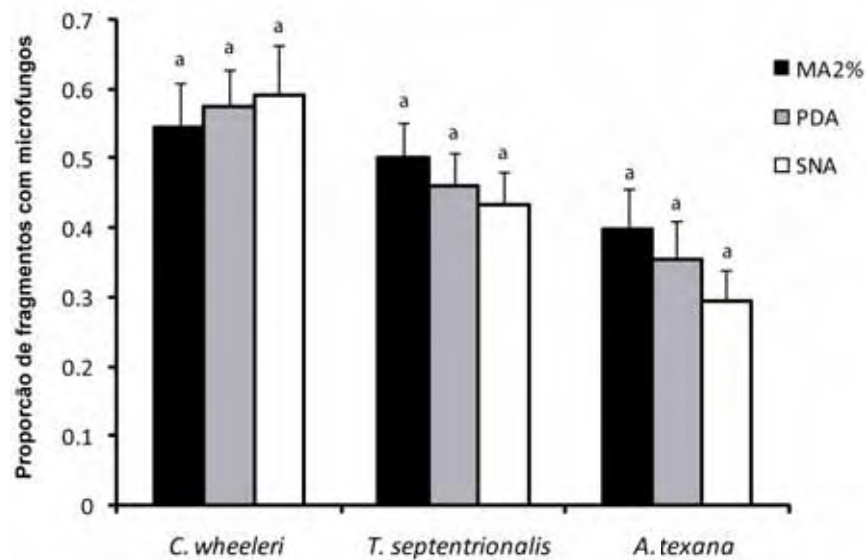


Figura 2. Proporção de fragmentos de jardins de fungos das formigas *Cyphomyrmex wheeleri* (n= 16 ninhos), *Trachymyrmex septentrionalis* (n= 16 ninhos) e *Atta texana* (n= 4 ninhos) contendo microfungos em três meios de cultura utilizados para os isolamentos: MA2%: extrato de malte 2%; PDA: ágar batata-dextrose e SNA: ágar nutriente sintético (Barras indicam erro padrão; barras seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes, teste não paramétrico de Dunn, $p < 0,05$).

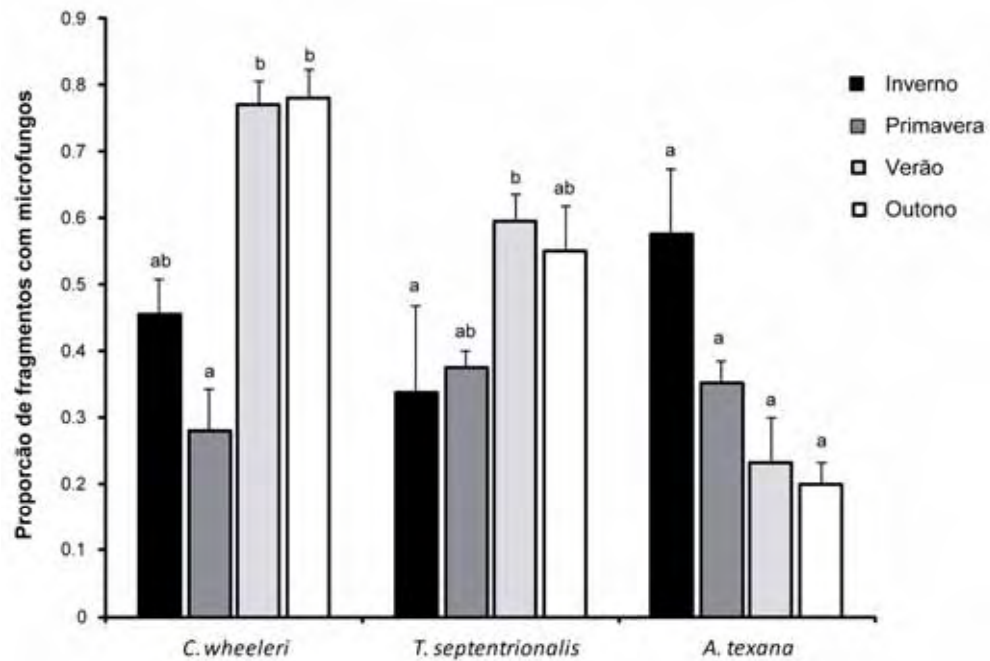


Figura 3. Proporção de fragmentos de jardins de fungos das formigas *Cyphomyrmex wheeleri* (n= 4 ninhos/estação), *Trachymyrmex septentrionalis* (n= 4 ninhos/estação) e *Atta texana* (n= 4 ninhos/estação), contendo microfungos em diferentes estações do ano. Barras indicam erro padrão; barras seguidas da mesma letra não são significativamente diferentes, segundo o teste não paramétrico de Dunn, $p < 0,05$. No caso de *A. texana*, houve diferenças significativas entre os meses do ano, porém o teste de Dunn não identificou quais proporções eram diferentes. No outono, somente foram amostrados três ninhos de *A. texana* (vide material e métodos para detalhes).

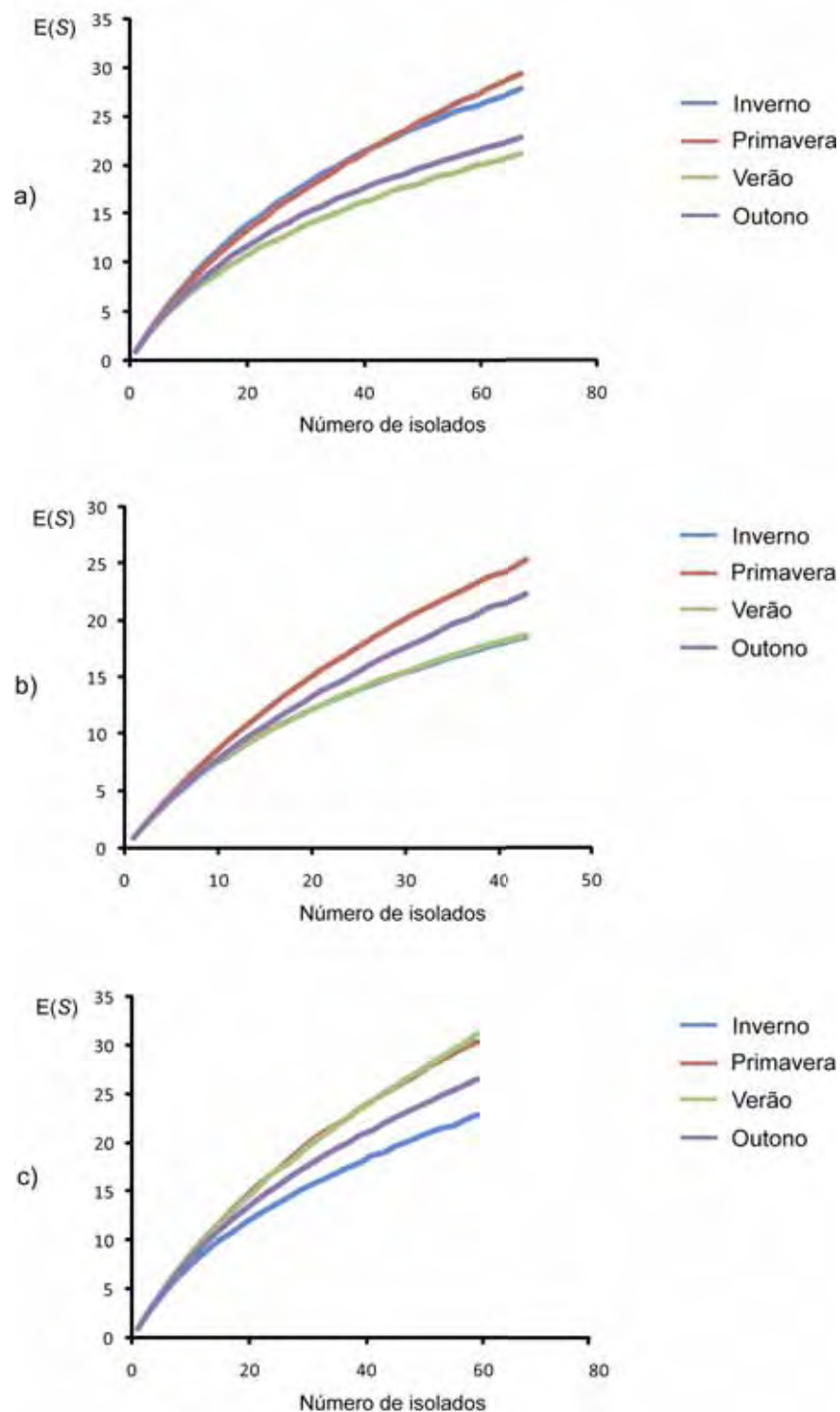


Figura 4. Diversidade de microfungos encontrados nos jardins de fungos de três espécies de formigas Attini segundo as estações do ano. a) *Cyphomyrmex wheeleri* (n= 16 ninhos), b) *Trachymyrmex septentrionalis* (n= 16 ninhos), c) *Atta texana* (n= 4 ninhos). $E(S)$: número esperado de espécies de microfungos nas sub-amostragens aleatórias. No outono, a diversidade de microfungos foi avaliada para três ninhos de *A. texana* (ver materiais e métodos para detalhes).

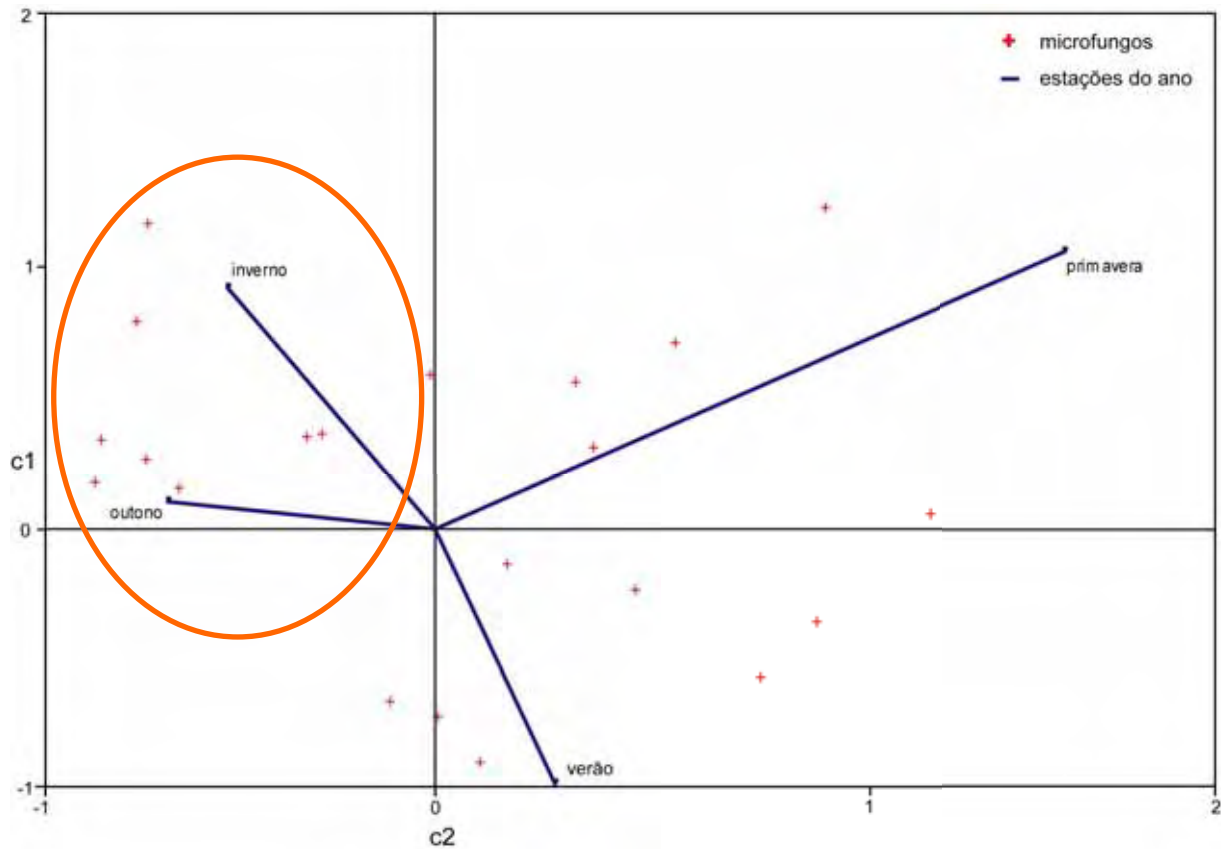


Figura 5. Análise de correspondência da comunidade de microfungos provenientes da formiga *Cyphomyrmex wheeleri* em cada estação do ano. As comunidades encontradas no inverno e na primavera (contorno laranja) parecem mais homogêneas que as demais. Os valores de *Inertia* para o eixo c1 e c2 são 0,6695 e 0,5772 e explicam cerca de 37,68 % e 32,49 % da variação encontrada, respectivamente. Um terceiro eixo c3 (não representado) explica os restantes 29,83 % da variação encontrada.

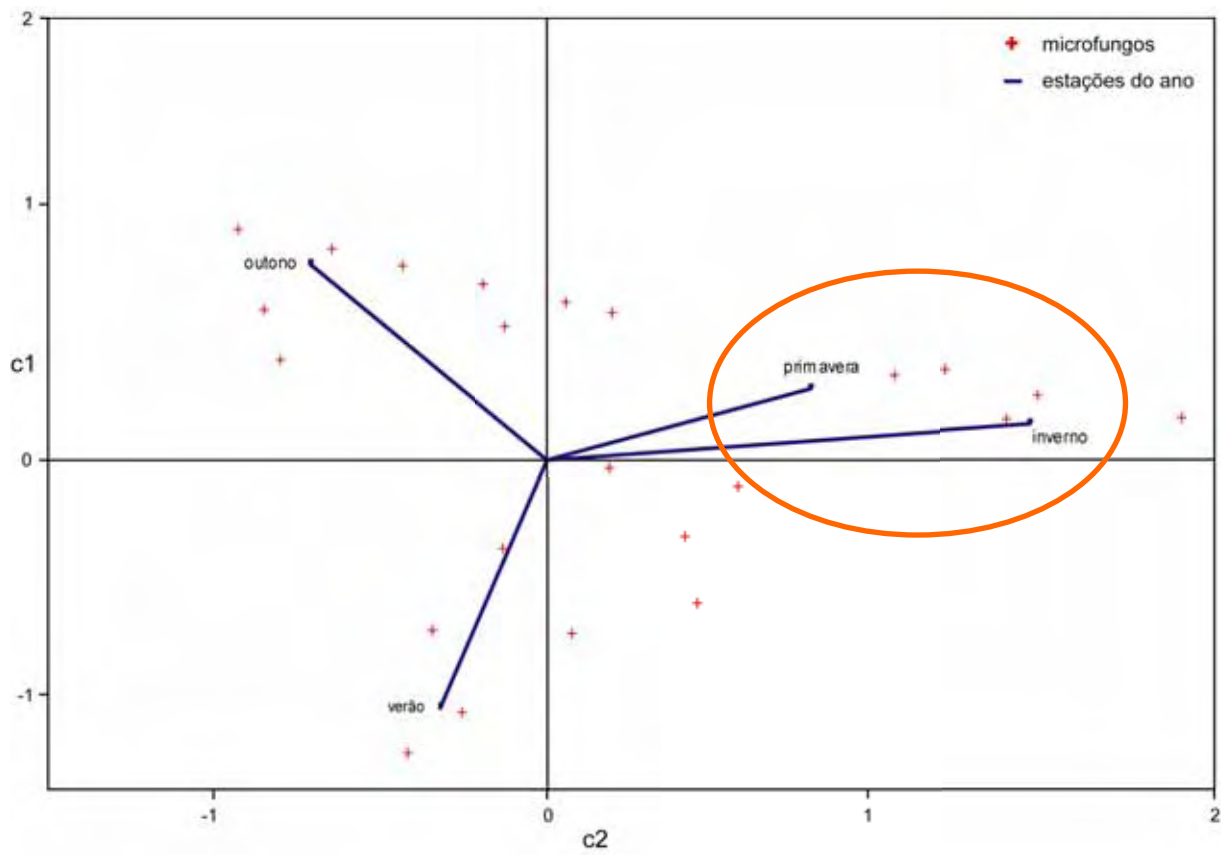


Figura 6. Análise de correspondência da comunidade de microfungos provenientes da formiga *Trachymyrmex septentrionalis* em cada estação do ano. As comunidades encontradas no inverno e na primavera (contorno laranja) parecem mais homogêneas que as demais. Os valores de *Inertia* para o eixo c1 e c2 são 0,7022 e 0,5815 e explicam cerca de 39,88 % e 32,56 % da variação encontrada, respectivamente. Um terceiro eixo c3 (não representado) explica os restantes 27,56 % da variação encontrada.

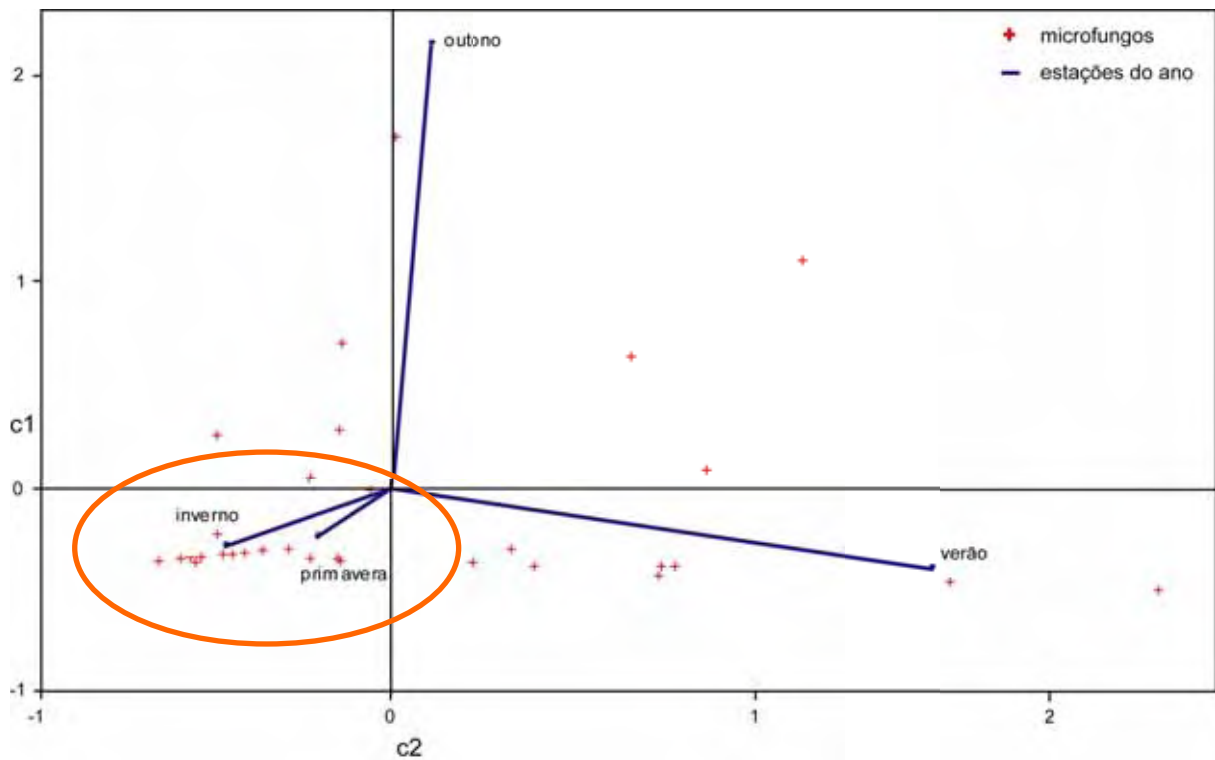


Figura 7. Análise de correspondência da comunidade de microfungos provenientes da formiga *Atta texana* em cada estação do ano. As comunidades encontradas no inverno e na primavera (contorno laranja) parecem mais homogêneas que as demais. Os valores de *Inertia* para o eixo c1 e c2 são 0,7022 e 0,5815 e explicam cerca de 39,88 % e 32,56 % da variação encontrada, respectivamente. Um terceiro eixo c3 (não representado) explica os restantes 27,56 % da variação encontrada. No outono, a diversidade de microfungos foi avaliada para três ninhos de *A. texana* (ver materiais e métodos para detalhes).

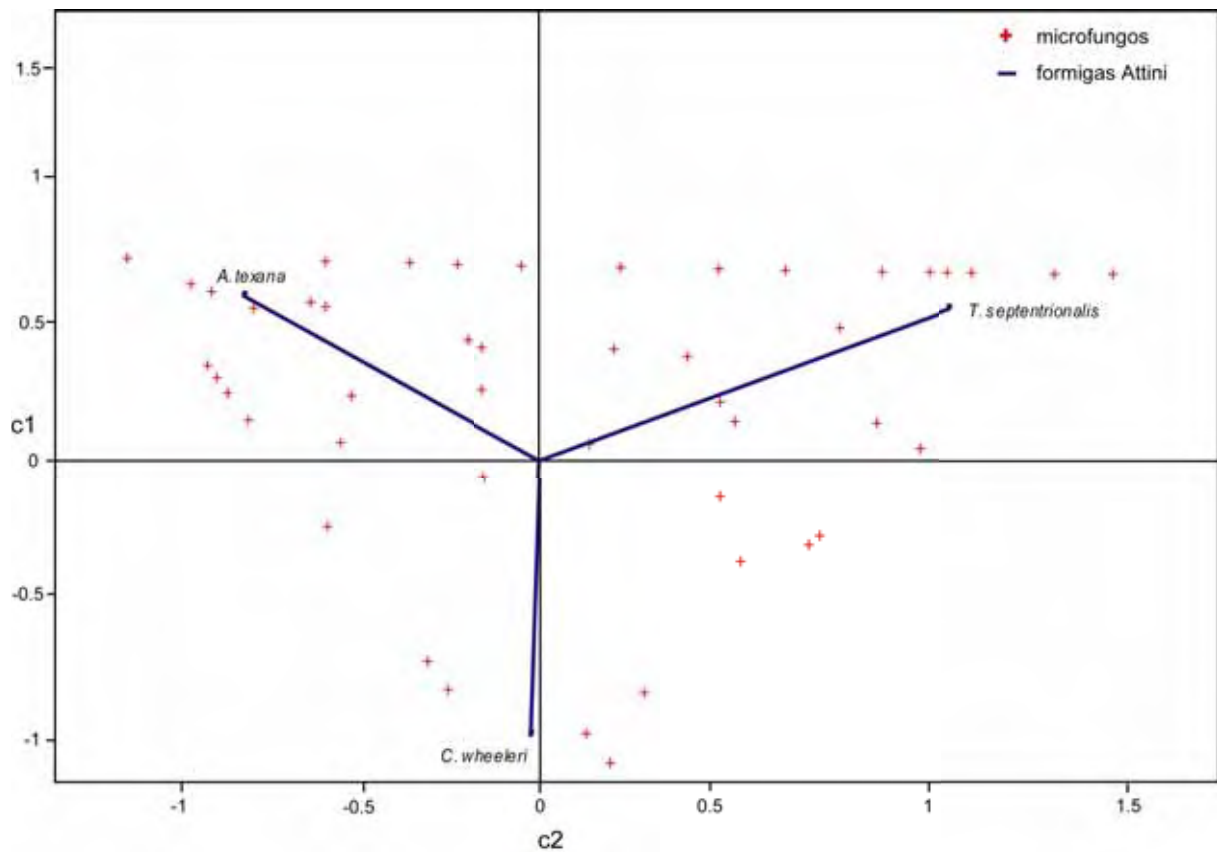


Figura 8. Perfil das comunidades de microfungos provenientes de jardins de fungos de três formigas da tribo Attini (*Cyphomyrmex wheeleri*, *Trachymyrmex septentrionalis* e *Atta texana*) recuperadas num período de um ano. Os jardins de fungos de *T. septentrionalis* e *A. texana* têm a tendência de compartilhar comunidades mais espécies de microfungos quando comparada à comunidade de *C. wheeleri*. Os valores de *Inertia* para o eixo c1 e c2 são 0,662 e 0,512 e explicam cerca de 56,40 % e 43,60 % da variação encontrada, respectivamente.

Tabela 1. Número de microfungos isolados de três espécies de formigas da tribo Attini nas várias estações do ano (2005-2006).

Espécie de formiga	Estações do ano				Total
	Inverno 2005	Primavera 2006	Verão 2006	Outono 2006	
<i>Atta texana</i> (n= 4) [†]	225	150	85	61	521
<i>Cyphomyrmex wheeleri</i> (n= 16)	102	69	191	169	531
<i>Trachymyrmex septentrionalis</i> (n= 16)	45	84	130	126	385
Total	372	303	406	356	1437

[†] número de colônias amostradas.

Tabela 2A. Microfungos isolados dos jardins de fungos de *Cyphomyrmex wheeleri* (inverno de 2005).

Espécies	Ninhos				Total	GenBank ^a
	UGM 051215-01	UGM 051215-02	UGM 051215-05	AR 051215-01		
<i>Acremonium</i> sp.			2		2	-
<i>Alysidium resinae</i>				4	4	93% DQ420762
<i>Alysidium</i> sp. 1	8				8	86% DQ420762
<i>Arthrrium</i> cf. <i>phaeospermum</i>			1	1	2	98% AM176711
<i>Aspergillus niger</i>		2			2	-
<i>Aspergillus</i> sp.	2				2	-
<i>Chaetomium</i> sp.			1		1	93% EU035795
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	2			5	7	99% AF393723
<i>Clonostachys rosea</i>				4	4	-
<i>Curvularia inequalis</i>	1			1	2	99% AF120261
<i>Fusarium solani</i>			1	1	2	99% AY310442
<i>Gelasinospora</i> sp.		1			1	97% AY681196
<i>Geniculosporium</i> sp.	1				1	-
<i>Hypocrea</i> sp.				1	1	98% DQ000622
<i>Leptosphaeria</i> sp.		1			1	97% AY336132
<i>Nigrospora oryzae</i>	1		7	3	11	96% DQ219433
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	1	1			2	-
<i>Paecilomyces marquandii</i>			1		1	-
<i>Penicillium</i> sp. 1			1		1	-
<i>Penicillium</i> sp. 2				1	1	-
<i>Penicillium</i> sp. 3		3		1	4	-
<i>Penicillium</i> sp. 4	1				1	-
<i>Phlebia subserialis</i>				1	1	99% AB084620
<i>Preussia minima</i>	1				1	97% AY510427
<i>Scolecobasidium humicola</i>				4	4	90% AM901760
<i>Scopulariopsis candida</i>		1	1		2	-
<i>Trichoderma harzianum</i>	2	1			3	ISTH
<i>Trichoderma konilangbra</i>	3				3	ISTH
<i>Trichoderma koningii</i>			1		1	ISTH
<i>Trichoderma</i> sp. 1				6	6	ISTH
<i>Virgaria nigra</i>		4			4	-
n.i. ascomycetes ^b	2			1	3	-
n.i. zygomycetes 1		2	10	1	13	92% EU644757
Número de isolados	25	16	26	35	102	
Riqueza de táxons	12	9	10	15		

^aSimilaridade (%) e número de acesso da sequência mais próxima encontrada no GenBank. -: indica que o fungo não foi seqüenciado. ISTH: resultado encontrado na base de dados do International Subcommission *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy.

^bn.i. ascomycetes: ascomiceto não identificado.

Tabela 2B. Microfungos isolados dos jardins de fungos de *Cyphomyrmex wheeleri* (primavera de 2006).

Espécies	Ninhos				Total	GenBank ^a
	UGM 060406-01	UGM 060406-02	UGM 060406-03	AR 060406-01		
<i>Alternaria alternata</i>				1	1	100% AF455539
<i>Alysidiopsis pipsisewae</i>		2			2	79% AJ971447
<i>Alysidium resinae</i>	1	4		1	6	99% DQ420762
<i>Arnium leporinum</i>		1			1	97% AY999123
<i>Aspergillus candidus</i>				2	2	96% AJ413985
<i>Aspergillus flavus</i>		1			1	100% AY939782
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1	2	2	4	9	99% AJ876482
<i>Cladosporium oxysporum</i>				1	1	-
<i>Cochliobolus lunatus</i>			1		1	97% DQ337381
<i>Colletotrichum caudatum</i>				1	1	99% AB042305
<i>Curvularia</i> sp.		1			1	97% DQ242472
<i>Eupenicillium rubidurum</i>	1			1	2	99% AF033462
<i>Fusarium proliferatum</i>				1	1	100% AF291061
<i>Mucor circinelloides</i>	1				1	96% AY243943
n.i. ascomycetes ^b	2		2	2	6	-
<i>Neocosmopora vasinfecta</i>			1		1	99% AY381142
n.i. zygomycetes 1			4		4	99% AJ849363
<i>Nigrospora oryzae</i>				1	1	96% DQ219433
<i>Paecilomyces lilacinus</i>			1		1	-
<i>Paraphaeosphaeria</i> sp.		1			1	100% AB096264
<i>Penicillium</i> sp.		1		1	2	-
<i>Penicillium verruculosum</i>		1			1	-
<i>Periconia</i> sp.			1		1	90% DQ336713
<i>Phialophora parasitica</i>		2			2	98% U31841
<i>Phoma</i> sp.				2	2	98% AF297228
<i>Podospora</i> sp.		1			1	97% AY999123
<i>Sordaria tomento-aba</i>				3	3	97% AY681195
<i>Tetraploa aristata</i>				1	1	-
<i>Trichoderma citrinoviride</i>			1		1	ISTH
<i>Verticillium</i> sp.		4	2	5	11	96% AJ557830
Número de isolados	6	21	15	27	69	
Riqueza de táxons	5	12	9	15		

^aSimilaridade (%) e número de acesso da sequência mais próxima encontrada no GenBank. -: indica que o fungo não foi seqüenciado. ISTH: resultado encontrado na base de dados do International Subcommission on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy.

^bn.i. ascomycetes: ascomiceto não identificado.

Tabela 2C. Microfungos isolados dos jardins de fungos de *Cyphomyrmex wheeleri* (verão de 2006).

Espécies	Ninhos				Total	GenBank ^a
	AR060701-01	AR060701-02	UGM060701-01	UGM060701-02		
<i>Alternaria tenuissima</i>	4	2		1	7	100% AY154712
<i>Ampelomyces</i> sp. 1	9	4	8		21	99% AY513943
<i>Aspergillus niger</i>		1			1	100% AF455522
<i>Aspergillus oryzae</i>		7			7	100% AF459735
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	4	3	1	1	9	100% AJ876482
<i>Cochliobolus lunatus</i>		1			1	99% DQ836800
<i>Cordyceps memorabilis</i>	1				1	99% AY245632
<i>Curvularia inaequalis</i>	10	6	5	3	24	97% AF313409
<i>Dendryphiella</i> sp.		1			1	94% DQ411540
<i>Discostroma</i> sp.	1				1	94% AF377285
<i>Fusarium oxysporum</i>				1	1	100% AF322076
<i>Humicola</i> sp.		4		3	7	92% AJ279444
<i>Myrothecium gramineum</i>	1	2	1	1	5	97% AY254151
<i>Myrothecium verrucaria</i>	6		1		7	99% AJ302003
n.i. ascomycetes ^b	2				2	-
n.i. ascomycetes 1			25	28	53	-
<i>Neocosmospora vasinfecta</i>				2	2	99% AY381142
<i>Neosartorya fischeri</i>			1		1	99% AF455541
n.i. zygomycetes 1			1	4	5	92% AJ878778
<i>Nigrospora oryzae</i>	3	5			8	96% DQ219433
<i>Paecilomyces lilacinus</i>				4	4	-
<i>Penicillium simplicissimum</i>	1				1	99% AF203084
<i>Penicillium verruculosum</i>		1	1		2	98% AF510496
<i>Periconia</i> sp.	2	1			3	93% AJ246158
<i>Pestalotia</i> sp.	1	1	1	3	6	99% AF409980
<i>Pestalotiopsis microspora</i>		1		1	2	99% DQ000992
<i>Pestalotiopsis</i> sp.				1	1	99% AF409980
<i>Phanerochaete sordida</i>		1			1	98% AF475148
<i>Preussia</i> sp. 1		1			1	99% AY943052
<i>Sporothrix</i> sp.				1	1	-
<i>Stagonospora</i> sp.		1			1	96% AY208791
<i>Trichoderma konilangbra</i>		1			1	ISTH
<i>Trichoderma koningiopsis</i>			2		2	ISTH
<i>Trichoderma spirale</i>				1	1	ISTH
Número de isolados	45	44	47	55	191	
Riqueza de táxons	13	19	11	15		

^aSimilaridade (%) e número de acesso da sequência mais próxima encontrada no GenBank. -: indica que o fungo não foi sequenciado. ISTH: resultado encontrado na base de dados do International Subcommission *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy.

^bn.i. ascomycetes: ascomiceto não identificado.

Tabela 2D. Microfungos isolados dos jardins de fungos de *Cyphomyrmex wheeleri* (outono de 2006).

Espécies	Ninhos				Total	GenBank ^a
	AR061001-01	AR061001-02	UGM061001-01	UGM061001-02		
<i>Ampelomyces</i> sp. 1	3	2	2	7	14	99% AY513943
<i>Aspergillus terreus</i>			1		1	99% AJ413985
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	4			2	6	99% AJ876482
<i>Cladosporium</i> sp.		1		1	2	-
<i>Coniothyrium</i> sp.				1	1	97% AY904058
<i>Curvularia inaequalis</i>		1	4	4	9	99% AF120261
<i>Drechslera australiensis</i>	1	2		1	4	100% AY923860
<i>Eupenicillium rubidurum</i>		1		1	2	99% AF033462
<i>Exophiala</i> sp.		1			1	90% AJ971454
<i>Fusarium solani</i>	1				1	100% AY310442
<i>Fusarium</i> sp.		1			1	91% DQ657854
<i>Geotrichum</i> sp.			1		1	-
<i>Mucor indicus</i>	7				7	94% AB113027
<i>Myrothecium verrucaria</i>			1	1	2	99% AJ302003
n.i. ascomycetes ^b		2	3	1	6	-
n.i. zygomycetes 1		2			2	80% AJ849363
<i>Neocosmospora vasinfecta</i>		1			1	99% AY381142
<i>Nigrospora oryzae</i>	12	12	12	9	45	96% DQ219433
<i>Oidiodendron</i> sp.		1			1	95% AF062805
<i>Paecilomyces lilacinus</i>				1	1	-
<i>Paecilomyces</i> sp.		1			1	99% DQ243696
<i>Penicillium citrinum</i>		1			1	100% AY373904
<i>Penicillium funiculosum</i>		1		3	4	-
<i>Penicillium</i> sp.	6	2			8	-
<i>Pestalotiopsis disseminata</i>	1				1	99% AB251918
<i>Phialophora parasitica</i>				2	2	98% U31843
<i>Pitomyces chartarum</i>			1		1	100% AM231398
<i>Preussia</i> sp. 2		3		3	6	97% AY943054
<i>Scytalidium</i> sp.		1			1	93% AY762623
<i>Talaromyces</i> sp.		3			3	-
<i>Trichoderma harzianum</i>		2	3	6	11	ISTH
<i>Trichoderma konilangbra</i>	1				1	ISTH
<i>Trichoderma konilangbra</i>	4	2		1	7	ISTH
<i>Trichoderma</i> sp.	5		5	1	11	ISTH
<i>Xylaria</i> sp.		3			3	90% AB255281
Número de isolados	45	46	33	45	169	
Riqueza de táxons	11	22	10	17		

^aSimilaridade (%) e número de acesso da sequência mais próxima encontrada no GenBank. -: indica que o fungo não foi seqüenciado. ISTH: resultado encontrado na base de dados do International Subcommission on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy.

^bn.i. ascomycetes: ascomiceto não identificado.

Tabela 3A. Microfungos isolados dos jardins de fungos de *Trachymyrmex septentrionalis* (inverno de 2005).

Espécies	Ninhos				Total	GenBank ^a
	UGM 060201-01	AR 060201-01	AR 060118-01	AR 060118-02		
<i>Acaromyces</i> sp.				1	1	98% AY158671
<i>Ceratocystis fimbriata</i>	4				4	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i>			2		2	99% AF455525
<i>Cochliobolus australiensis</i>		3			3	100% AY923863
<i>Cunninghamella elegans</i>				1	1	-
<i>Mortierella</i> sp. 1	2				2	100% DQ093726
n.i. ascomycetes ^b		1	3	3	7	-
<i>Paecilomyces marquandii</i>	2				2	-
<i>Penicillium daleae</i>	1				1	99% AF033442
<i>Penicillium restrictum</i>	6			2	8	100% AF033457
<i>Penicillium</i> sp. 1			2		2	-
<i>Penicillium</i> sp. 2				1	1	-
<i>Penicillium</i> sp. 3				1	1	92% AY373926
<i>Penicillium verruculosum</i>	3				3	99% AF510497
<i>Pestalotiopsis</i> sp. 1				1	1	99% EU273510
<i>Preussia pseudominima</i>	1				1	100% AY510424
<i>Trichoderma harzianum</i>				1	1	ISTH
<i>Trichoderma koningii</i>				3	3	ISTH
<i>Xylaria</i> sp.			1		1	-
Número de isolados	19	4	8	14	45	
Riqueza de táxons	7	2	3	9		

^aSimilaridade (%) e número de acesso da sequência mais próxima encontrada no GenBank. -: indica que o fungo não foi seqüenciado. ISTH: resultado encontrado na base de dados do International Subcommission on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy.

^bn.i. ascomycetes: ascomiceto não identificado.

Tabela 3B. Microfungos isolados dos jardins de fungos de *Trachymyrmex septentrionalis* (primavera de 2006).

Espécies	Ninhos				Total	GenBank ^a
	UGM 060420-01	UGM 060420-02	AR 060420-01	AR 060420-02		
<i>Acremonium</i> sp.				2	2	-
<i>Aspergillus japonicus</i>		1			1	-
<i>Chaunopycnis alba</i>		3	1		4	100% AF389191
<i>Cladosporium cladosporioides</i>				1	1	99% AF455535
<i>Cochliobolus lunatus</i>	1				1	96% DQ337381
<i>Curvularia geniculata</i>				1	1	-
<i>Epicoccum nigrum</i>		3			3	98% AJ279448
<i>Eupenicillium javanicum</i>				1	1	-
<i>Gliocladium virens</i>			1		1	ISTH
<i>Leptosphaerulina chartarum</i>		1			1	93% DQ384571
<i>Mortierella</i> sp. 1	5			1	6	100% DQ093726
<i>Mortierella</i> sp. 2	1				1	98% AJ890432
ni. ascomycetes ^b		3	3	2	8	-
<i>Nigrospora oryzae</i>			1	2	3	96% DQ219433
<i>Oidiodendron maius</i>	1	1			2	99% AF062798
<i>Paecilomyces farinosus</i>		1			1	95% AB233337
<i>Paraconiothyrium</i> sp.			1		1	99% AY642531
<i>Penicillium brasilianum</i>	1				1	97% AF178523
<i>Penicillium decaturense</i>	1		2	1	4	99% AF125946
<i>Penicillium dravuni</i>		1	5		6	95% AY494856
<i>Penicillium glabrum</i>				1	1	100% AY373915
<i>Penicillium restrictum</i>	3			4	7	100% AY373928
<i>Penicillium sclerotiorum</i>			2		2	98% AY373931
<i>Penicillium simplicissimum</i>			2		2	99% AF033440
<i>Penicillium</i> sp.	2				2	-
<i>Penicillium verruculosum</i>				2	2	100% AF510496
<i>Pestalotiopsis</i> sp. 1				1	1	99% EU273510
<i>Pestalotiopsis</i> sp. 2				1	1	100% AF377296
<i>Phialophora</i> sp.	2				2	98% AY857542
<i>Phoma</i> sp.		1			1	97% DQ301511
<i>Scolecobasidium humicola</i>		1	1	2	4	-
<i>Scytalidium</i> sp.			2		2	-
<i>Sporotrichum</i> sp.	3				3	-
<i>Trichoderma harzianum</i>		1	1		2	ISTH
<i>Trichoderma</i> sp.		1		1	2	ISTH
<i>Virgaria nigra</i>				1	1	-
Número de isolados	20	18	22	24	84	
Riqueza de táxons	10	12	12	16		

^aSimilaridade (%) e número de acesso da sequência mais próxima encontrada no GenBank. -: indica que o fungo não foi sequenciado. ISTH: resultado encontrado na base de dados do International Subcommission on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy.

^bn.i. ascomycetes: ascomiceto não identificado.

Tabela 3C. Microfungos isolados dos jardins de fungos de *Trachymyrmex septentrionalis* (verão de 2006).

Espécies	Ninhos				Total	GenBank ^a
	AR060706-01	AR060706-02	AR060706-03	UGM060706-01		
<i>Agaricus</i> sp.				2	2	92% AY484681
<i>Alternaria alternata</i>				1	1	-
<i>Alysidium</i> sp.			5		5	-
<i>Chaetomium globosum</i>	1				1	-
<i>Cladophialophora</i> sp.		1			1	89% AB109182
<i>Cladosporium cladosporioides</i>			1	3	4	99% AJ876482
<i>Cladosporium oxysporum</i>			1		1	-
<i>Drechslera</i> cf. <i>halodes</i>			1		1	-
<i>Gloeotinia</i> sp. anamorph	4	12		7	23	100% DQ235697
<i>Gymnopus dichrous</i>				3	3	93% AF505766
<i>Mortierella</i> sp. 1	2			2	4	99% DQ093726
n.i. ascomycetes ^b	1		3		4	-
<i>Penicillium purpurogenum</i>			1		1	94% AY373926
<i>Penicillium restrictum</i>		1			1	99% AF033457
<i>Penicillium</i> sp.	9	2		3	14	-
<i>Penicillium verruculosum</i>		13			13	-
<i>Peniophora albobadia</i>			1		1	98% AF119522
<i>Pestalotiopsis microspora</i>				1	1	-
<i>Scolecobasidium humicola</i>	1		1	1	3	-
<i>Trichoderma hamatum</i>	10	1			11	ISTH
<i>Trichoderma harzianum</i>	2	2	2	1	7	ISTH
<i>Trichoderma sinuosum</i>	2				2	ISTH
<i>Trichoderma spirale</i>			1	1	2	ISTH
<i>Umbelopsis isabellina</i>	3				3	-
<i>Umbelopsis vinacea</i>		1	3		4	-
<i>Verticillium fungicola</i>	2			3	5	99% AB107135
<i>Verticillium lecanii</i>				1	1	-
<i>Verticillium</i> sp.				2	2	91% AB237154
<i>Virgaria nigra</i>		1	7		8	-
<i>Xylaria</i> sp.			1		1	100% AY315396
Número de isolados	37	34	28	31	130	
Riqueza de táxons	11	9	13	14		

^aSimilaridade (%) e número de acesso da sequência mais próxima encontrada no GenBank. -: indica que o fungo não foi sequenciado. ISTH: resultado encontrado na base de dados do International Subcommission on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy.

^bn.i. ascomycetes: ascomiceto não identificado.

Tabela 3D. Microfungos isolados dos jardins de fungos de *Trachymyrmex septentrionalis* (outono de 2006).

Espécies	Ninhos				Total	GenBank ^a
	AR061015-01	AR061015-02	UGM061015-02	UGM061015-03		
<i>Acremonium blochii</i>				1	1	-
<i>Acrophialophora fusispora</i>			1		1	-
<i>Aspergillus cervinus</i>				1	1	100% AY373845
<i>Aspergillus japonicus</i>		1			1	-
<i>Capnobotryella</i> sp.		1			1	95% AJ971406
<i>Chaetomium</i> sp.			1		1	95% AJ279466
<i>Chaunopycnis alba</i>	2			1	3	100% AF389191
<i>Cladophialophora</i> sp.	2			1	3	89% AB109182
<i>Cladosporium</i> sp.		1	3		4	-
<i>Cladosporium subtilissimum</i>		1		1	2	98% AF050286
<i>Cochliobolus australiensis</i>			1		1	100% AY923860
<i>Cochliobolus dactyloctenii</i>			1		1	99% AF158106
<i>Cytospora</i> sp.	1				1	96% DQ092502
<i>Discula quercina</i>	1				1	99% AY853201
<i>Didymella</i> sp.		1	1		2	-
<i>Exophiala</i> sp.		1			1	-
<i>Fusarium equiseti</i>	2				2	99% AY147366
<i>Mortierella</i> sp. 1	1				1	100% DQ093726
<i>Mucor</i> sp.	1				1	-
n.i. ascomycetes ^b	8	12	3	5	28	-
n.i. ascomycetes 1	1	1	2	1	5	-
<i>Nectria mariannaeae</i>		1			1	99% AB111492
<i>Nigrospora oryzae</i>	2	1	1	1	5	96% DQ219433
<i>Paecilomyces lilacinus</i>		4	1		5	-
<i>Penicillium citrinum</i>	2				2	-
<i>Penicillium decumbens</i>	1	2	3	3	9	-
<i>Penicillium glabrum</i>	2			4	6	100% AY373915
<i>Penicillium janczewskii</i>			2		2	-
<i>Penicillium janthinellum</i>		1			1	-
<i>Penicillium sclerotiorum</i>		1	1		2	-
<i>Penicillium</i> sp.	1			2	3	-
<i>Penicillium verruculosum</i>				1	1	-
<i>Pestalotiopsis disseminata</i>		1			1	99% AB251918
<i>Phoma</i> sp.				1	1	-
<i>Trichoderma citrinoviride</i>	1				1	ISTH
<i>Trichoderma harzianum</i>	2		1		3	ISTH
<i>Trichoderma</i> sp.	1	1	4		6	ISTH
<i>Trichoderma velutinum</i>	1				1	ISTH
<i>Trichoderma virens</i>				1	1	ISTH
<i>Umbelopsis ramanniana</i>			1		1	95% AB193533
<i>Verticillium</i> sp.	11				11	-
<i>Xylaria</i> sp.			1		1	97% AY315396
Número de isolados	43	31	28	24	126	
Riqueza de táxons	19	16	17	14		

^aSimilaridade (%) e número de acesso da sequência mais próxima encontrada no GenBank. -: indica que o fungo não foi sequenciado. ISTH: resultado encontrado na base de dados do International Subcommission on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy.

^bn.i. ascomycetes: ascomiceto não identificado.

Tabela 4A. Microfungos isolados dos jardins de fungos de *Atta texana* (inverno de 2005).

Espécies	Ninhos				Total	GenBank ^a
	UGM 051218-02	UGM 060121-01	UGM 060121-02	AR 060123-01		
<i>Acremonium</i> sp.		15			15	-
<i>Acrophialophora fusispora</i>		1		1	2	-
<i>Alternaria alternata</i>	2	2			4	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>		2			2	-
<i>Aspergillus niger</i>				1	1	-
<i>Aspergillus ochraceus</i>			4	22	26	90% AJ279444
<i>Aspergillus</i> sp.			5		5	-
<i>Aspergillus ustus</i>		27			27	99% AY373878
<i>Botryosphaeria</i> sp. 1			1		1	97% AY640255
<i>Botryosphaeria dothidea</i>				1	1	99% AY786322
<i>Cercospora</i> sp.		1			1	99% AF297230
<i>Chaetomium artrobruneum</i>			5		5	-
<i>Chaetomium nigricolor</i>			1		1	94% AJ458185
<i>Chaetomium</i> sp. 1		2			2	97% AY681204
<i>Chaetomium</i> sp.		1			1	99% AJ620951
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	9	22	3	4	38	100% AF393691
<i>Clonostachys rosea</i>				7	7	100% AF358249
<i>Clonostachys</i> sp.		1			1	97% AF210668
<i>Didymella</i> sp.		2			2	98% AF297228
<i>Fusarium equiseti</i>			1		1	99% AY147362
<i>Fusarium incarnatum</i>		2	2		4	100% AY633745
<i>Fusarium</i> sp.				1	1	-
<i>Geniculosporium</i> sp.			1		1	-
<i>Hypoxylon stygium</i>			1		1	98% AJ390409
<i>Leptosphaerulina chartarum</i>			2		2	100% AM231398
<i>Mortierella</i> sp.				1	1	-
n.i. ascomycetes ^b	5	3	8	2	18	-
<i>Nigrospora oryzae</i>			1		1	-
<i>Paecilomyces lilacinus</i>		4	2	1	7	100% AY213665
<i>Paecilomyces marquandii</i>			5		5	-
<i>Paecilomyces</i> sp.		2		1	3	99% DQ243696
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>		1		1	2	100% AJ005488
<i>Penicillium citrinum</i>			1		1	-
<i>Penicillium janczewskii</i>		4			4	-
<i>Penicillium janthinellum</i>		1			1	-
<i>Penicillium</i> sp.	10		3	2	15	-
<i>Penicillium verruculosum</i>	1	1			2	98% AF510496
<i>Pestalotiopsis microspora</i>			1		1	99% AF377292
<i>Phoma glomerata</i>			3		3	99% AY183371
<i>Sporothrix inflata</i>	1				1	95% AY495433
<i>Trichoderma konilangbra</i>		4			4	ISTH
<i>Trichoderma</i> sp.	1				1	ISTH
<i>Verticillium</i> sp.		1			1	-
<i>Virgaria nigra</i>			1		1	-
<i>Xylaria</i> sp.			1		1	90% AF163038
Número de isolados	29	99	52	45	225	
Riqueza de táxons	7	21	21	13		

^aSimilaridade (%) e número de acesso da sequência mais próxima encontrada no GenBank. -: indica que o fungo não foi seqüenciado. ISTH: resultado encontrado na base de dados do International Subcommission on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy.

^bn.i. ascomycetes: ascomiceto não identificado.

Tabela 4B. Microfungos isolados dos jardins de fungos de *Atta texana* (primavera de 2006). 81

Espécies	Ninhos				Total	GenBank ^a
	UGM 051218-02	UGM 060121-01	UGM 060121-02	AR 060123-01		
<i>Acremonium</i> sp.	1	3	3	3	10	99% AY245632
<i>Agaricus</i> sp.	1				1	90% AY484681
<i>Alternaria alternata</i>	1	2	7	1	11	100% AF455539
<i>Aspergillus alliaceus</i>			3		3	-
<i>Aspergillus japonicus</i>	1				1	99% AJ279994
<i>Aspergillus parasiticus</i>				2	2	-
<i>Aspergillus</i> sp.				1	1	-
<i>Aspergillus terreus</i>		1			1	-
<i>Aspergillus ustus</i>			1		1	-
<i>Cephalotrichum microsporum</i>				1	1	94% AJ608983
cf. <i>Scytalidium</i> sp.	2				2	
<i>Chaetomium</i> sp. 1				1	1	97% AY681204
<i>Chaetomium</i> sp.			1		1	96% AJ279468
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	4	2	2	4	12	100% AJ876482
<i>Clonostachys rosea</i>				7	7	99% AF106532
<i>Corynascus</i> sp.				1	1	95% AJ715483
<i>Cunninghamella echinulata</i>		1	1		2	-
<i>Cunninghamella intermedia</i>		1			1	-
<i>Cunninghamella multiverticillata</i>		1			1	-
<i>Dasysticta sapindophila</i>		1		1	2	-
<i>Epicoccum nigrum</i>	2				2	98% AJ279448
<i>Eupenicillium javanicum</i>	2				2	-
<i>Exophiala</i> sp. 1		1		1	2	96% AJ875365
<i>Exophiala</i> sp. 2		2	1		3	-
<i>Fusarium equiseti</i>		1	3		4	100% AY147366
<i>Fusarium oxysporum</i>				1	1	95% AF322076
<i>Fusarium solani</i>		2		2	4	99% AY310442
<i>Mortierella</i> sp. 1			1		1	97% AY997063
<i>Mortierella alpina</i>		1			1	99% AJ271630
ni. ascomycetes ^b	5	2		9	16	-
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	3		5		8	99% AY624190
<i>Paecilomyces marquandii</i>	3		1		4	-
<i>Paecilomyces</i> sp.	1				1	-
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>				4	4	100% AJ005488
<i>Penicillium canescens</i>		1			1	100% AY373901
<i>Penicillium chrysogenum</i>		1			1	100% AY373902
<i>Penicillium pinophilum</i>			3		3	100% AF176660
<i>Penicillium restrictum</i>	1				1	100% AF033457
<i>Penicillium</i> sp.	3		5		8	-
<i>Phoma glomerata</i>		1	2	1	4	99% AY183371
<i>Rhizopus stolonifer</i>			1		1	-
<i>Scolecobasidium humicola</i>	1		1		2	-
<i>Scopulariopsis chartarum</i>				1	1	-
<i>Sporothrix inflata</i>	1				1	-
<i>Thielavia</i> sp.				1	1	-
<i>Torula herbarum</i>				1	1	-
<i>Trichoderma atroviride</i>				1	1	ISTH
<i>Trichoderma koningii</i>	1		1		2	ISTH
<i>Trichoderma spirale</i>	5				5	ISTH
<i>Verticillium</i> sp.		2			2	98% AJ557830
Número de isolados	38	26	42	44	150	
Riqueza de táxons	18	18	18	20		

^aSimilaridade (%) e número de acesso da sequência mais próxima encontrada no GenBank. -: indica que o fungo não foi seqüenciado. ISTH: resultado encontrado na base de dados do International Subcommission on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy.

^bn.i. ascomycetes: ascomiceto não identificado.

Tabela 4C. Microfungos isolados dos jardins de fungos de *Atta texana* (verão de 2006).

Espécies	Ninhos				Total	GenBank ^a
	UGM 051218-02	UGM 060121-01	UGM 060121-02	AR 060123-01		
<i>Acremonium</i> sp.	4				4	96% AJ786595
<i>Alternaria alternata</i>			1		1	-
<i>Arthrographis kalrae</i>				1	1	99% AB213456
<i>Aspergillus ochraceus</i>		1			1	-
<i>Aspergillus ustus</i>		1	3		4	-
<i>Beauveria bassiana</i>				1	1	100% AJ560686
<i>Beauveria felina</i>		1			1	94% AY261369
<i>Chaetomium</i> sp.	3		1	3	7	-
<i>Cladosporium cladosporioides</i>		1			1	-
<i>Curvularia pallescens</i>			1		1	-
<i>Doratomyces microsporus</i>				1	1	94% AJ608983
<i>Fusarium oxysporum</i>		1			1	100% AF322076
<i>Fusarium polyphialidicum</i>		1			1	100% X94172
<i>Fusarium solani</i>		3			3	-
<i>Geniculosporium serpens</i>				1	1	99% AJ390436
<i>Lasiodiplodia crassispora</i>				1	1	99% EU918710
<i>Microsphaeropsis conielloides</i>	1				1	-
<i>Mortierella alpina</i>		1			1	99% AY310443
<i>Mortierella</i> sp. 1			1		1	92% AJ878509
n.i. ascomycetes ^b	1	1	1	3	6	-
<i>Nigrospora sphaerica</i>			2		2	-
<i>Paecilomyces lilacinus</i>				2	2	-
<i>Paecilomyces marquandii</i>		1			1	-
<i>Papulaspora equi</i>			1		1	-
<i>Penicillium simplicissimum</i>	1				1	99% AF203084
<i>Penicillium</i> sp.	11				11	-
<i>Penicillium verruculosum</i>	3				3	98% AF510496
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	1				1	98% DQ000992
<i>Phanerochaete</i> sp.	1				1	93% AY219373
<i>Phialophora parasitica</i>	1				1	-
<i>Phialophora</i> sp.		4	1	3	8	96% AY857542
<i>Phoma</i> like-anamorph			1		1	87% AY510425
<i>Phoma</i> sp.			1		1	-
<i>Preussia minima</i> anamorph				1	1	97% AY510427
<i>Rhizoctonia</i> sp.		1			1	93% AF407008
<i>Sporormiella</i> sp.		1			1	93% AY510416
<i>Thermoascus</i> sp.	1				1	-
<i>Torula caligans</i>	3				3	98% AY618230
<i>Trichoderma spirale</i>	4				4	ISTH
<i>Verticillium</i> sp.	1				1	-
Número de isolados	36	18	14	17	85	
Riqueza de táxons	14	13	11	10		

^aSimilaridade (%) e número de acesso da sequência mais próxima encontrada no GenBank. -: indica que o fungo não foi seqüenciado. ISTH: resultado encontrado na base de dados do International Subcommission on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy.

^bn.i. ascomycetes: ascomiceto não identificado.

Tabela 4D. Microfungos isolados dos jardins de fungos de *Atta texana* (outono de 2006).

Espécies	Ninhos ^a			Total	GenBank ^b
	UGM 051218-02	UGM 060121-01	UGM 060121-02		
<i>Acremonium cf. sclerotigerum</i>			1	1	94% AY035665
<i>Alternaria alternata</i>		3	1	4	100% DQ499661
<i>Alysidium</i> sp.		1		1	-
<i>Ascochyta</i> -like			1	1	-
<i>Aspergillus japonicus</i>	2			2	-
<i>Aspergillus parasiticus</i>			1	1	-
<i>Aspergillus ustus</i>		5		5	99% DQ649067
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1		1	2	99% AJ876482
<i>Cladosporium</i> sp.	6		2	8	-
<i>Cochliobolus australiensis</i>			6	6	99% AY923860
<i>Cochliobolus lunatus</i>			5	5	100% DQ092518
<i>Curvularia geniculata</i>	1		1	2	99% AJ853741
<i>Fusarium oxysporum</i>	1			1	-
<i>Microascus</i> sp.		3	1	4	-
n.i. ascomycetes ^c	1	2	2	5	-
<i>Nigrospora</i> sp.	1			1	95% DQ219433
<i>Penicillium dravuni</i>	1			1	97% AY49485
<i>Penicillium janczewskii</i>		1		1	100% AY773331
<i>Penicillium</i> sp.			1	1	-
<i>Penicillium verruculosum</i>	1			1	99% AF510496
<i>Penicillium waksmanii</i>	1			1	99% AY313619
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	1			1	-
<i>Phoma</i> sp.	1			1	-
<i>Pitomyces chartarum</i>	1			1	99% AM231398
<i>Pleurophomopsis</i> -like	1			1	-
<i>Preussia</i> sp.	1		1	2	97% AY943054
<i>Scopulariopsis humicola</i>	1			1	-
Número de isolados	22	15	24	61	
Riqueza de táxons	16	6	13		

^aNo mês de outono não foi encontrado o jardim de fungos do ninho AR060123-01 (ver materiais e métodos para detalhes).

^bSimilaridade (%) e número de acesso da sequência mais próxima encontrada no GenBank. -: indica que o fungo não foi seqüenciado. ISTH: resultado encontrado na base de dados do International Subcommittee on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy.

^cn.i. ascomycetes: ascomiceto não identificado.

5.
CAPÍTULO 3

**ANTAGONISTIC INTERACTIONS BETWEEN GARDEN
YEASTS AND MICROFUNGAL GARDEN PATHOGENS OF
LEAF-CUTTING ANTS**

Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungal garden pathogens of leaf-cutting ants

Andre Rodrigues^{1,2,3}, Rachel N. Cable¹, Ulrich G. Mueller¹, Maurício Bacci Jr^{2,3}, Fernando C. Pagnocca^{2,3}*

¹ Section of Integrative Biology, University of Texas at Austin, Austin, TX 78712, USA

² Center for the Study of Social Insects, UNESP – São Paulo State University, Rio Claro, SP 13506-900, Brazil

³ Department of Biochemistry and Microbiology, UNESP – São Paulo State University, Rio Claro, SP 13506-900, Brazil

Key-words: *Atta*, symbiosis, fungus garden, yeast antagonism

Running title: *Antagonistic interactions in ant-fungal symbiosis*

* Correspondence to:

Fernando Carlos Pagnocca

Centro de Estudos de Insetos Sociais, Universidade Estadual Paulista

Av. 24A, n. 1515 – Bela Vista, Zip code: 13506-900 – Rio Claro – Brazil.

Tel.: +55 19 3526-4160; fax: +55 19 3534-8523; e-mail: pagnocca@rc.unesp.br

5.1 Abstract

We investigate the diversity of yeasts isolated in gardens of the leaf-cutter ant *Atta texana*. Repeated sampling of gardens from four nests over a one-year time period showed that gardens contain a diverse assemblage of yeasts. The yeast community consisted mostly of strains associated with plants or in soil, but community composition changed between sampling periods. In order to understand the potential disease-suppressing roles of the garden yeasts, we screened isolates for antagonistic effects against known microfungal garden contaminants. *In vitro* assays revealed that yeasts inhibited the mycelial growth of *Syncephalastrum racemosum* (a fungus often growing in gardens of leaf-cutter lab nests), two strains of *Escovopsis* sp. (a specialized attine garden parasite), and the insect pathogen *Beauveria bassiana*. These garden yeasts add to the growing list of disease-suppressing microbes in attine nests that may contribute synergistically, together with actinomycete and *Burkholderia* bacteria, to protect gardens and ants against diseases. In general, garden immunity against problem fungi may therefore derive not from a single disease-suppressing microbe (e.g., *Pseudonocardia* actinomycetes) found in the ant's cuticle, but from an enrichment of multiple disease-suppressing microorganisms in the garden matrix.

5.2 Introduction

Yeasts play an important role in the stability of many ecosystems, due to their wide distribution and abundance in nature (LATHAM, 1998; INÁCIO et al., 2002; GADANHO et al., 2006). For this reason, yeasts are likely to interact with diverse microbes and eukaryotic organisms. For example, yeast-invertebrate associations are thought to be common in nature; such as the associations between insects and gut-inhabiting yeasts (NGUYEN et al., 2006; SUH et al., 2008). In addition, insects may harbor yeasts in other parts of their bodies, including their exoskeleton and legs (GANTER et al., 2006).

Several types of yeast-insect interactions have been described to date (VEGA; DOWD, 2005). Some may involve the passive dispersal of yeasts by vectoring flies in tropical forests (MORAIS et al., 1992). Other yeasts are clearly mutualistic associates that are intentionally dispersed by their insect host, such as the cultivated yeast fungi of a specialized group of fungus-growing ants (MUELLER et al., 1998), and certain yeast species dispersed by insects on ephemeral flowers (LACHANCE et al., 2001). In the present study we investigate whether yeasts act as symbionts in the leaf-cutting ant-microbe association.

Leaf-cutting ants (Hymenoptera, Formicidae, tribe Attini) have an ancient and obligate mutualism (MUELLER; RABELING, 2008; SCHULTZ; BRADY, 2008) with basidiomycetous fungi which are cultivated as food (SILVA et al., 2003). Leaf-cutting ants forage for fresh leaves and flowers as substrate for fungal growth, transport the vegetable material to underground garden chambers, then process the material for incorporation in their gardens. Leaf processing is thought to help the cultivated fungus to digest the substrate, but also removes or reduces alien contaminants that could harm the fungus (BASS; CHERRETT, 1994; CURRIE; STUART, 2001). Over the past decade, filamentous bacteria of the genus *Pseudonocardia* were discovered to be associated with attine ants (CURRIE et al., 1999b; CAFARO; CURRIE, 2005). These bacteria produce antibiotics to suppress the growth of the specialized fungal parasite *Escovopsis* sp. (*Ascomycota*: anamorphic *Hypocreales*) that normally infects gardens of several attine ant species (CURRIE et al., 1999a). Multiple lines of evidence indicates that *Escovopsis* coevolved in the attine ant-microbe symbiosis (CURRIE et al., 2003c), but there are currently few evidences for long term co-evolution between *Pseudonocardia* symbionts and their ant hosts (MUELLER et al., 2008).

The first systematic study on attine garden yeasts was carried out by Carreiro et al. (1997) who investigated yeasts in laboratory nests of *Atta sexdens rubropilosa*. Carreiro et al. (1997) found seven yeast genera in leafcutter gardens as well as in the waste material

produced by the ant colony, including the widely distributed genus *Candida*. Later studies described two new yeast species from ant gardens, *Cryptococcus haglerorum* (MIDDELHOVEN et al., 2003) and *Sympodiomyces attinorum* (CARREIRO et al., 2004), both isolated from *A. sexdens rubropilosa* nests. Yeasts were also found in infrabuccal pellets carried by gynes of the leaf-cutting ants *A. texana* (CABLE et al. in preparation) and *A. laevigata* (PAGNOCCA et al., 2008) as well as on the exoskeleton of dispersing females of *A. laevigata* and *A. capiguara* (PAGNOCCA et al., 2008). Moreover, black yeasts (closely related to *Phialophora* sp.) found in the exoskeleton of several attine species was shown to have negative indirect effects on *Pseudonocardia* (LITTLE; CURRIE, 2007; 2008).

Several roles have been hypothesized for yeasts in gardens of leaf-cutting ants. First, a number of yeasts produce hydrolytic enzymes that help digest the major plant polysaccharides present in the fungus gardens and thus aid the cultivated fungus to access more nutrients from the plant substrate (CARREIRO et al., 2000). Second, yeast found in attine gardens secretes low-weight proteins (i.e. killer toxins or mycocins) that inhibit the growth of yeast sensitive strains (CARREIRO et al., 2002). It is hypothesized that toxin-secreting yeasts maintain the stability of some microbial communities (STARMER et al., 1987), mediated through interference competition against other yeasts and also plant pathogenic fungi (GANTER; STARMER, 1992; WALKER et al., 1995). Carreiro and co-workers (2002) suggested this trait as a possible mechanism to control yeast population and other antagonistic microbes in attine gardens.

Fungus gardens of attine ants are continuously threatened by two different types of microbes: (i) unspecialized antagonist fungi such as *Cunninghamella* spp., *Fusarium oxyspermum*, *Syncephalastrum racemosum* and *Trichoderma harzianum* that are brought by the ants with the plant material they collect or acquired from the soil (RODRIGUES et al., 2008a), and (ii) specialized garden pathogens, such as *Escovopsis* spp., which are horizontally transmitted among nests (CURRIE et al., 1999a). Attine ants remove or suppress the growth of such invading microbes by weeding and grooming nest parts (CURRIE; STUART, 2001), secretion of antimicrobial compounds (BOT et al., 2002; RODRIGUES et al., 2008b) or by application of chemicals derived from disease-suppressing bacteria also inhabiting the garden matrix (SANTOS et al., 2004; MUELLER et al., 2005). In the present study, we profiled the yeast diversity in gardens of the leafcutter ant *Atta texana* and tested whether yeasts have a disease-suppressing role against microfungus garden pathogens.

5.3 Material and Methods

Fungus garden collection

To profile the yeasts associated with leaf-cutting ants and to investigate the possible effects of sampling regime on the yeast garden community, we studied four mature field nests of *Atta texana* at two localities. One nest (colony UGM051218-02) was sampled near Buescher State Park, Bastrop County, Texas (GPS locality: 30°5.808' N, 97°13.462' W) and the other three nests (colonies UGM060121-01, UGM060121-02 and AR060123-01) were sampled at Hornsby Bend Environmental Research Center, Austin, Texas (GPS localities: N30°13.973', W97°39.101'; N30°13.94', W97°39.18'; N30°14.008', W97°39.039'). Each nest was sampled at four different seasons during the one year study.

Nests were excavated by opening a 1-2 meters deep trench (depending on the season) close to the colony mound area, where most ant activity was concentrated. Once the trench was dug, excavation was continued in direction of the nest entrance until a fungus chamber was exposed. This lateral excavation ensured that gardens were opened with minimal contamination. Fungus gardens (mostly the brown-colored parts indicating old fungus-gardens) together with ants tending it were aseptically collected and stored in sterile containers for transport to the laboratory. Garden texture remained intact during the transport and samples were processed for yeast isolation within no more than 8 hours after collection. In spring and fall, collected fungus gardens were composed of dark-green-colored parts, indicating recent addition of plant substrate by the ants; however, in winter and summer, ants decrease their foraging activities, and we did not find gardens with recent plant addition. Excavation trenches were closed after each collection in order to prevent colony migration to an undisturbed nest site.

Three nests could be sampled four times in the above manner, but after three excavations in winter, spring, and summer 2006, no live garden could be found in one nest (AR060123-01) at this nest's original site; this nest either had deteriorated because of the repeat disturbances, or moved to a new location. Because no fresh garden could be collected in fall 2006 for this nest, we instead use dried fungus gardens found in chambers underneath the original mound (here after named "collapsed garden") that we collected and processed as described for the samples from healthy garden.

Yeast isolation and enumeration

A ten-fold dilution series were carried out in 0.05% Tween 80 and 0.2% peptone water using one gram of each sample, which were first disrupted using a sterile glass rod and vortexed for one minute. Aliquots of 150 μL from a dilution were then surface spread on each of four plates with yeast-malt agar medium (YMA: yeast extract 3.0 g.L^{-1} , malt extract 3.0 g.L^{-1} , peptone 5.0 g.L^{-1} , dextrose 10 g.L^{-1} and agar 15 g.L^{-1}) supplemented with 150 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ of chloramphenicol (US Biological Inc.) and 30 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ of rose bengal (Fisher Scientific Inc.). After an incubation time of 5 days at 25° C, plates were screened for yeasts under a stereomicroscope and the number of yeast-colony-forming units (CFU) per g of fungus gardens was determined. Yeast representatives from each morphological type were selected. Pure strains were suspended in 30% glycerol and stored at -80° C for identification.

Yeast identification and sequencing

Yeasts strains were identified using sequencing information from the variable D1/D2 regions of the nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA (LSU rDNA) (KURTZMAN; ROBNETT, 1998).

DNA extractions followed the protocol of Mikheyev et al. (2006) and 1.0 μL DNA extracts were used as template in 10 μL PCR reactions. Reactions included 10x PCR-buffer, 0.8 μM of each primer (NL1 and NL4), 1 mM of each dNTP, 2.5 mM of MgCl_2 , and 1U of pure Taq polymerase (Bioline). PCR conditions were as follows: 96° C for 3min, 35 cycles at 96° C for 30s, 61° C for 45s, and a final extension step at 72° C for 1min. Purification and cycle sequencing procedures of amplicons followed Mikheyev et al. (2006). Both forward and reverse sequences were generated on a 3100 ABI automated sequencer (Applied Biosystems).

Sequences were edited using Bioedit v.7.0.5.3 (HALL, 1999) and contigs were used in BLASTn (ALTSCHUL et al., 1997) at the NCBI-GenBank. Sequences with 99% similarity to sequences deposited at GenBank were considered conspecific (NGUYEN et al., 2006), whereas sequence similarity scores of 98% or lower were labeled with the closest relative found at GenBank (Table 2).

Yeast antagonism bioassays

To test the potential defensive role of yeasts in fungus gardens, 14 yeast strains commonly found in *A. texana* gardens as well as strains that occurred in minor proportions (Table 2) were challenged in *in vitro* bioassays against microfungal antagonists (CURRIE et al., 1999b; RODRIGUES et al., 2008a). Bioassays challenges followed an adapted version of the experimental set up used by Gerardo et al. (2006b). Yeasts were grown on YMA medium for three days at 25° C before the experiments. YMA plates were divided into four tracks (Figure 2), three were point-inoculated at the edges with the test yeasts and one track was left blank as a control (no yeast inoculated). Yeasts were allowed to grow for 3 days at 25° C, and then an agar plug (5 mm of diameter) of the test microfungus was inoculated in the center of the Petri dish. Microfungi isolated from different attine sources (Table 1) were grown in 2% malt agar medium for 7 days at 25° C before cutting plugs for the experiments.

The insect pathogen *Beauveria bassiana* and the microfungal garden antagonists *C. elegans*, two *Escovopsis* strains, *S. racemosum* and *T. harzianum* (Table 1) were each confronted four times with yeast strains. The experiments were monitored daily and measurements (from the edge of the central agar plug to the mycelial growth edge) were taken when mycelium growth of the tested microfungus reached the end of the control track; or when the mycelium stopped growing in the control track (Figure 2).

Effects on microfungi growth were assessed by dividing the distance of the mycelium growing in the presence of the test yeast by the distance of the mycelium growing in absence of the test yeast (control). Ratios were average for each microfungi and overall differences in suppression or increase of mycelial growth were tested using Kruskal-Wallis non-parametric test in BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007).

Mycocin activity

To check the mechanism by which yeasts inhibited the mycelium growth of the tested microfungi, the extracellular production of mycocins by yeasts was evaluated using the method of Walker et al. (1995). Briefly, modified Sabouraud medium (20 g.L⁻¹ of dextrose, 10 g.L⁻¹ of peptone, 20 g.L⁻¹ agar and 0.03 g.L⁻¹ of methylene blue in citrate-phosphate buffer, pH 4.65) was mixed with 1 mL of sensitive yeast suspension and poured in Petri dishes. Five sensitive strains were used: *Candida albicans* (retrieved from The London School of Hygiene & Tropical Medicine #3153), *Candida glabrata* NCYC 388 (STARMER et al., 1987), *Pichia*

kluyveri, *Saccharomyces cerevisiae* NCYC1006 and *Cryptococcus neoformans* (FUENTEFRIA et al., 2008).

Yeast strains to be tested for killer activity were point-inoculated onto the lawn of the sensitive yeast strains, and then incubated at 25° C for 48h. Production of mycocins was identified by the formation of an inhibition halo surrounding the yeast colony. Test and sensitive yeasts strains were 24 h old at the time of testing. Ten killer-positive strains were used as control.

5.4 Results

Diversity and abundance of yeasts on Atta texana gardens

A total of 64 microfungi strains were recovered from gardens of four *A. texana* nests sampled during the one-year collection period (Table 2). Based on morphological characteristics, 59 strains were recognized as yeasts and 5 strains were classified as yeast-like fungi. In culture the latter isolates resembles yeasts morphologically; however they are not closely related with this group accordingly to the BLASTn results (Table 2).

The number of basidiomycetous yeasts strains (n= 46) were almost four times higher than the number of ascomycetous yeasts strains (n= 13). Overall, 32 yeast species from 18 genera were identified by morphological and molecular criteria. *Cryptococcus* (47%) was the most abundant genus followed by *Rhodotorula* (9%) and *Kodamaea* (8%) (Table 2). The prevalent species was *Cryptococcus magnus* (12.5 %), followed by *Kodamaea ohmeri* (7.6 %).

Five yeast strains (*Candida* cf. *melibiosica*, n=1 isolate; *Cryptococcus* cf. *luteolus*, n=3; *Cryptococcus* cf. *taibaiensis*, n=1; *Rhodotorula* cf. *javanica*, n=1; *Rhodotorula* cf. *taiwaniana*, n=1) had sequence similarity scores of 97% when compared with sequences deposited at GenBank (Table 2). In yeast taxonomy, 97% sequence similarity or lower for the D1/D2 region is usually assumed as a criterion for identification of a putative new yeast species (NGUYEN et al., 2006). Thus, in the present study we named these yeasts isolates by their closest known relative, but these isolates may represent undescribed yeast species. Further studies to investigate their taxonomic relationships will be presented elsewhere.

Fungus gardens of *A. texana* appear to have a transient yeast microbiota, with exception of *Cr. magnus* that was recovered consistently during the winter, spring, and summer collections (Table 2). Yeasts were isolated from nests UGM051218-02 and

UGM060121-02 from all four seasons (Table 3). On the other hand, no yeast was isolated from nest UGM 060121-01 during summer and from nest AR060123-01 during spring and fall collections. No correlation between sampling periods and the number of yeasts CFU/g was observed (Table 3). In fact, we observed a wide fluctuation in the number of CFUs from different nests sampled at different seasons. For instance, yeast populations ranged from 0.28×10^2 to 80×10^2 CFU of yeasts/g of fungus garden in nest UGM 051218-02 (Table 3). Interestingly, no yeast was isolated from collapsed, abandoned garden collected in fall 2006 from nest AR060123-01, in contrast to gardens in other nests that were tended by workers; instead filamentous fungi such as *Absidia* cf. *glauca*, *Aspergillus flavus*, *Cunninghamella* sp. and *Mucor* sp. were isolated from this type of substrate.

Antagonism against garden pathogens

In the 82 bioassay challenges, the mycelium growth of all microfungi was affected by at least one yeast strain (Figure 1 and 2). Comparisons among the tested yeasts revealed that some strains either increased or inhibited the mycelium growth of *C. elegans* (Kruskal-Wallis test, $H= 31.67$, $df= 14$, $p < 0.05$, Figure 1b); however, when comparing each yeast with the control treatment the differences were not significantly different ($p > 0.05$). Apparently, the mycelial growth of *C. elegans* was significantly reduced by *K. ohmeri* in relation to *Cryptococcus* cf. *cellulolyticus* A (Dunn test, $z = 3.59$, $p < 0.05$, Figure 1b); but this reduction was not significant ($z = 3.05$, $p > 0.05$) when compared to the control experiments. In addition, the mycelium growth of *T. harzianum* was significantly affected among yeast treatments ($H= 30.77$, $df= 11$, $p < 0.05$), however the treatments were not significantly different when compared to the control (Figure 1d).

Differences in the mycelium growth of *S. racemosum* were observed among treatments ($H= 41.52$, $df= 14$, $p < 0.05$, Figure 1a and 2). Particularly, the observed differences relied in two yeasts species, *Bulleromyces albus* and *Cr. magnus*, that significantly inhibited *S. racemosum* when compared with the control ($z = 3.41$ and $z = 3.34$, $p < 0.05$, respectively). All other yeasts isolates did not significantly inhibited the mycelium growth of *S. racemosum*.

Moreover, *Beauveria bassiana* mycelium growth was significantly inhibited by some yeasts strains ($H= 40.40$, $df= 12$, $p < 0.05$, Figure 1c). *Candida membranifaciens* and one unidentified yeast-like isolate significantly inhibited *B. bassiana* mycelium growth when compared to the control ($z = 3.13$ and $z = 3.93$, $p < 0.05$, respectively). *Bullera sinensis* and

Pseudozyma sp. apparently inhibited *B. bassiana*, but their effects in the mycelium growth were not significantly different from the control ($z = 2.84$ and $z = 3.04$, $p > 0.05$, respectively).

The mycelium growth of *Escovopsis* sp. A and *Escovopsis* sp. B were significantly different among yeast treatments ($H = 80.92$ and $H = 73.01$, $df = 14$, $p < 0.05$, Figure 1e and 1f, respectively). *Escovopsis* sp. A was inhibited by seven yeasts strains, such as *B. sinensis* ($z = 3.38$, $p < 0.05$), *B. albus* ($z = 3.83$, $p < 0.05$), *C. membranifaciens* ($z = 3.29$, $p < 0.05$), *Cr. flavescens* ($z = 3.57$, $p < 0.05$), *Cr. magnus* ($z = 3.87$, $p < 0.05$), *Cr. cf. taibaiensis* ($z = 3.30$, $p < 0.05$) and *Pseudozyma* sp. ($z = 4.14$, $p < 0.05$). Moreover, the mycelium growth of *Escovopsis* sp. B was significantly reduced when confronted with six yeasts strains: *B. sinensis* ($z = 4.14$, $p < 0.05$), *C. membranifaciens* ($z = 3.44$, $p < 0.05$), *Cr. flavescens* ($z = 3.16$, $p < 0.05$), *K. ohmeri* ($z = 3.52$, $p < 0.05$), *Pseudozyma* sp. ($z = 4.48$, $p < 0.05$) and the unidentified yeast-like isolate ($z = 3.87$, $p < 0.05$).

None of the 14 selected garden yeasts species used in the bioassays showed the killer phenomenon when confronted with the five standard killer-sensitive strains.

5.5 Discussion

Insects generally harbor several yeast species that interact with their host in commensal or beneficial ways (MUELLER et al., 1998; VEGA; DOWD, 2005). Like virtually all other insects, leaf-cutting ant's workers accumulate yeasts on their cuticle (LITTLE; CURRIE, 2007; PAGNOCCA et al., 2008) but leafcutter ants, also harbor a diverse assemblage of yeasts in the fungus gardens, particularly basidiomycetous yeasts in the genus *Cryptococcus* in the case of *Atta texana* gardens. This finding contrasts to Carreiro et al. (1997), who found more ascomycetous yeasts (26 of 39 isolates) than basidiomycetous yeasts (13 of 39 isolates) in both old and new fungus gardens of *A. sexdens rubropilosa* in Brazil.

Yeasts in the garden microbial community of *A. texana* probably have diverse origins. For example, *Cryptococcus*, the most abundant yeast genus found in this study, is commonly associated with plant surfaces as members of epiphytic microbial communities (INÁCIO et al., 2002). Other genera such as *Candida*, *Rhodotorula* and *Trichosporon* are typically isolated from soil, including soils next to ant mounds of the fire ant *Solenopsis invicta* (BA et al., 2000). Thus, the occurrence of plant- and soil-associated yeasts in gardens of *A. texana* is perhaps not surprising, as the ants import yeasts with the plant material used to sustain garden growth (CARREIRO et al., 1997). In contrast, isolation of the yeast *Symptodiomyces paphiopedili* in our study was unusual, because this yeast had previously been isolated only

from orchid's flowers in Japan (SUGIYAMA et al., 1991). Leafcutter ants are not known to forage on orchids, but a number of orchids are known to occur in Central Texas (LIGGIO; LIGGIO, 1999), including the forested areas near the studied *Atta texana* nests.

The abundance of yeasts (e.g., CFU counts) in leafcutter gardens is extremely variable regardless of garden state (garden with old/exhausted vs. garden with fresh leaf substrate added; FC PAGNOCCA, personal observation). The yeast abundance in mature colonies of *A. texana* evaluated in this study was also variable (Table 3), ranging from no yeast to 80×10^2 CFUs per gram of fungus gardens. These figures are much lower compared to adult nests of *A. sexdens rubropilosa* from Brazil (average of 1.4×10^5 yeast CFUs per gram of old fungus garden; PAGNOCCA et al., 1996) and lower than old fungus gardens from adults nests of *Atta cephalotes* and *Acromyrmex octospinosus* reared in the laboratory (average of 1.4×10^5 and 7.2×10^4 CFUs per gram, respectively, CRAVEN et al., 1970). These results suggest the following possible explanations for the differences in yeast abundances between *A. texana* gardens and sampling periods: (i) garden-yeast populations are dependent on the yeast influx with specific kinds of plant substrate into the ant colonies during different periods of the year or in different habitats; (ii) garden age or health, two factors that were not completely controlled in our study, could affect yeast growth in *A. texana* gardens; (iii) ants could use resident garden-yeasts in some periods of the annual cultivation cycle, thus assembling a yeast community for using for diverse purposes in the fungus gardens, such as production of enzymes (CARREIRO, 2000) or for defensive purposes; or (iv) population size of yeast may vary as a function of the concentration of simple sugars generated by extracellular hydrolytic enzymes produced by the symbiotic fungus (SILVA et al., 2006b).

Antagonistic effects of yeasts on filamentous fungi have been noted in a few studies (PETERSSON; SCHNÜRER, 1995; WALKER et al., 1995; ADAMS et al., 2008). For example, the yeasts *Pichia anomala*, *P. guilliermondii* and *P. ohmeri* are used effectively as biological control agents against fungal rot of fruits (COELHO et al., 2007). Interestingly, *P. guilliermondii* was isolated at high abundance from several fungus-growing ants reared in the laboratory, and preliminary bioassays challenges revealed antagonistic interactions against common microfungal pathogens in attine gardens (F. C. PAGNOCCA and U. G. MUELLER, unpublished). However, in contrast to the lab gardens, no *P. guilliermondii* was found in our survey of field gardens of *A. texana*.

In the present study, some yeasts strains apparently promoted the mycelium growth of the tested microfungi, but those effects were not significantly different from the control. On the other hand, garden yeasts suppressed the mycelium growth of some problem fungi of

attine nests (Figure 1). In this sense, secretion of mycocins by yeasts is generally suggested as the potential mechanism for the antagonism against other yeasts and filamentous fungi (WALKER et al., 1995). Although, Carreiro et al. (2002) observed a high proportion of killer yeasts in *A. sexdens rubropilosa* nests, mycocin-secreting yeasts were not identified in our survey. Thus, the antagonism exhibited by the garden-yeasts towards the microfungi would be due to others factors, such as (i) exploitation competition for nutrients, (ii) changes in pH caused by other metabolic products or (iii) production of antimicrobial compounds other than the killer toxins.

The microfungi used in this study are usually found in field leafcutter ant nests and are potential “weeds” of attine gardens (RODRIGUES et al., 2005a; 2008a). The fact that *B. bassiana* and *S. racemosum* were inhibited whereas *C. elegans* and *T. harzianum* were not affected by garden yeasts suggests that the control of alien microorganisms in attine gardens is complex and may required from ants additional defensive barriers such as the chemical secretions of metapleural and mandibular gland which have antifungal properties (BOT et al., 2002, RODRIGUES et al., 2008b).

Most interestingly, *Escovopsis* sp. strains were significantly inhibited by garden yeasts. Particularly, the yeasts *Bulleromyces albus*, *Cryptococcus magnus* and a species of *Pseudozyma* significantly inhibited the two *Escovopsis* strains tested (Figure 1e and 1f). Currie et al. (1999b) studying several attine ant genera demonstrated that *Pseudonocardia* actinomycetes isolated from the workers’ cuticle selectively inhibited *Escovopsis* strains but not other microfungal garden contaminants. Recently, several studies reported that *Escovopsis* sp. is inhibited by bacteria of the genus *Burkholderia* found in *A. sexdens rubropilosa* gardens (SANTOS et al., 2004) and by secretions of the ant metapleural glands (BOT et al., 2002) but not by the mandibular gland secretions (RODRIGUES et al., 2008b). The fact that *Escovopsis* can be inhibited by other microorganisms, including actinomycete bacteria, *Burkholderia* bacteria, ant glandular secretions and now also yeasts, expands our view on the co-evolution of this fungus in the attine ant-microbe mutualism, since these diverse disease-suppressing microbes may contribute synergistically to defend the attine garden against *Escovopsis* spp. This may be particularly beneficial for leaf-cutting ants, such as *Atta* spp., in which *Pseudonocardia* bacteria is absent or found in very low frequency (CURRIE et al., 1999b; ZHANG et al., 2007; MUELLER et al., 2008). Garden immunity against problem fungi like *Escovopsis* therefore may not derive exclusively from an hypothesized co-evolutionary arms races between *Escovopsis* and specialized antibiotic-producing actinomycetes (CURRIE et al.,

1999b), but derive in part from an enrichment of multiple disease-suppressing microbes in the garden matrix (KOST et al., 2007).

5.6 Acknowledgments

We would like to thank Dr. Carlos A. Rosa, Dr. Claudete Rodrigues de Paula, and Dr. Patrícia Valente, for sharing sensitive yeast strains; and K. Anderson for permission to work at the Hornsby Bend Environmental Research Center. This work was supported by a CAPES-Brazil Fellowship (02/05) to AR; NSF Grants DEB-0110073 and DEB-0639879 to UGM; an Undergraduate Research Fellowship to RC from the College of Natural Sciences at the University of Texas at Austin, and by the Brazilian agencies CNPq and FAPESP. We also like to thank C. Rabeling for comments on this manuscript.

Table 1 Microfungal species used in yeast antagonism bioassays

Microfungal isolates	Ant species ^a	Origin
<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Atta texana</i>	Worker corpse in an "external dump", USA
<i>Cunninghamella elegans</i>	<i>Trachymyrmex septentrionalis</i>	Field nest, USA
<i>Escovopsis</i> sp. A	<i>Trachymyrmex turrifex</i>	Laboratory nest, USA
<i>Escovopsis</i> sp. B	<i>Atta sexdens</i>	Laboratory nest, originally from Peru
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	<i>Acromyrmex coronatus</i>	Laboratory nest, originally from Panama
<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Trachymyrmex septentrionalis</i>	Field nest, USA

^a Ants species which the microfungi were isolated from.

Table 2 Yeasts species isolated from gardens of field nests of *Atta texana*

Yeast species	Closest relative ^a		# of isolates				Frequency ^b
	Similarity %	Accession #	winter	spring	summer	fall	
ASCOMYCOTA							
<i>Aureobasidium pullulans</i>	100	DQ377657				3	4.7
<i>Candida</i>							
<i>membranifaciens</i> ^c	100	U45792	3				4.7
cf. <i>melibiosica</i>	97	U44813	1				1.6
<i>Kodamaea ohmeri</i> ^c	100	AF335978	1		4		7.8
<i>Saccharomyces exiguus</i>	100	AY007906			1		1.6
unidentified yeast-like fungus ^c	90	DQ384103		1	2		4.7
BASIDIOMYCOTA							
<i>Bullera sinensis</i> ^c	100	AF189884	1				1.6
<i>Bulleromyces albus</i> ^c	100	AF416643	2				3.1
<i>Cryptococcus</i>							
cf. <i>cellulolyticus</i> ^c	98	AF075525	2				3.1
<i>flavescens</i> ^c	100	AF487885		1			3.1
	99	AM160631	1				3.1
<i>flavus</i>	100	AF075497				3	4.7
<i>laurentii</i> ^c	99	AJ876597	2			1	4.7
<i>luteolus</i>	100	AM160632		1			6.3
cf. <i>luteolus</i> ^c	97	AM160633	2			1	6.3
<i>magnus</i> ^c	100	AF189872	1	2			12.5
	100	AY242120		2	1		12.5
	99	DQ377663	2				12.5
cf. <i>podzolicus</i>	98	AF075481	1		1		3.1
cf. <i>taibaiensis</i> ^c	97	AY557601	1				1.6
<i>terreus</i>	99	AF444694		1			1.6
sp. 1	100	AF416643	1				1.6
sp. 2	99	DQ377672	1				1.6
sp. 3	98	DQ377673		1			1.6
sp. 4	98	AF444699		1			1.6
<i>Pseudozima</i> sp. ^c	99	AM160637	1				1.6
<i>Rhodosporidium</i> cf. <i>paludigenum</i>	98	AF514863				1	1.6
<i>Rhodotorula</i>							
cf. <i>javanica</i>	97	AF189935		1			1.6
<i>lactosa</i>	99	AF189936				1	1.6
<i>mucilaginoso</i>	99	AF335987				1	1.6
<i>nothofagi</i>	100	AF444736		1			1.6
cf. <i>taiwaniana</i>	97	AY551270	1				1.6
sp. 1	99	AM160641		1			1.6
<i>Sporidiobolus ruineniae</i>	99	AF070438				2	3.1
<i>Sporisorium penniseti</i> (yeast-like fungi)	99	AY740130				2	3.1
<i>Sympodiomyces paphiopedili</i>	100	DQ832238				2	3.1
<i>Trichosporon porosum</i>	100	AM039684			1		1.6
Subtotal			24	13	10	17	
Total # of isolates					64		

^aAccordingly to BLAST (ALTSCHUL et al. 1997).

^bFrequency of yeast species within total sample of 64 yeast isolates.

^cYeast species used in the *in vitro* bioassay challenges (n= 14 includes 2 strains of *Cryptococcus* cf. *cellulolyticus* and 2 strains of *Cryptococcus* cf. *luteolus*).

Table 3 Mean number of yeast colony forming units (CFU g⁻¹) per gram of fungus garden and number of yeasts strains isolated from four *Atta texana* nests over one year

Ant nest	CFU g ⁻¹ (mean x 10 ² ± S.E.) ^a			
	Winter	Spring	Summer	Fall
UGM 051218-02	12.0 ± 6.05 (n= 4) 5 ^b	0.41 ± 6.05 (n= 4) 5	80.0 ± 6.05 (n= 4) 6	0.28 ± 6.99 (n= 3) 8
UGM 060121-01	0.63 ± 0.07 (n= 4) 10	n.d. ^c 2	0 0	0.61 ± 0.07 (n= 4) 4
UGM 060121-02	0.74 ± 1.06 (n= 3) 9	30.0 ± 0.73 (n= 3) 6	67.0 ± 0.58 (n= 4) 2	9.75 ± 0.17 (n= 4) 5
AR 060123-01	1.80 (n = 2) 0	0 0	0.32 ± 0.66 (n= 3) 2	0 ^d 0
Total # of isolates	24	13	10	17

^aFigures in parentheses indicate the number of replicates used in each assay.

^bnumber of yeasts isolates recovered in each sampling period.

^cn.d.: no data available due to contamination by foreign fungi.

^dIsolation attempts were carried out on collapsed garden as no healthy fungus garden was available in this nest at the time of collection (see methods).

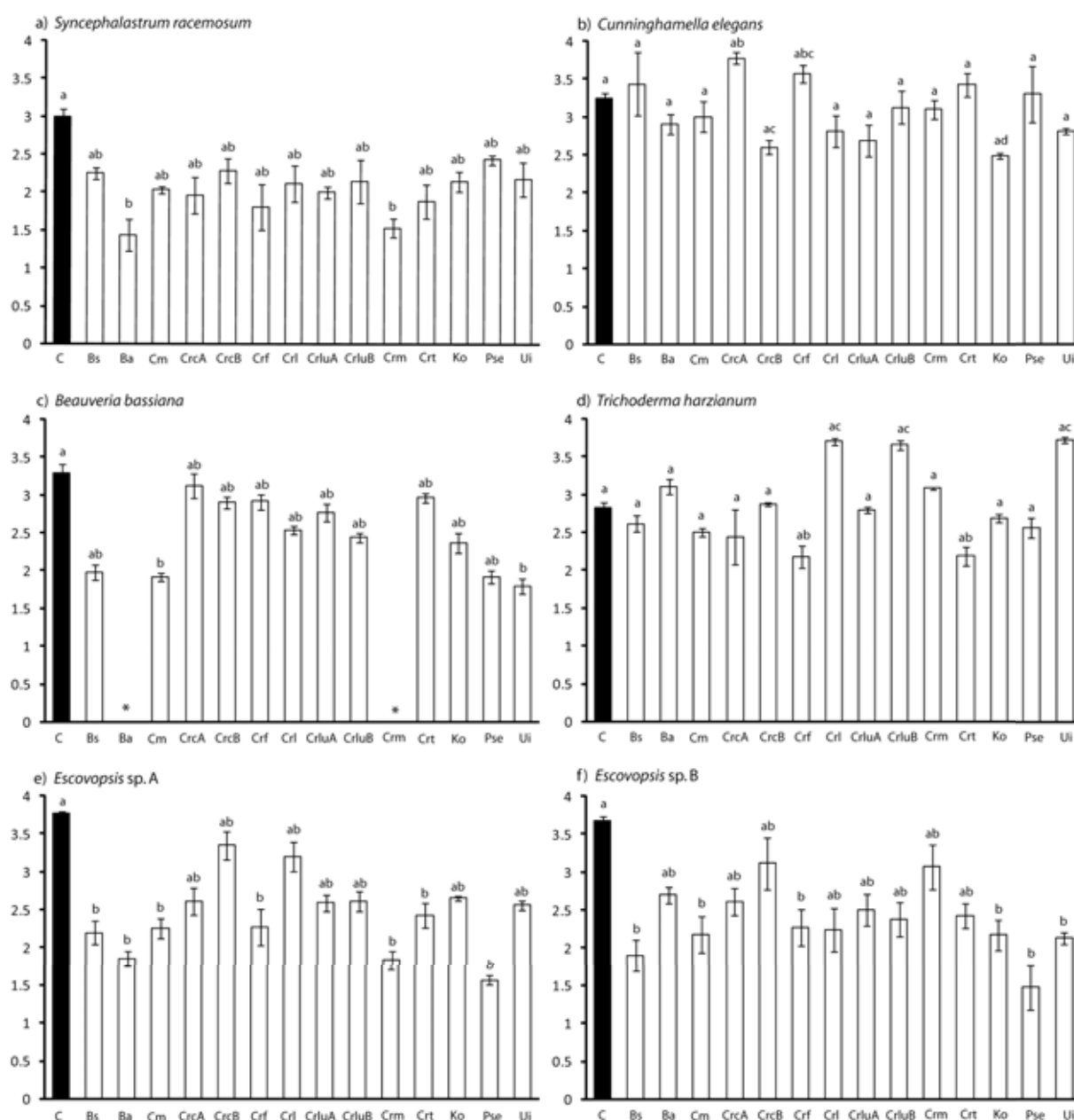


Figure 1. Inhibitory and growth-enhancing effects of test yeasts on mycelium growth of six problem fungi of attine gardens (*Beauveria bassiana*, *Cunninghamella elegans*, *Escovopsis* sp. A, *Escovopsis* sp. B, *Syncephalastrum racemosum* and *Trichoderma harzianum*). Columns shaded in black indicate control experiments. *: absence of bars means that no bioassay challenge was performed. Yeast species, Bs: *Bullera sinensis*; Ba: *Bulleromyces albus*; Cm: *Cryptococcus magnus*; CrcA: *Cr. cf. cellulolyticus* A; CrcB: *Cr. cf. cellulolyticus* B; Crf: *Cr. flavescens*; CrI: *Cr. laurentii*; CrluA: *Cr. cf. luteolus* A; CrluB: *Cr. cf. luteolus* B; Crm: *Cr. magnus*; Crt: *Cr. cf. taibaiensis*; Ko: *Kodamaea ohmeri*; Pse: *Pseudozyma* sp.; Ui: unidentified yeast-like fungi. Bars labeled with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

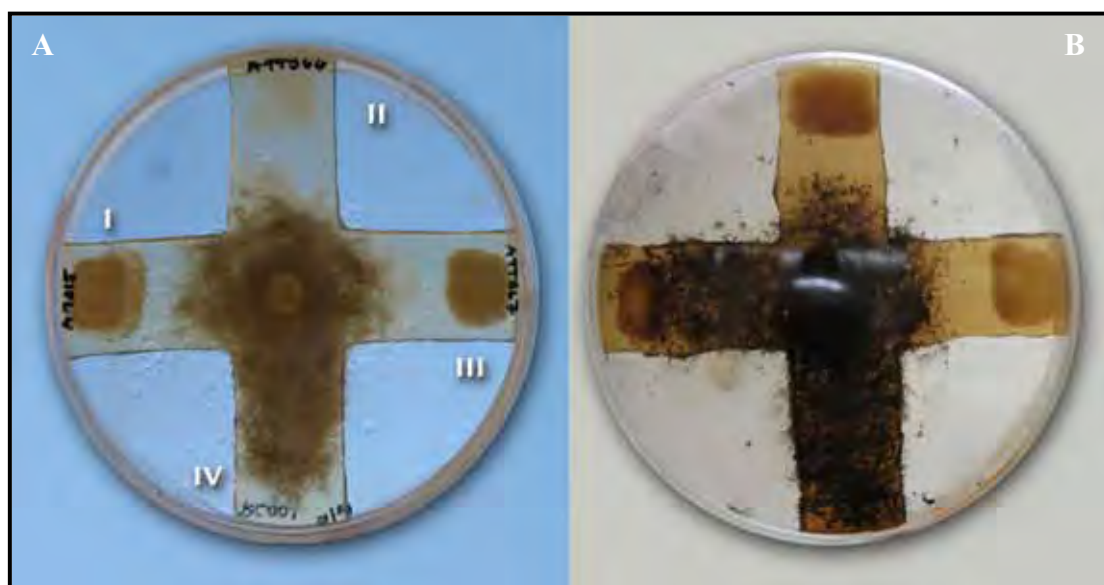


Figure 2. Yeast antagonism bioassays against garden pathogens of leaf-cutting ants. Growth lanes were cut from the agar and then inoculating the lanes peripherally with a garden-yeast. (A) yeasts inoculated in (I) *Kodamaea ohmeri*, (II) *Cryptococcus luteolus* A and (III) *Cryptococcus* cf. *cellulolyticus* A. One track (IV) was left as a control which no yeast was inoculated. (B) yeasts inoculated in the same order (I) *Cryptococcus* cf. *cellulolyticus* B, (II) *Bulleromyces albus* and (III) *Pseudozyma* sp. After three days of growth, garden-yeasts were confronted with microfungi inoculated centrally onto the plate: (A) *Syncephalastrum racemosum* and (B) *Escovopsis* sp. A.

6.

CAPÍTULO 4

**YEASTS AND FILAMENTOUS FUNGI CARRIED BY GYNES
OF LEAF-CUTTING ANTS**

Yeasts and filamentous fungi carried by the gynes of leaf-cutting ants

Fernando C. Pagnocca^{1,2*}, André Rodrigues^{1,2}, Nilson S. Nagamoto³, Maurício Bacci Jr.^{1,2}

¹ Center for the Study of Social Insects, UNESP - São Paulo State University, Rio Claro, SP, Brazil.

² Department of Biochemistry and Microbiology, UNESP - São Paulo State University, Rio Claro, SP, Brazil.

³ Department of Vegetal Production, UNESP - São Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil.

* Corresponding author:

Mailing address: Centro de Estudos de Insetos Sociais, Universidade Estadual Paulista
Av. 24-A, 1515, Bela Vista, Rio Claro, São Paulo, Brazil, 13506-900.

Phone: +55 19 3526-4160; Fax: +55 19 3534-8523

E-mail: pagnocca@rc.unesp.br

6.1 Abstract

Insect-associated microbes exhibit a wide range of interactions with their hosts. One example of such interactions is the insect-driven dispersal of microorganisms, which plays an essential role in the ecology of several microbes. To study dispersal of microorganisms by leaf-cutting ants (Formicidae: Attini), we applied culture-dependent methods to identify the filamentous fungi and yeasts found in two different body parts of leaf-cutting ant gynes: the exoskeleton and the infrabuccal pocket. The gynes use the latter structure to store a pellet of the ants' symbiotic fungus during nest founding. Many filamentous fungi (n= 142) and yeasts (n= 19) were isolated from the gynes' exoskeleton. In contrast, only seven filamentous fungi and three yeasts isolates were recovered from the infrabuccal pellets, suggesting an efficient mechanism utilized by the gynes to prevent contamination of the symbiotic fungus inoculum. The genus *Cladosporium* prevailed (78 %) among filamentous fungi whereas *Aureobasidium*, *Candida* and *Cryptococcus* prevailed among yeasts associated with gynes. Interestingly, *Escovopsis*, a specialized fungal pathogen of the leaf-cutting ant-fungus symbiosis, was not isolated from the body parts or from infrabuccal pellets of any gynes sampled. Our results suggest that gynes of the leaf-cutter ants *Atta laevigata* and *A. capiguara* do not vertically transmit any particular species of yeasts or filamentous fungi during the foundation of a new nest. Instead, fungi found in association with gynes have a cosmopolitan distribution, suggesting they are probably acquired from the environment and passively dispersed during nest foundation. The possible role of these fungi for the attine ant–microbial symbiosis is discussed.

Keywords: *Atta*, mating flight, *Escovopsis*, infrabuccal pellet, Attini

6.2 Introduction

Fungus-growing ants (Hymenoptera, Formicidae, tribe Attini) maintain an obligate symbiosis with basidiomycetous fungi, as occurs in the case of *Leucoagaricus gongylophorus* (*Agaricales*) which are cultivated for food and supply of essential enzymes to workers (WEBER, 1972; SILVA et al., 2006c). In return, the ants provide protection against antagonistic microbes and parasites to the fungal partner (MUELLER, 2002; CURRIE et al., 2003a, RODRIGUES et al., 2008a) and substrate for fungal growth. This symbiosis has become a model system for the study of coevolution, and many aspects of the evolutionary histories and complex interactions among its participants have been investigated (CHAPELA et al., 1994, SCHULTZ; MEIER 1995; MUELLER et al., 1998; WETTERER et al., 1998; CURRIE, 2001a; PAGNOCCA et al., 2001; CURRIE et al., 2003c; CAFARO; CURRIE, 2005; SCHULTZ; BRADY, 2008).

Fungiculture in the tribe Attini (the fungus-growing ants) originated approximately 50 million years ago (SCHULTZ; BRADY, 2008). Despite significant long-term co-evolution of both organisms, there is evidence that distantly related ant species can cultivate similar fungi and vice-versa. Such “cultivar switches” among ant species have occurred repeatedly throughout the evolutionary history of this symbiosis (MUELLER et al., 1998; VILLENSEN et al., 2004).

Vertical transmission of the cultivated fungus occurs when gynes leave their parental nest for the mating flight, at which time they transport in their infrabuccal pocket a small fungal pellet which will become the starting inoculum for the gyne’s new fungus culture. This culture occurs in underground chambers on a variety of substrates (mostly plant material in leaf-cutting ants); initially, faecal deposits secreted by the gyne are used to grow the cultivar, and later, when workers emerge, they collect the substrate to support the fungus garden (WEBER, 1972).

Currie et al. (1999a) and Currie (2001b) reported that fungi in the genus *Escovopsis* (Ascomycota: anamorphic Hypocreales) can overrun fungus gardens and the resulting effects are usually dramatic for the ant colony. The ants’ response to this threat was to acquire an additional symbiont, actinomycete bacteria which grows on their bodies and is found in all attine genera studied so far (CURRIE et al., 1999a,b). Initially assigned to the genus *Streptomyces*, these bacteria are now recognized as belonging to the genus *Pseudonocardia* (CURRIE et al., 2003b) and it was suggested that they can protect attine nests by producing

disease-suppressing antibiotic compounds that selectively inhibit *Escovopsis* growth (CURRIE et al., 1999b). The observations that *Pseudonocardia* are transmitted by gynes from the parental colony to new colonies during nest foundation (i.e. vertical transmission) and exhibit selective antimicrobial activity lead to the conclusion that *Pseudonocardia* have co-evolved with ants and the parasite *Escovopsis* (CAFARO; CURRIE, 2005). However, according to Kost et al. (2007) it is possible that *Pseudonocardia* as well as other actinomycetous symbionts can also be acquired from the environment (i.e. horizontal transmission).

Although the primary participants in the attine symbiosis have been relatively well-studied, comparatively less research has focused on the yeasts and other microfungi associated with this complex system. However, the evidence that the association is tripartite (attine ants-fungal cultivar-actinomycete bacteria) (CURRIE et al., 2003a) led to additional studies aiming to identify other microbes associated with attine nests. Most such studies have focused on microbes associated with the ants' fungus gardens. For instance, results from previous surveys revealed that bacteria in the genus *Burkholderia* are found in association with *Atta sexdens rubropilosa* and it was suggested that these bacteria can also secrete antibiotics targeting *Escovopsis* sp. and other filamentous fungi providing protection for the fungus garden against unwanted microorganisms (SANTOS et al., 2004). Surprisingly, no systematic microbial surveys have been conducted in soil from the nest mound, the ants' exoskeleton or the fungal pellets carried by foundress queens.

In addition to the cultivar, other filamentous fungi have been found in both field and laboratory nests of *A. sexdens rubropilosa* (RODRIGUES et al., 2005a) and field nests of *Acromyrmex* ants (RODRIGUES et al., 2008). These studies indicate that some fungal species are widespread and prevalent in leafcutter ant nests, suggesting that they could still have some yet unknown role in the symbiosis.

Craven et al. (1970) were the first to reveal that fungus garden of attine species contain yeasts. Carreiro et al. (1997) conducted a survey of yeast diversity using laboratory nests of *A. sexdens rubropilosa*, in which two new yeast species were described (MIDDELHOVEN et al., 2003, CARREIRO et al., 2004). Little and Currie (2007) described that black yeasts closely related to the genus *Phialophora* could be a new symbiont associated with attine ants. Additional new yeast species have subsequently been found in association with other attine species (F.C. PAGNOCCA, unpublished data). In one year-old nests (n= 10) of *A. sexdens rubropilosa* maintained in the laboratory, the number of yeasts per gram ranges from 2.7 x

10^4 to 1.3×10^5 in the fungus garden and 2.2×10^4 in the waste deposit (PAGNOCCA et al., 1996), suggesting that various parts of leafcutter ant nests make suitable environments for yeasts.

Carreiro (2000) hypothesized that yeasts, while taking advantage of the nutrients available in the fungus garden, might also be beneficial to the ants. By secreting enzymes into the fungus garden, these yeasts might contribute to the digestion of the plant substrate collected by the ants, making more nutrients available to the ants, to the symbiotic fungus and to themselves as well. These enzymes might also contribute to the degradation of plant tissue by the fungal cultivar by breaking down structural plant polysaccharides such as pectin and hemi-cellulose (CARREIRO, 2000).

The present study aims to investigate the yeasts and filamentous microfungi carried by gynes of the leaf-cutting ants *Atta laevigata* Smith (1858) and *Atta capiguara* Gonçalves (1944). To accomplish this objective we monitored field nests for nuptial flight preparation in 2006 and 2007 and collected gynes just before their flight. Using culture-dependent methods coupled with molecular methods we identified the yeasts and other microfungi associated with these insects.

6.3 Material and Methods

Nest location and gyne collection

Two adult nests of *A. capiguara* and one of *A. laevigata* were located at Fazenda Santana, Botucatu, São Paulo State, Brazil (GPS location: 22°50.6' S; 48°26.1' W; elevation 798 m) in a field containing almost exclusively *Paspalum* sp. grass. At the beginning of the rainy season (September), the nests were periodically monitored in order to predict the day of the mating flight. In the state of São Paulo, flights usually occur in October following significant rainfall (enough to soak the soil surface) (AUTUORI, 1941; MOSER, 1967; N. S. NAGAMOTO, personal observation).

Two collections were performed in the course of this study (Table 1): (i) in October 6th, 2006 a total of 147 gynes (84 of *A. laevigata*, 45 and 18 of *A. capiguara* nests #1 and # 2, respectively) were picked up with sterile forceps at the moment they appeared at the nest entrance (Fig. 1b); (ii) in October 27th 2007, 60 gynes were collected from the same nest of *A. laevigata* and 60 from nest # 2 of *A. capiguara*. In 2007, alates were not observed in nest # 1

of *A. capiguara* on the day of collection. All gynes were put into individual sterile paper bags and transported to the laboratory in the next four hours.

Yeast and filamentous fungi isolation

Isolation from the exoskeleton (E1 and E2)

In order to isolate the yeasts associated with gynes' exoskeleton, two different procedures were conducted, each with multiple trials (Table 1). In the E1 method, winged females collected in 2006 (n= 147) and 2007 (n= 120) were allowed to walk during four hours on yeast-malt extract agar (YMA) plates (3 g yeast extract, 3 g malt extract, 5 g peptone, 10 g D-glucose and 15 g agar per L at pH 5.5) supplemented with 0.1 mg.mL⁻¹ of chloramphenicol (US Biological) (YARROW, 1998). Most of the culture medium surface was scraped by the ants, so additional molten YMA (10 mL) was added to each plate to reconstitute the medium's surface before incubation. In the second method, called E2, an additional set of gynes (n= 23, Table 1) of *A. laevigata* had their whole body immersed in 10 mL YMA - chloramphenicol broth in test tubes (one queen per test tube).

Isolation from the infrabuccal pellet (P)

Gynes which had been subjected to the E1 method (Table 1) were picked up from the YMA plates and the pellet containing the symbiotic fungus inoculum was aseptically removed from their infrabuccal pocket (Fig. 1c) and transferred to test tubes containing 3.0 mL YM broth supplemented with 0.1 mg.mL⁻¹ of chloramphenicol in the 2006 collection or plated in potato dextrose agar in the 2007 collection.

All plates and test tubes were incubated at 22° C for 10 days and monitored daily. Samples of the test tubes showing turbidity and/or sediment were streaked on YMA medium and yeast colonies growing on the surface of this medium were isolated. Special attention was paid to filamentous fungi from the 2007 mating flight (see Results below).

Yeast identification

The yeasts isolated from leaf-cutting ants gynes were maintained in GYMP medium (ROSA et al., 1995) at 4° C and at - 80° C in 30 % glycerol. Isolates were initially grouped according to their colonial morphology (e.g., color, size, shape, texture) and physiological characteristics (ability to assimilate carbohydrates), staining reaction with diazonium blue-B (DBB) and urease reaction. The methods and keys for identification were used according to Kurtzman and Fell (1998) and Barnett et al. (2000). Three main groups of isolates were recognized; the D1/D2 domains of the nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA were sequenced (O'DONNELL, 1993; KURTZMAN; ROBNETT, 1998) for representative strains of each group as well as strain R3 (single strain). Thus, a total of 16 strains were sequenced (Table 2). DNA extraction followed the protocol described in Almeida (2005). DNA was amplified with primers NL1 (5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG3') and NL4 (5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG3'). Twenty five µL polymerase chain reactions were carried out using 1µL of 50 mM MgCl₂, 4 µL of 1.25 mM of dNTP Mix, 2.5 µL of 10x PCR buffer, 2 µL of 10 µM of each primer, 0.2 µL of 5 U/µL of Taq polymerase and 5 µL of DNA template (diluted 1:750) and 8.3 µL PCR water. The amplification protocol consisted in an initial step of 96° C for 3 min, followed by 35 cycles: 96° C for 30 s, 61° C for 45 s and 72° C for 1 min. Amplicons were cleaned up with GFX DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) and the same set of primers were used in cycle sequencing reactions. Both DNA strands were generated in an ABI Prism 377 DNA automated sequencer (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA), manually resolved and aligned through the software BioEdit Sequence Alignment Editor v. 7.0.5.3 (HALL, 1999).

In order to find the closest relatives of our isolates, contigs were compared with their homologues retrieved from National Center for Biotechnology Information (NCBI) - GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using BLASTn (ALTSCHUL et al., 1997). Yeasts strains exhibiting 99 % similarity in the D1/D2 domains with sequences from the GenBank were considered conspecific (see KURTZMAN; ROBNETT, 1998; BERKOV et al., 2007).

Filamentous fungi identification

After initial incubation, morphological types of filamentous fungi growing in YMA plates (used in E1 isolation method) and in PDA plates (used in the P method in the 2007 collection) were selected and subcultured in 2% malt agar for identification. Colony macromorphology and micromorphology were used as characters to identify the isolates with

the help of general taxonomic keys (DOMSCH et al., 1980; SAMSON et al., 2000), as well as specific taxonomic treatments for some groups of fungi such as *Cunninghamella* and *Cladosporium* (LIU et al., 2001; SCHUBERT et al., 2007).

6.4 Results

On October 6th, 2006 on a warm and moist afternoon, gynes of *A. laevigata* and of *A. capiguara* were leaving the parental nests for the nuptial flight. As expected in this special moment of the colony's life cycle, the following observations were made: i) the nest openings were enlarged, indicating preparation to release a great number of alates; ii) it had rained significantly on the previous day; iii) as soon as the rain stopped there was an increased amount of soil deposition outside the nest due to the cleaning of the large openings (Fig. 1a); iv) a huge amount of workers appeared, including soldiers, walking on the nest mound; v) winged males first appeared in the openings followed by gynes (Fig. 1b). On October 26th, 2007 the nuptial flight events were similar for the same nests, except for nest #1 of *A. capiguara*, which was not releasing gynes.

Overall, the number of yeasts recovered in our survey was relatively low (Table 1). From 577 isolation trials made from the material collected in 2006 and 2007, only 22 yeast strains were isolated. Considering the 2006 material, a total of 19 yeasts were recovered from 297 isolation attempts (6.4% success, Table 1). Specifically, 191 isolation trials were made with *A. laevigata* gynes from which 12 yeasts were recovered by the P (84 trials; 3 strains), E1 (84 trials; 4 strains) and E2 (23 trials; 5 strains) methods. Additionally, 88 isolation trials were conducted from gynes from *A. capiguara* nest #1. Seven yeasts were isolated by the E1 method (45 trials) and no yeast was isolated by the P method (43 trials; infrabuccal pellets were not found in two out of 45 gynes). No isolation through the E2 method was carried out from gynes of this nest. Moreover, yeast isolation by the E1 method from 18 gynes of *A. capiguara* nest #2 was also unsuccessful (Table 1).

The isolated yeasts strains were identified using both phenotypic and molecular markers (Table 2). The species found in the 2006 collection were: *Rhodotorula glutinis*, *Candida parapsilosis*, *Cr. laurentii* and the black yeast *Aureobasidium pullulans* (Table 2). Five out of seven strains of the latter species were isolated from both ant species by the E1 isolation method, whereas the two remaining strains were isolated by the E2 and by the P

methods from the nest of *A. laevigata* (Table 2). *C. parapsilosis* was not isolated from the fungal pellet.

Six *Cr. laurentii* strains were isolated from 2006 offspring. Four out of six strains were isolated from *A. capiguara* exoskeleton and one strain from *A. laevigata* exoeskeleton both using the E1 method. The remaining strain of this group was isolated from the infrabuccal pellet of *A. laevigata*. This was the most prevalent species among yeasts in this survey.

In 2007, a total of 280 isolation trials were performed, of which 140 (60, 50 and 30 through the E1, E2 and P methods, respectively) were from the same *A. laevigata* nest and 140 (60, 50 and 30 through the E1, E2 and P methods, respectively) were from nest 2 of *A. capiguara*. Only three yeasts were recovered from these procedures, all of them identified as *Cr. laurentii* (strains R20, R21 and R22 in Table 2).

From the 2006 collection, we observed the presence of several filamentous microfungi in gynes of all nests sampled. These filamentous fungi were mostly observed in plates using the E1 method (Fig. 1d) but no further subcultures were carried out with these microbes; however, based on morphological characteristics the genera *Cladosporium* and *Paecilomyces* were prevalent. Accordingly with the 2006 observations, we concentrated our efforts in the isolation and identification of filamentous fungi during the 2007 mating flight. A total of 149 strains were isolated by the E1 method (n= 142 strains) and by the P method (n= 7 strains). Eleven genera and three unidentified fungi resulted from these isolations. Interestingly, the genus *Cladosporium* was prevalent (78 %, Table 3) but no further identification at the species level was conducted for most isolates. However, other more common species of this genus such as *Cladosporium cladosporioides* were isolated from the fungal pellet. Interestingly, the fungal parasite *Escovopsis* was not isolated from any source.

6.5 Discussion

Many insect species are associated with fungi which they feed on and occasionally disperse to new substrates (PHAFF; STARMER, 1987; GANTER, 2006). Insects can harbour several species of filamentous fungi and yeasts on their exoskeleton (ROSA et al., 2003), in their gut (SUH et al., 2005) or specialized structures adapted to transport fungi (e.g. mycangia), as is the case of the bark beetle-fungal association (SIX; KLEPZIG, 2004). In all of these insect-microbial associations hosts have an impact in the dispersal or survival of the associated microbes. In leaf-cutting ants, microbes have been found in the fungus gardens

(CURRIE et al., 1999a; SANTOS et al., 2004; RODRIGUES et al., 2008a), on the ant's exoskeleton (CURRIE et al., 1999b; LITTLE; CURRIE, 2007) and in fungal pellets carried by nest-founding gynes (QUINLAN; CHERRETT, 1978).

Of the yeasts isolated in this study (Table 2), two species, *Cr. laurentii* and *A. pullulans*, are common inhabitants of soil and the surfaces of leaves (SLAVIKOVÁ; VADKERTIOVÁ, 2000; FONSECA; INÁCIO, 2006) and are probably carried to the nest in the plant material collected by foraging workers. It is interesting to note that *Cr. laurentii* has also been found in the infrabuccal pocket of the carpenter ant *Camponotus vicinus* (MANKOWSKI; MORREL, 2004) together with several other yeast species. It is likely that attine gynes are in contact with these yeast species since the beginning of their life cycle and it may explain how they have been acquired by these ants. *Cr. laurentii*, *Candida* spp., *Rhodotorula glutinis* and black yeasts have been also found in *A. sexdens rubropilosa* nests (CARREIRO et al., 1997).

Candida parapsilosis is considered an opportunistic human pathogen associated with several kinds of illnesses. In humans, it has been isolated from nosocomial infections (KOCSubE et al., 2007) and vulvovaginites (COOPER; GINNIS, 1996), but is also obtained from insects (SUH et al., 2005; GANTER, 2006). In addition, Ba and Phillips (1996) and Ba et al. (2000) reported the occurrence of *C. parapsilosis* in association with the red imported fire ant *Solenopsis invicta*.

The low occurrence of yeasts associated with the body surface and the fungal pellets of leaf-cutting ants suggests the absence of species-specific vertical transmission of yeasts by young queens. Thus, the most probable scenario is that yeasts enter the nests after worker emergence when ants start adding new substrates to the young fungus garden and/or from the environment surrounding the nest. This view is supported by the fact that young field nests (i.e. five to six months old with just one fungus chamber) of *A. sexdens rubropilosa* (n= 14 nests sampled) and *A. laevigata* (n= 27 nests sampled) contain approximately 10 to 100 yeast CFU/g of fungus garden (as determined by the most probable number method – F. C. Pagnocca, unpublished data). On the other hand, Craven et al. (1970) found a minimum of 4.0×10^4 yeast/g in adult nests of *A. cephalotes*.

Further research is required to determine the roles performed by the various microbes found in attine fungus gardens. According to Carreiro (2000), yeasts in nests of *A. sexdens rubropilosa* are potential producers of hydrolytic enzymes that break down plant polysaccharides into simple sugars making them available for the cultivated fungus and ants.

Additionally, Silva et al. (2006c) observed that some of the amylolytic enzymes found in the fungal garden could be produced by microorganisms other than the symbiotic fungus.

Contrary to our expectations, considering the highly evolved defense system of these insects against alien microorganisms, the number and diversity of filamentous fungi isolated in our study was high, especially on the plates where gynes had walked. Despite the prevalence of filamentous fungi in comparison with yeasts on the ants' exoskeleton, the presence of most of the filamentous fungi species suggest they may be transient, even though the hypothesis that some become harmful after dispersal should be considered. However, when compared with yeasts, the number of filamentous fungi isolated from infrabuccal pellets was low (n= 7 isolates, Table 1) suggesting that the ants provide special care to prevent fungal pellet contamination. The massive occurrence of *Cladosporium* sp. in both collections suggests that these insects may be an important mechanism of dispersal for these fungi, but we cannot yet determine whether they are intentionally transmitted. Indeed, *Cladosporium* spp. can be found as epiphytes on plant leaves and are also considered a common inhabitant of the soil usually as a saprophytic life-style (DOMSCH et al., 1980), and our study found no evidence for a species-specific relationship between this fungal species and the leafcutter ant symbiosis.

The filamentous fungi found in our survey can be characterized as members of the soil community (Table 2). Except for the soil-borne zygomycetes *Absidia corymbifera* and *Cunninghamella echinulata*, all of the other fungi recovered are ascomycetes that are commonly isolated from soil samples worldwide (SUN; LIU, 2008). Interestingly, some soil-borne species of the genera *Cladosporium*, *Cunninghamella*, *Fusarium* and *Trichoderma* were considered to be potential antagonists in leafcutter ants gardens (RODRIGUES et al., 2008a).

Our results suggest that leafcutter gynes do not harbour entomopathogenic fungi before the mating flight, including common species such as *Beauveria* sp. and *Metarhizium* sp. This finding contrasts with observations that gynes collected immediately before the mating flight and reared in the lab are commonly threatened by entomopathogenic fungi (A. Silva, personal observation).

Currie (2001b) found that *Escovopsis* is a specific parasite that causes a loss of the fungus garden mass and a decrease in the ants' work force in fungus-growing ant nests. *Escovopsis* prevalence was determined to be variable throughout the fungus-growing ants including the leafcutters (CURRIE et al., 1999a). Despite the high incidence of filamentous fungi in our samples, no *Escovopsis* strains were isolated, providing further support for the

hypothesis that this parasite is horizontally transmitted (CURRIE et al., 1999a). In addition, the fact that no *Escovopsis* isolates were found in the fungal pellets of both ant species is consistent with the findings by Currie et al. (1999a) who did not find any *Escovopsis* associated with foundress queens of *Atta columbica*, a Central American leaf-cutting ant species. It is still unknown how *Escovopsis* is transmitted between fungus-growing ant nests, though it is generally assumed that invertebrates, such as mites, that occasionally visit attine nests are the possible source of *Escovopsis* dispersion (CURRIE et al., 1999a, CURRIE, 2001a,b).

The production of winged females and males by the colony demands large amounts of energy and according to observations made in laboratory colonies there is a decline in fungus garden biomass during this time in the colony's lifecycle (BUENO et al., 2002), possibly due to increased cultivar consumption by reproductive ants (males and gynes). Thus, it's possible that some microbes, especially filamentous fungi, can escape from the ant's control during this period thus explaining why they were prevalent in this study.

6.6 Acknowledgements

We are grateful to the “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq – Proc. 301713/2005-7 and 479990/2006-9) and “Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo” (FAPESP – Proc. 50139/4-2007 and 08/00185-7) for financial support. We also like to thank Dr. Scott E. Solomon from The University of Texas at Austin for his valuable review of this manuscript and Dr. Luiz Carlos Forti from the Department of Vegetal Production, UNESP - São Paulo State University for providing the facilities during field collection.

Table 1. Number of gynes, isolation trials and isolates in nests of leaf-cutting ants

Year	Parameter	Ant Nest									Total
		<i>A. laevigata</i>			<i>A. capiguara</i> 1 [†]			<i>A. capiguara</i> 2			
		<u>E1</u>	<u>E2</u>	<u>P</u>	<u>E1</u>	<u>E2</u>	<u>P</u>	<u>E1</u>	<u>E2</u>	<u>P</u>	
2006	Gynes collected	84			45			18			147
	Isolation trials	84	23	84	45	-	43	18	-	-	297
	Yeast isolates	4	5	3	7	-	0	0	-	-	19
2007	Gynes collected	60			-			60			120
	Isolation trials	<u>60</u>	<u>50</u>	<u>30</u>	-	-	-	<u>60</u>	<u>50</u>	<u>30</u>	280
	Yeast isolates	2	0	0	-	-	-	1	0	0	3
	Filamentous fungus isolates	77	-	4	-	-	-	65	-	3	149

Filamentous fungi and yeasts isolated by: E1= gynes walked in culture medium for four hours; E2= gynes were immersed whole in liquid medium and, P= fungal pellet were dissected from gynes.

[†] This nest was not sampled in 2007 (see methods for details).

-: no data

Table 2. Yeast species isolated from leaf-cutting ants gynes prior to their mating flight. Unless otherwise indicated, isolation from the exoskeleton used the E1 method. Molecular identification was based on BLASTn results (at least 99 %-similarity) of rDNA D1/D2 regions of isolates regarding GenBank homologous sequences.

Isolate ID [†]	Nest	Body part	GenBank Best Hit (Accession #)
R01	<i>A. capiguara</i> 1	exoskeleton	<i>Aureobasidium pullulans</i> (nd)
R02	<i>A. capiguara</i> 1	exoskeleton	<i>Aureobasidium pullulans</i> (nd)
R03	<i>A. laevigata</i>	pellet	<i>Rhodotorula glutinis</i> (AF335985)
R04	<i>A. laevigata</i>	exoskeleton*	<i>Aureobasidium pullulans</i> (AY213693)
R05	<i>A. capiguara</i> 1	exoskeleton	<i>Cryptococcus laurentii</i> (AJ876597)
R06	<i>A. capiguara</i> 1	exoskeleton	<i>Cryptococcus laurentii</i> (nd)
R07	<i>A. capiguara</i> 1	exoskeleton	<i>Aureobasidium pullulans</i> (EU560881)
R08	<i>A. laevigata</i>	exoskeleton*	<i>Candida parapsilosis</i> (AY894827)
R09	<i>A. laevigata</i>	exoskeleton*	<i>Candida parapsilosis</i> (AY894827)
R10	<i>A. laevigata</i>	exoskeleton	<i>Aureobasidium pullulans</i> (AY213693)
R11	<i>A. laevigata</i>	exoskeleton	<i>Cryptococcus laurentii</i> (AJ876597)
R12	<i>A. laevigata</i>	exoskeleton	<i>Aureobasidium pullulans</i> (nd)
R13	<i>A. capiguara</i> 1	exoskeleton	<i>Cryptococcus laurentii</i> (EF068207)
R14	<i>A. laevigata</i>	exoskeleton*	<i>Candida parapsilosis</i> (AY894827)
R15	<i>A. capiguara</i>	exoskeleton	<i>Cryptococcus laurentii</i> (AJ876597)
R16	<i>A. laevigata</i>	exoskeleton	<i>Candida parapsilosis</i> (EF694608)
R17	<i>A. laevigata</i>	pellet	<i>Aureobasidium pullulans</i> (nd)
R18	<i>A. laevigata</i>	exoskeleton*	<i>Candida parapsilosis</i> (AJ749821)
R19	<i>A. laevigata</i>	pellet	<i>Cryptococcus laurentii</i> (nd)
R20	<i>A. laevigata</i>	exoskeleton	<i>Cryptococcus laurentii</i> (EU427437)
R21	<i>A. laevigata</i>	exoskeleton	<i>Cryptococcus laurentii</i> (EU427437)
R22	<i>A. capiguara</i> 2	exoskeleton	<i>Cryptococcus laurentii</i> (EU427437)

*: The E2 method was used for isolation of these strains.

nd: no molecular data; yeasts were identified only by phenotypic similarity.

†: yeasts strains R1 through R19 were isolated from the 2006 collection; the remaining isolates are from the 2007 collection

Table 3. Filamentous fungi isolated from gynes exoskeleton (by E1 method) and infrabuccal pellets of leaf-cutting ants prior to the mating flight in October, 2007.

Filamentous fungus species	Number of isolates (exoskeleton/pellet) [†]	
	<i>A. laevigata</i>	<i>A. capiguara</i>
<i>Absidia corymbifera</i>	0 / 0	1 / 0
<i>Aspergillus</i> spp.	1 / 0	0 / 0
<i>Chaetomium funicola</i>	0 / 1	0 / 0
<i>Cladosporium</i> spp.	50 / 0	56 / 0
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	4 / 3	0 / 3
<i>Cladosporium subtilissimum</i>	0 / 0	1 / 0
<i>Cladophialophora</i> sp.	1 / 0	0 / 0
<i>Cunninghamella echinulata</i>	0 / 0	1 / 0
<i>Fusarium</i> sp.	1 / 0	0 / 0
<i>Monilia</i> spp.	5 / 0	0 / 0
<i>Mucor</i> spp.	4 / 0	0 / 0
<i>Penicillium</i> spp.	3 / 0	3 / 0
<i>Trichoderma</i> spp.	7 / 0	1 / 0
not identified	1 / 0	2 / 0
Total	77 / 4	65 / 3

[†]: 60 gynes and 30 infrabuccal pellets were sampled from both *A. laevigata* and from *A. capiguara* ant species.

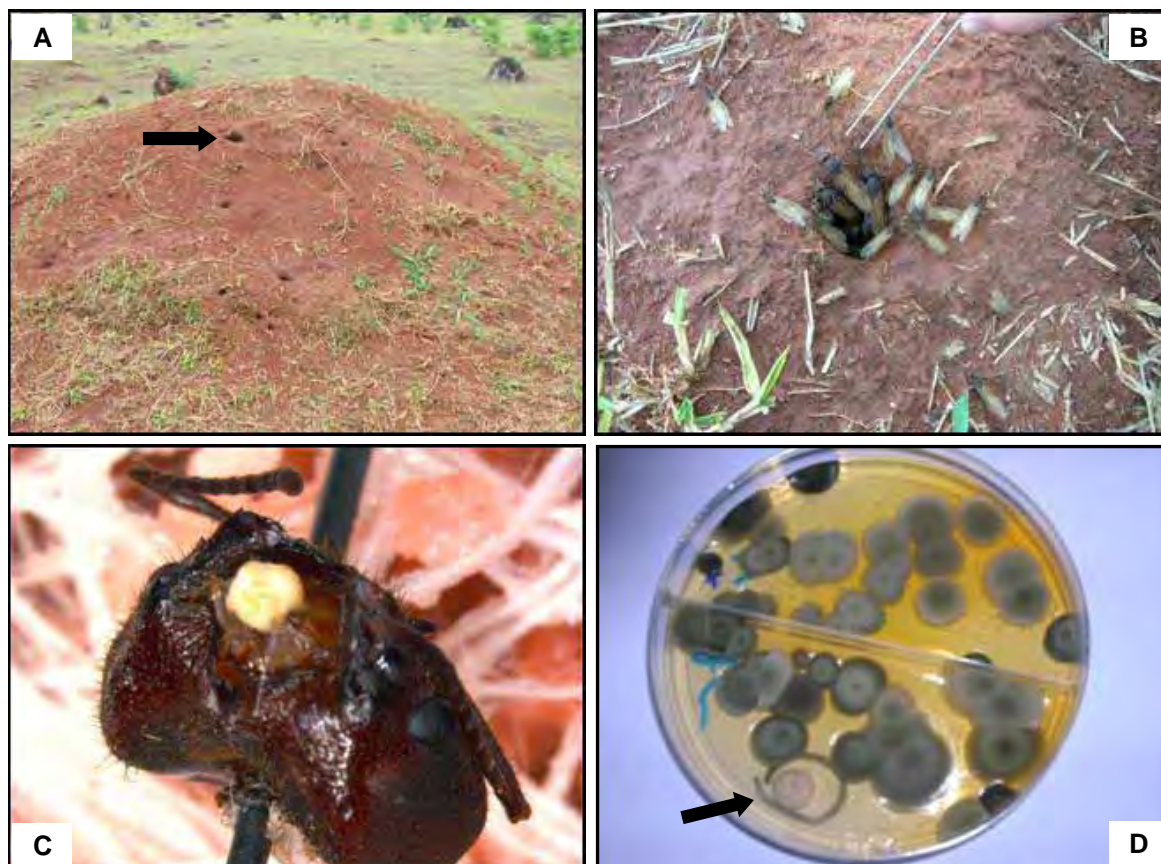


Figure 1. A: Collection site and nest mound of *Atta laevigata* indicating the enlarged openings (arrow) just before the beginning of the mating flight. B: The same nest showing gynes ready to leave the nest. C: Fungal pellet of *Atta capiguara*; D: Microfungi growing in yeast-malt extract medium isolated from gynes walking on plates (arrow indicates a single cream-coloured yeast colony).

7.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados apresentados, pode-se concluir que:

1. Os jardins de fungos das formigas Attini abrigam uma comunidade diversa de microfungos. Esses microfungos podem ser considerados transitórios nesse ambiente e, aparentemente, não estabelecem relações específicas com esses insetos.
2. Contudo, esses microorganismos podem atuar como antagonistas (“weeds”) do fungo cultivado, principalmente em situações onde existe um desequilíbrio na simbiose.
3. A origem dessa comunidade provavelmente está associada ao tipo e disponibilidade de substrato coletado pelas operárias que utilizam para cultivar o fungo simbiote. O solo também influencia na composição e na estrutura das comunidades de microfungos nos jardins.
4. Nossos dados sugerem que o parasita *Escovopsis* sp. é menos freqüente nas populações de formigas Attini da América do Sul em relação às populações de formigas da América Central; além disso, é possível que o parasita esteja ausente ou seja encontrado em freqüência muito baixa nas populações de formigas do hemisfério Norte. Estudos adicionais e sistemáticos devem se realizados para avaliar a epidemiologia desse parasita.
5. Por outro lado, foi encontrado que um grupo de *Escovopsis* sp. parasita exclusivamente formigas cortadeiras da região sul do Brasil, o que sugere uma certa distribuição geográfica desse parasita em relação ao seu hospedeiro. Amostragens adicionais e sistemáticas também são necessárias para confirmar essa hipótese.
6. Além de abrigar microfungos antagonistas, os jardins das formigas cortadeiras também abrigam uma comunidade diversa de leveduras e algumas apresentam efeito deletério contra *Escovopsis* sp.; sugerindo que as formigas podem utilizar de diversos mecanismos para protegerem seus ninhos, incluindo leveduras presentes na matriz do jardim e não apenas bactérias que vivem nas cutículas das operárias (*Pseudonocardia* spp.).

7. As associações de microfungos e formigas Attini são lábeis, ou seja, não são duradouras. Apesar de fêmeas aladas transportarem em suas cutículas uma grande diversidade de fungos filamentosos e poucas leveduras; a maioria desses microfungos é proveniente do ambiente ao redor dos ninhos.

8. No geral, esse trabalho demonstrou que as formigas Attini entram em contato com uma ampla gama de microrganismos, alguns deles benéficos, outros nem tanto. A exemplo dessa simbiose, o estudo mais profundo de outras interações inseto-microrganismo pode revelar a complexidade de tais sistemas, demonstrando que essas interações podem envolver uma comunidade microbiana associada. Portanto, o presente estudo pode ser generalizado, pois como os microrganismos são a forma de vida mais abundante no planeta, é de se esperar que alguns deles desempenhem uma função ou sejam apenas comensais na vida dos insetos. Enquanto essas novas associações aguardam descrição, a simbiose das formigas Attini continuará inspirando e servindo de modelo para o entendimento da vida em parceria.

8.

PERSPECTIVAS

1. Em vista dos vários microfungos antagonistas relacionados nesse trabalho, muito há que se estudar para desenvolver métodos alternativos de controle para as formigas cortadeiras. Assim, uma próxima etapa seria selecionar linhagens de microfungos que apresentem maior potencial antagonista contra o fungo simbiote *in vitro*. Em seguida, tais linhagens poderiam ser testadas isoladamente em colônias de formigas cortadeiras para verificar seus efeitos; ou aliar o potencial dessas linhagens a métodos de controle já estabelecidos, com o intuito de aperfeiçoar a eficiência desses métodos e diminuir os impactos que ocasionam no ambiente.
2. Pouco se sabe sobre o ciclo de vida do parasita *Escovopsis* sp. Nesse sentido, estudos que identifiquem o provável reservatório natural desse fungo, podem contribuir para o entendimento da biologia básica dessa espécie. Um dos locais de interesse para essa busca é o solo adjacente aos ninhos das formigas Attini. Fazendo-se o uso de técnicas clássicas e moleculares de estudo dos fungos, o estudo desse ambiente pode revelar importantes aspectos da simbiose das formigas cultivadoras de fungos.
3. Com o intuito de expandir o conhecimento sobre a diversidade microbiana associada aos ninhos das formigas Attini, métodos independentes de cultivo devem ser empregados para a caracterização de comunidades de fungos e bactérias nos jardins de fungos desses insetos.

9.***REFERÊNCIAS***

- ADAMS, R. M. M.; MUELLER, U. G.; HOLLOWAY, A. K.; GREEN, A. M.; NAROZNIAK, J. Garden sharing and garden stealing in fungus-growing ants. **Naturwissenschaften**, New York, v. 87, n. 11, p. 491-493, 2000.
- ADAMS, A. S.; SIX, D. L.; ADAMS, S. M.; HOLBEN, W. E. *In vitro* interactions between yeasts and bacteria and the fungal symbionts of the mountain pine beetle (*Dendroctonus ponderosae*). **Microbial Ecology**, Washington, v. 56, n. 3, p. 460-466, 2008.
- ALMEIDA, J. M. G. C. F. Yeast community survey in the Tagus estuary. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 53, n. 2, p. 295-303, 2005.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ANDRADE, A. P. P.; FORTI, L. C.; MOREIRA A. A.; BOARETTO, M. A. C.; RAMOS, V. M.; MATOS, C. A. O. Behavior of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers during the preparation of the leaf substrate for symbiont fungus culture. **Sociobiology**, Chico, v. 40, n. 2, p. 293-306, 2002.
- AUTUORI, M. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp. – Hymenoptera: Formicidae). I – Evolução do saueiro (*Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 12, p. 197-228, 1941.
- AUTUORI, M. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp. – Hymenoptera: Formicidae). II – Saueiro inicial (*Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 12, p. 197-228, 1942.
- AYRES, M.; AYRES, M. J. R.; AYRES, D. L.; DOS SANTOS, A. S. **BioEstat 5.0**. Belém: Imprensa Oficial do Estado do Pará, 2007. 323p.
- BA, A. S.; PHILLIPS, S. A. JR Yeast biota of the red imported fire ant. **Mycological Research**, Oxford, v. 100, n. 6, p. 740-746, 1996.

- BA, A. S.; PHILLIPS, S. A.; ANDERSON, J. T. Yeasts in the mound soil of the red imported fire ant. **Mycological Research**, Oxford, v. 104, n. 8, p. 969-973, 2000.
- BACCI, M. Jr.; RIBEIRO, S. B.; CASAROTTO, M. E. F.; PAGNOCCA, F. C. Biopolymer-degrading bacteria from nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 28, n. 1, p. 79-82, 1995.
- BANDEL, H.-J.; FOSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, Lawrence, v. 16, n. 1, p. 37-48, 1999.
- BARBOSA, V. S. **Efeito da fragmentação florestal na taxa de parasitismo de fungos associados ao jardim da formiga cortadeira *Atta laevigata***. 2004. 68 f. Dissertação (Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.
- BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. 2nd edn, Cambridge: Cambridge University Press, 2000.
- BARRON, G. L. **The Genera of Hyphomycetes from Soil**. New York: Robert E. Krieger Publishing Co., 1968. 364p.
- BASS, M.; CHERRETT, J. M. The role of leaf-cutting ant workers (Hymenoptera: Formicidae) in fungus garden maintenance. **Ecological Entomology**, Oxford, v. 19, n. 3, p. 215-220, 1994.
- BATRA, L. R. **Insect-Fungus Symbiosis: Nutrition, Mutualism and Commensalisms**. Montclair: Allanheld, Osmun & Co., 1979. 276p.
- BERKOV, A.; FEINSTEIN, J.; SMALL, J.; NKMAN, M.; CENTENO, P. Yeasts isolated from neotropical wood-boring beetles in SE Peru. **Biotropica**, Oxford, v. 39, n. 4, p. 530-538, 2007.

- BOEREMA, G. H.; GRUYTER, J.; NOORDELOOS, M. E.; HAMERS, M. E. C. **Phoma identification manual**. Cambridge: CABI Publishing, 2004. 470 p.
- BOT, A. N. M.; CURRIE, C. R.; HART, A. G.; BOOMSMA, J. J. Waste management in leaf-cutting ants. **Ethology, Ecology and Evolution**, Florence, v. 13, n. 3, p. 225-237, 2001a.
- BOT, A. N. M.; REHNER, S. A.; BOOMSMA, J. J. Partial incompatibility between ants and symbiotic fungi in two sympatric species of *Acromyrmex* leaf-cutting ants. **Evolution**, Lancaster, v. 55, n. 55, p. 1980-1991, 2001b.
- BOT, A. N. M.; ORTIUS-LECHNER, O.; FINSTER, K.; MAILE, R.; BOOMSMA, J. J. Variable sensitivity of fungi and bacteria to compounds produced by the metapleural glands of leaf-cutting ants. **Insectes Sociaux**, Paris, v. 49, n. 4, p. 363-370, 2002.
- BOURTZIS, K.; MILLER, T. A. **Insect Symbiosis**. v. 2, Newbury: CRC Press, 2006. 276p.
- BRANDÃO, C. R. F.; MAYHÉ-NUNES, A. J. A new fungus-growing ant genus, *Mycetagroicus* gen. n., with the description of three new species and comments on the monophyly of the Attini (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, Chico, v. 38, n. 3B, p. 639-665, 2002.
- BROWN, J. M.; LEMMON, A. R. The importance of data partitioning and the utility of Bayes factors in Bayesian phylogenetics. **Systematic Biology**, Philadelphia, v. 56, n. 4, p. 643-655, 2007.
- BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; SCHNEIDER, M. O.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI, M. JR. Occurrence of winged forms of *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) in laboratory colonies. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 469-473, 2002.
- CAFARO, M. J.; CURRIE, C. R. Phylogenetic analysis of mutualistic filamentous bacteria associated with fungus-growing ants. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 51, n. 6, p. 441-446, 2005.

- CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; BACCI, M. Jr.; HEBLING, M. J. A.; da SILVA, O. A. Yeasts associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 71, n. 3, p. 243-248, 1997.
- CARREIRO, S. C. **Pesquisa do fator Killer e análise da degradação de polissacarídeos vegetais por leveduras associadas aos ninhos de *Atta sexdens***. 2000. 153 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2000.
- CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI, M. JR; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; MIDDELHOVEN, W. J. Occurrence of killer yeasts in leaf-cutting ant nests. **Folia Microbiologica**, Praga, v. 47, n. 3, p. 259-262, 2002.
- CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI, M. JR; LACHANCE, M. A.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; RUIVO, C. C. C.; ROSA, C. A. *Sympodiomyces attinorum* sp. nov., a yeast species associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, n. 5, p. 1891-1894, 2004.
- CHAPELA, I. H.; REHNER, S. A.; SCHULTZ, T. R.; MUELLER, U. G. Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. **Science**, Washington, v. 266, n. 5191, p. 1691-1694, 1994.
- COELHO, A. R.; CELLI, M. G.; ONO, E. Y. S.; WOSIACKI, G.; HOFFMANN, F. L.; PAGNOCCA, F. C.; HIROOKA, E. Y. *Penicillium expansum* versus antagonist yeasts and patulin degradation *in vitro*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 4, p. 725-733, 2007.
- COOPER, C. R.; GINNIS, M. C. *In vitro* susceptibility of clinical yeast isolates to fluconazole and terconazole. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, New York, v. 175, n. 6, p. 1626-1631, 1996.

- CRAVEN, S. E. ; DIX, M. W. ; MICHAELS, G. E. Attine fungus gardens contains yeasts. **Science**, Washington, v. 169, n. 3941, p. 184-186, 1970.
- CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 96, n. 7, p. 7998-8002, 1999a.
- CURRIE, C. R.; SCOTT, J. A.; SUMMERBELL, R. C.; MALLOCH, D. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, London, v. 398, n. 6729, p. 701-704, 1999b.
- CURRIE, C. R. A community of ants, fungi and bacteria: A multilateral approach to studying symbiosis. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 55, s/n, p. 357-380, 2001a.
- CURRIE, C. R. Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. **Oecologia**, Berlin, v. 128, n. 1, p. 99-106, 2001b.
- CURRIE, C. R.; STUART, A. E. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. **Proceeding of the Royal Society of London. Serie B, Biological Sciences**, London, v. 268, n. 1471, p. 1033-1039, 2001.
- CURRIE, C. R. Ants, agriculture and antibiotics: A quadripartite symbiosis. In: SECKBACH, J. (ed.) **Symbiosis: mechanisms and model systems**. Dordrecht, Boston & London: Kluwer Academic Publisher, 2002. 796p.
- CURRIE, C. R.; BOT, A. N. M.; BOOMSMA, J. J. Experimental evidence of a tripartite mutualism: bacteria protect ant fungus gardens from specialized parasites. **Oikos**, Copenhagen, v. 101, n. 1, p. 91-102, 2003a.
- CURRIE, C. R.; SCOTT, J. A.; SUMMERBELL, R. C.; MALLOCH, D. Corrigendum: Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, London, v. 423, n. X, p. 461, 2003b.

- CURRIE, C. R.; WONG, B.; STUART, A. E.; SCHULTZ, T. R.; REHNER, S. A.; MUELLER, U. G.; SUNG, G. H.; SPATAFORA, J. W.; STRAUS, N. A. Ancient tripartite co-evolution in the attine ant–microbe symbiosis. **Science**, Washington, v. 299, n. 5605, p. 386–388, 2003c.
- DELLA LUCIA, T. M. C.; FOWLER, H. G. As formigas cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. **As formigas cortadeiras**. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 1993. p. 1-3.
- DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press, 1980. 2v.
- DRUZHININA, I.; KOPCHINSKIY, A. G.; KOMON, M.; BISSETT, J.; SZAKACS, G.; KUBICEK, C. P. **Fungal Genetics and Biology**, San Diego, v. 42, n. 10, p. 813–828, 2005.
- ELLIS, M. B. **Dematiaceous Hyphomycetes**. Kew: Commonwealth Micological Institute, 1971. 608 p.
- ELLIS, M. B. **More Dematiaceous Hyphomycetes**. Kew: Commonwealth Micological Institute, 1976. 507 p.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using de bootstrap. **Evolution**, Lawrence, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985.
- FERNÁNDEZ-MARÍN, H.; ZIMMERMAN, J. K.; REHNER, S.A.; WCISLO, W. T. Ecological traits and evolutionary sequence of nest establishment in fungus-growing ants (Hymenoptera, Formicidae, Attini). **Biological Journal of the Linnean Society**, Oxford, v. 81, n. 1, p. 39-48, 2004.
- FERNÁNDEZ-MARÍN, H.; ZIMMERMAN, J. K.; REHNER, S.A.; WCISLO, W. T. Active use of the metapleural glands by ants in controlling fungal infection. **Proceeding of the Royal Society of London, Series B**, London, v. 273, n.1594, p. 1689–1695, 2006.

- FISHER, P. J.; STRADLING, D. J.; SUTTON, B. C.; PETRINI, L. E. Microfungi in the fungus gardens of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*: a preliminary study. **Mycological Research**, Oxford, v. 100, n. 5, p. 541-546, 1996.
- FONSECA, A.; INÁCIO, J. Phylloplane yeasts. In: ROSA, C. A.; PÉTER, G. (Eds.) **The yeast handbook: biodiversity and ecophysiology of yeasts**. Berlin: Springer Verlag, 2006. pp 263-301.
- FOWLER, H. G. et al. Major ant problems of South America. In: VANDEER MEER, R. K.; JAFFE, K.; CEDENO, A. (ed.) **Applied Myrmecology: A world perspective**. Boulder, San Francisco & Oxford: Westview Press, 1990. p. 3-14.
- FUENTEFRIA, A. M.; SUH, S-O.; LANDELL, M. F.; FAGANELLO, J.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H.; BLACWELL, M.; VALENTE, P. *Trichosporon insectorum* sp. nov., a new anamorphic basidiomycetous killer yeast. **Mycological Research**, Oxford, v. 112, n. 1, p. 93-99, 2008
- GADANHO, M.; LIBKIND, D.; SAMPAIO, J. P. Yeast diversity in the extreme acidic environments of the Iberian pyrite belt. **Microbial Ecology**, Washington, v. 52, n. 3, p. 552-563, 2006.
- GAMS, W.; HOEKSTRA, E. S.; APTROOT, A. **CBS Course of Mycology**. 4th ed. Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1998. 165p.
- GANTER, P. F.; STARMER, W. T. Killer factor as a mechanism of interference competition in yeasts associated with cacti. **Ecology**, Washington, v. 73, n. 1, p. 54-67, 1992.
- GANTER, P. F. Yeasts and invertebrates associations. In: ROSA, C. A.; PÉTER, G. (Eds.) **The yeast handbook: biodiversity and ecophysiology of yeasts**. Berlin: Springer Verlag, 2006. pp 263-301
- GERARDO, N. M.; CURRIE, C. R.; PRICE, S. L.; MUELLER, U. G. Exploiting a mutualism: parasite specialization on cultivars within the fungus-growing ants

symbiosis. **Proceeding of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, London, p. 1791-1798, 2004.

GERARDO, N. M.; MUELLER, U. G.; CURRIE, C. R. Complex host-pathogen coevolution in the *Apterostigma* fungus-growing ant-microbe symbiosis. **BMC Evolutionary Biology**, London, v.6, s/n, p. 88, 2006a.

GERARDO, N. M.; JACOBS, S. R.; CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G. Ancient host-pathogen associations maintained by specificity of chemotaxis and antibiosis. **PLoS Biology**, California, v. 4, n. 8, e 235, 2006b. (doi:10.1371/journal.pbio.0040235).

GONÇALVES, C. R. O Gênero *Acromyrmex* no Brasil (Hym. Formicidae). **Studia Entomologica**, Petrópolis, v. 4, n. 1-4, p. 113-180, 1961.

GOTELLI, N. J.; ENTSMINGER, G. L. **EcoSim: Null models software for ecology**. Version 7, 2008 Acquired Intelligence Inc. & Kesey-Bear. Jericho, VT 05465. Disponível em: <http://garyentsminger.com/ecosim.htm>

GREEN, A. M.; MUELLER, U. G.; ADAMS, R. M. M. Extensive exchange of fungal cultivars between sympatric species of fungus-growing ants. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 191-195, 2002.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 41, s/n, p. 95-98, 1999.

HAMILTON, W. D.; AXELROD, R.; TANESE, R. Sexual reproduction as an adaptation to resist parasites (a review). **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 87, n. 9, p. 3566-3573, 1990.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The Ants**. Cambridge: Harvard University Press, 1990. 737p

- INÁCIO, J.; PEREIRA, P.; DE CARVALHO, M.; FONSECA, A.; AMARAL-COLLAÇO, M. T.; SPENCER-MARTINSI. Estimation and diversity of phylloplane mycobiota on selected plants in a Mediterranean-type ecosystem in Portugal. **Microbial Ecology**, Washington, v. 44, n. 4, p. 344-353, 2002.
- KIYAN, C.; CORSO, C. R.; PAGANO, S. N.; TAUKE, S. M.; ANGELIS, D. F.; SERZEDELLO, A. Isolamento de microorganismos de ninhos de formigas cortadeiras. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 564, 1969.
- KLICH, M. A. **Identification of Common *Aspergillus* Species**. Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. 116 p.
- KOCSUBE, S.; TOTH, M.; VAGVOLGYI, C.; DOCZI, I.; PESTI, M.; POCSI, I.; SZABO, J.; VARGA, J. Occurrence and genetic variability of *Candida parapsilosis* sensu lato in Hungary. **Journal of Medical Microbiology**, Reading, v. 56, n. 2, p. 190–195, 2007.
- KOST, C.; LAKATOS T.; BÖTTCHER, I.; ARENDHOLZ, W-R.; REDENBACH, M.; WIRTH, R. Non-specific association between filamentous bacteria and fungus-growing ants. **Naturwissenschaften**, New York, v. 94, n. 10, p. 821–828, 2007.
- KREISEL, H. Pilze aus pilzgärten von *Atta insularis* in Kuba. **Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie**, Berlin, v. 12, n. 8, p. 643-654, 1972.
- KURTZMAN, C. P.; FELL, J.W. **The yeasts: a taxonomic study**, 4th edn. Amsterdam: Elsevier, 1998.
- KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) rDNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 73, n. 4, p. 331-371, 1998.
- LACHANCE, M. A.; STARMER, W. T.; ROSA, C. A.; BOWLES, J. M.; BARKER, J. F. S. JANZEN, D. H. Biogeography of the yeasts of ephemeral flowers and their insects. **FEMS Yeast Research**, Oxford, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2001.

- LATHAM, B. P. Yeast community persistence in a spatially structured environment. **Microbial Ecology**, Washington, v. 36, n. 1, p. 60-65, 1998.
- LEE, J. S.; KO, K. S.; JUNG, H. S. Phylogenetic analysis of *Xylaria* based on nuclear ribosomal ITS1-5.8S-ITS2 sequences. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 187, n. 1, p. 89-93, 2000.
- LIGGIO, J.; LIGGIO, A. O. **Wild Orchids of Texas**. Austin: University of Texas Press, 1999.
- LITTLE, A. E. F.; MURAKAMI, T.; MUELLER, U. G.; CURRIE, C. R. Defending against parasites: fungus-growing ants combine specialized behaviours and microbial symbionts to protect their gardens. **Biology Letters**, London, v. 2, n. 1, p. 12-16, 2006
- LITTLE, A. E.; CURRIE, C. R. Symbiotic complexity: discovery of a fifth symbiont in the attine –microbe symbiosis. **Biology Letters**, London, v. 3, n. 5, p. 501-504, 2007.
- LITTLE, A. E. F.; CURRIE, C. R. Black yeast symbionts compromise the efficiency of antibiotic defenses in fungus-growing ants. **Ecology**, Washington, v. 89, n.5, p. 1216-1222, 2008.
- LIU, X. Y.; HUANG, H.; ZHENG, R. Y. Relationships within *Cunninghamella* based on sequence analysis of ITR rDNA. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 80, s/n, p. 77-95, 2001.
- LUCIANO, H. M.; DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M. E. Organismos associados a uma colônia de *Acromyrmex heyeri* (Hymenoptera: Formicidae) mantida em laboratório. **Acta Biologica Leopoldensia**, São Leopoldo, v. 17, n. 2, p. 47-56, 1995.
- MAGURRAN, A. E. **Measuring biological diversity**. Oxford: Blackwell Science Ltd., 2004. 256 p.
- MANKOWSKI, M. E.; MORRELL, J. J. Yeasts associated with the infrabuccal pocket and colonies of the carpenter ant *Camponotus vicinus*. **Mycologia**, Corvallis, v. 96, n. 2, p. 226-231, 2004.

- MAYHÉ-NUNES, A. J.; JAFFÉ, K. On the biogeography of Attini (Hymenoptera: Formicidae). **Ecotropicos**, Mérida, v. 11, n. 1, p. 45-54, 1998.
- MIDDELHOVEN, W. J.; FONSECA, A.; CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C. *Cryptococcus haglerorum*, sp. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast isolated from nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 83, n. 2, p. 167-174, 2003.
- MIKHEYEV, A. S.; MUELLER, U. G.; ABBOT, P. Cryptic sex and many-to-one coevolution in the fungus-growing ant symbiosis. **Proceeding of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 103, n. 28, 10702-10706, 2006.
- MIKHEYEV, A. S.; VO, T.; MUELLER, U. G. Phylogeography of post-Pleistocene population expansion in a fungus-gardening ant and its microbial mutualists. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 17, n. 20, p. 4480-4488, 2008.
- MINTZER, A. Foraging activity of the Mexican leafcutting ant *Atta mexicana* (F. Smith), in a Sonoran desert habitat (Hymenoptera: Formicidae). **Insectes Sociaux**, Paris, v. 26, n.4, p. 364-372, 1979.
- MÖLLER, A. Die Pilzgärten einiger südamerikanischer Ameisen. **Botanische Mitteilungen aus den Tropen**, Jena, v. 6, p. 1-127, 1893.
- MORAIS, P. B.; HAGLER, A. N.; ROSA, C. A.; MENDONCA-HAGLER, L. C. Yeasts associated with *Drosophila* in tropical forests of Rio de Janeiro, Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, n. 11, p. 1150-1155, 1992.
- MOSER, J. C. Mating activities of *Atta texana* (Hymenoptera: Formicidae). **Insectes Sociaux**, Basel, v. 14, n. 3, p. 295-312, 1967
- MUCHOVEJ, J. J.; DELLA LUCIA, T. M. C. *Escovopsis*, a new genus from leaf cutting ant nests to replace *Phialocladus* nomem invalidum. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 37, p. 191-195, 1990.

- MUELLER, U. G.; REHNER, S. A.; SCHULTZ, T. R. The evolution of agriculture in ants. **Science**, Washington, v. 281, n. 5385, p. 2034-2038, 1998.
- MUELLER, U. G.; SCHULTZ, T. R.; CURRIE, C. R.; ADAMS, R. M. M.; MALLOCH, D. The origin of the attine ant-fungus mutualism. **Quartely Review of Biology**, Chicago, v. 76, n. 2, p. 169-197, 2001.
- MUELLER, U. G. Ant versus fungus versus mutualism: ant-cultivar conflict and the deconstruction of the attine ant-fungus symbiosis. **American Naturalist**, Chicago, v. 160, suppl., p. S67-98, 2002.
- MUELLER, U. G.; GERARDO, N. Fungus-farming insects: Multiple origins and diverse evolutionary histories. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 24, p. 15247-15249, 2002.
- MUELLER, U. G.; GERARDO, N. M.; AANEN, D. K.; SIX, D. L.; SCHULTZ, T. R. The evolution of agriculture in insects. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, Palo Alto, v. 36, n. x, p. 563-595, 2005.
- MUELLER, U. G.; RABELING, C. A breakthrough innovation in animal evolution. **Proceeding of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 105, n.14, p. 5287-5288, 2008.
- MUELLER, U. G.; DASH, D.; RABELING, C.; RODRIGUES, A. Coevolution between attine ants and actinomycete bacteria: a reevaluation. **Evolution**, Lawrence, v. 62, n. 11, p. 2894-2912, 2008.
- MUNKACSI, A. B.; OAN, J. J.; VILLESSEN, P.; MUELLER, U. G.; BLACWELL, M.; McLAUGHLIN, D. J. Convergent evolution in the domestication of coral mushrooms by fungus-growing ants. **Proceeding of the Royal society of London, Series B**, London, v. 271, n. 1550, p. 1777-1782, 2004.

- MURAKAMI, T.; HIGASHI, S. Social organization in two primitive attine ants, *Cyphomyrmex rimosus* and *Myrmicocrypta ednaella*, with reference to their fungus substrates and food sources. **Journal of Ethology**, Kyoto, v. 15, n. 1, p. 17-25, 1997.
- NELSON, P. E., TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. O. ***Fusarium* species: an illustrated manual for identification**. University Park: Pennsylvania State University Press, 1983. 193 p.
- NGUYEN, N. H.; SUH, S-O.; MARSHALL, C. J.; BLACKWELL, M. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. **Mycological Research**, Oxford, v. 110, n. 10, p. 1232-1241, 2006.
- O'DONNELL, K. *Fusarium* and its near relatives. In: REYNOLDS, D. R.; TAYLOR, J. W. (Eds.) **The fungal holomorph: mitotic and pleomorphic speciation in fungal systematics**. Wallingford: CAB International, 1993, pp 225-233.
- O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 7, n. 1, p. 103-116, 1998.
- PAGNOCCA, F. C.; CARREIRO, S. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J.; DA SILVA, O. A. Microbiological changes in the nests of leaf-cutting ants fed on sesame leaves. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 120, n. 5, p. 317-320, 1996.
- PAGNOCCA, F. C.; BACCI, M. JR; FUNGARO, M. H.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; SANT'ANNA, A.; CAPELARI, M. RAPD analysis of the sexual state and sterile mycelium of the fungus cultivated by the leaf-cutting ant *Acromyrmex hispidus fallax*. **Mycological Research**, Oxford, v. 105, n. 2, p. 173-176, 2001.
- PAGNOCCA, F. C.; RODRIGUES, A.; NAGAMOTO, N. S.; BACCI, M. JR Yeasts and filamentous fungi carried by the gynes of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 94, n. 4, p. 517-526, 2008. (Capítulo 4)

- PETERSSON, S.; SCHNÜRER, J. Biocontrol of mold growth in high-moisture wheat stored under airtight conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii*, and *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 3, p. 1027-1032, 1995.
- PHAFF, J.; STARMER, W. T. Yeast associated with plants, soil and insects. In: ROSE, A. H.; HARRINSON, J. S. (Eds.) **The yeast: biology of yeast**. London: Academic Press, 1987. pp. 123-180.
- PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species**. 2nd ed. North Ryde: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, 1988. 184 p.
- POULSEN, M.; BOT, A. N. M.; CURRIE, C. R.; NIELSEN, M. G.; BOOMSMA, J. J. Within-colony transmission and the cost of a mutualistic bacterium in the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus*. **Functional Ecology**, Oxford, v. 17, n. 2, p. 260-269, 2003a.
- POULSEN, M.; BOOMSMA, J. Mutualistic fungi control crop diversity in fungus-growing ants. **Science**, Washington, v. 307, n.5710, p. 741-744, 2005.
- POULSEN, M.; CAFARO, M.; BOOMSMA, J. J.; CURRIE, C. R. Specificity of the mutualistic association between actinomycete bacteria and two sympatric species of *Acromyrmex* leaf-cutting ants. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, n. 11, p. 3597-3604, 2005.
- POULSEN, M.; CURRIE, C. R. Complexity of insect-fungal associations: exploring the influence of microorganisms on attine ant-fungus symbiosis. In: BOURTZIS, K.; MILLER, T. A. (Eds.) **Insect Symbiosis**, v. 2, Newbury: CRC Press, 2006. pp 57-77
- POULSEN, M.; ERHARDT, D. P.; MOLINARO, D. J.; LIN, T. L.; CURRIE, C. R. Antagonistic bacterial interactions helps shape host-symbiont dynamics within fungus-growing ant-microbe mutualism. **PLoS one**, California, v. 2, n. 9, e 960, 2007 (doi:10.1371/journal.pone.0000960).

- QUINLAN, R. J.; CHERRETT, J. M. Studies on the role of the infrabuccal pocket of the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hym., Formicidae). **Insectes Sociaux**, Basel, v. 25, n. 3, p. 237-245, 1978.
- RABELING, C.; COVER, S. P.; JOHNSON, R. A.; MUELLER, U. G. A review of the North American species of the fungus-gardening ant genus *Trachymyrmex* (Hymenoptera: Formicidae). **Zootaxa**, Auckland, v. 1664, p. 1-53, 2007.
- REYNOLDS, H. T.; CURRIE, C. R. Pathogenicity of *Escovopsis weberi*: The parasite of the attine-microbe symbiosis directly consumes the ant-cultivated fungus. **Mycologia**, Lawrence, v. 96, n. 5, p. 955-959, 2004.
- RICHARD, F.-J.; MORA, P.; ERRARD, C.; ROULAND, C. Digestive capabilities of leaf-cutting ants and the contribution of their fungal cultivar to the degradation of plant material. **Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology**, New York, v. 175, n. 5, p. 297-303, 2005.
- RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI, M. Jr.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PENNING, L. H. Variability of non-mutualistic fungi associated with *Atta sexdens ubropilosa* nests. **Folia Microbiologica**, Prague, v. 50, n. 5, p. 421-425, 2005a.
- RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; PFENNING, L. H.; BACCI, M. JR. Assessment of microfungi in fungus gardens free of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, Chico, v. 46, n. 2, p. 329-334, 2005b.
- RODRIGUES, A.; BACCI, M. Jr.; MUELLER, U. G.; ORTIZ, A.; PAGNOCCA, F. C. Microfungal “weeds” in the leafcutter ant symbiosis. **Microbial Ecology**, Washington, v.56, n. 4, p. 604-614, 2008a. (Capítulo 1)
- RODRIGUES, A.; CARLETTI, C. D.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C. Leaf-cutting ant faecal fluid and mandibular gland secretion: effects on microfungi spore germination. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 64-67, 2008b.

- RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, Oxford, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.
- ROSA, C. A.; MORAIS, P. B.; SANTOS, S. R.; NETO, P. R. P.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; HAGLER, A. N. Yeast communities associated with different plant resources in sandy coastal plains of south eastern Brazil. **Mycological Research**, Oxford, v. 99, n. 9, p. 1047–1054, 1995.
- ROSA, C. A.; LACHANCE, M-A.; SILVA, J. O. C.; TEIXEIRA, A. C. P.; MARINI, M. M.; ANTONINI, Y.; MARTINS, R. P. Yeast communities associated with stingless bees. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 4, n. 3, p. 271-275, 2003.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**, 3rd edn, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 999p
- SAMSON, R. A. Revision of the genus *Cunninghamella* (Fungi, Mucorales). **Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie Van Wetenschappen Series C-Biological and Medical Sciences**, Amsterdam, v. 72, n. 3, p. 322-335, 1969.
- SAMSON, R. A.; EVANS, H. C.; LATGE, J. P. **Atlas of entomopathogenic fungi**. Utrecht: Springer-Verlag, 1988. 187 p.
- SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C. **Introduction to food-airborne fungi**. 6th ed., Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000. 389 p.
- SANTOS, A. V.; DILLON, R. J.; DILLON, V. M.; REYNOLDS, S. E.; SAMUELS, R. I. Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 239, n.2, p. 319-323, 2004.
- SEAL, J. N.; TSCHINKEL, W. R. Food limitation in the fungus-gardening ant, *Trachymyrmex septentrionalis*. **Ecological Entomology**, Oxford, v. 33, n. 5, p. 597-607, 2008

- SCHUBERT, K.; GROENEWALD, J. Z.; BRAUN, U.; DIJKSTERHUIS, J.; STARIN, K. M.; HILL, C. F.; ZALAR, P.; DE HOOG, G. S.; CROUS, P. W. Biodiversity in the *Cladosporium herbarum* complex (*Davidiellaceae*, *Capnodiales*), with standardisation of methods for *Cladosporium* taxonomy and diagnostics. **Studies in Mycology**, Baarn, v. 58, n. 58, p. 105-156, 2007.
- SCHULTZ, T. R.; MEIER, R. A phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. **Systematic Entomology**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 337–370, 1995.
- SCHULTZ, T. R.; MUELLER, U. G.; CURRIE, C. R.; REHNER, S. A. Reciprocal illumination: a comparison of agriculture in humans and in fungus-growing ants. In: VEGA, F. E.; BLACKWELL, M. (eds.) **Insect-fungal associations: ecology and evolution**. New York: Oxford University Press, 2005. 333 p.
- SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, n. 14, p. 5435-54401, 2008.
- SEIFERT, K. A.; SAMSON, R. A.; CHAPELA, I. H. *Escovopsis aspergilloides*, a rediscovered hyphomycete from leaf-cutting ant nests. **Mycologia**, Bronx, v. 87, n. 3, p. 407-413, 1995.
- SILVA, A.; BACCI, M. Jr.; SIQUEIRA, C. G.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 49, n. 4, p. 307-313, 2003.
- SILVA, A.; RODRIGUES, A.; BACCI, M. Jr.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C. Susceptibility of ant-cultivated fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales: Basidiomycota) towards microfungi. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 132, n. 2, p. 115-119, 2006a.
- SILVA, A.; BACCI, M. JR.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. Production of polysaccharidases in different carbon sources by *Leucoagaricus*

gongylophorus Möller (Singer), the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* Linneus. **Current Microbiology**, New York, v. 53, n. 1, p. 68-71, 2006b.

SILVA, A.; BACCI, M. JR; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. Starch metabolism in *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. **Microbiological Research**, Jena, v. 161, n. 4, p. 299-303, 2006c.

SILVA-PINHATI, A. C. O.; BACCI, M.; HINKLE, G.; SOGIN, M. L.; PAGNOCCA, F. C.; MARTINS, V. G.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. Low variation in ribosomal DNA and internal transcribed spacers of the symbiotic fungi of leaf-cutting ants (Attini: Formicidae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto v. 37, n. 10, p. 1463-1472, 2004.

SINGER, R. **The Agaricales in modern taxonomy**. 4th ed. Koeltz Scientific Books: Germany, 1986. 981 p.

SIX, D. L.; KLEPZIG, K. D. *Dendroctonus* bark beetles as model systems for studies on symbiosis. **Symbiosis**, Rehovot, v. 37, n. 1-3, p. 207–232, 2004.

SKOVGAARD, K.; NIRENBERG, H. I.; O'DONNELL, K.; ROSENDAHL, S. Evolution of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* races inferred from multigene genealogies. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 91, n. 12, p. 1231-1237, 2001.

SLAVIKOVÁ, E.; VADKERTIOVÁ, R. The occurrence of yeasts in the forest soils. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 40, n. 3, p. 207-212, 2000.

SOLOMON, S. E.; BACCI, M. Jr.; MARTINS, J. Jr.; VINHA, G. G.; MUELLER, U. G. Paleodistributions and comparative molecular phylogeography of leaf-cutter ants (*Atta* sp.) provide new insight into the origins of amazonian diversity. **PLoS One**, California, v. 3, n.7, e. 2738, 2008. (doi:10.1371/journal.pone.0002738).

STARMER, W. T.; GANTER, P. F.; ABERDEEN, V.; LACHANCE, M. A.; PHAFF, H. J. The ecological role of killer yeasts in natural communities of yeasts. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 33, n. 9, p. 783-796, 1987.

- STARMER, W. T.; SCHMEDICKE, R. A.; LACHANCE, M-A. The origin of the cactus-yeast community. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 3, n. 4, p. 441-448, 2003.
- STOW, A.; BEATTIE, A. Chemical and genetic defenses against disease in insect societies. **Brain, Behavior and Immunity**, Orlando, v. 22, n. 7, p. 1009-1013, 2008.
- SUBRAMANIAN, C. V. **Hyphomycetes: an account of Indian species, except Cercosporae**. New Delhi: Indian Council of Agricultural Research, 1971. 930 p.
- SUGIYAMA, J.; TOKUOKA, K.; SUH, S-O.; HIRATA, A.; KOMAGATA, K. *Sympodiomyopsis*: a new yeast-like anamorph genus with basidiomycetous nature from orchid nectar. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 59, n. X, p. 95-108, 1991.
- SUH, S-O.; MCHUGH, J. V.; POLLOCK, D. D.; BLACKWELL, M. The beetle gut: a hyperdiverse source of novel yeasts. **Mycological Research**, Oxford, v. 109, n. 3, p. 261-265, 2005.
- SUH, S-O.; NGUYEN, N. H.; BLACKWELL, M. Yeasts isolated from plant-associated beetles and other insects: seven novel *Candida* species near *Candida albicans*. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 8, n. 1, p. 88-102, 2008.
- SUN, B-D.; LIU, X-Z. Occurrence and diversity of insect-associated fungi in natural soils in China. **Applied Soil and Ecology**, Amsterdam, v. 39, n. 1, p. 100-108, 2008.
- SWOFFORD, D. L. **PAUP^{*}: Phylogenetic analysis using parsimony (*: and other methods)**. Version 4. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.
- TAERUM, S. J.; CAFARO, M. J.; LITTLE, A. E. F.; SCHULTZ, T. R.; CURRIE, C. R. Low host-pathogen specificity in the leaf-cutting ant-microbe symbiosis. **Proceeding of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, London, v. 274, n. 1621, p. 1971-1978, 2007.

- TAUK, S. M.; SERZEDELLO, A. Isolation of bacteria living in gardens of *Atta laevigata*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 2, p. 295-300, 1975.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J.; CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, n.2, p. 4673-4680, 1994.
- VAN BORM, S.; BILLEN, J.; BOOMSMA, J. J. The diversity of microorganisms associated with *Acromyrmex* leafcutter ants. **BMC Evolutionary Biology**, v. 2, n. 9, p. 2002. (doi:10.1186/1471-2148-2-9).
- VEGA, F. E.; DOWD, P. F. The role of yeasts as insect endosymbionts. In: VEGA, F. E.; BLACKWELL, M. (Eds.) **Insect-fungal associations: ecology and evolution**. New York: Oxford University Press, 2005. pp. 211-243.
- VILLENSEN, P.; MUELLER, U. G.; SCHULTZ, T. R.; ADAMS, R. M. M.; BOUCK, A. C. Evolution of ant-cultivar specialization and cultivar switching in *Apterostigma* fungus-growing ants. **Evolution**, Lawrence, v. 58, n. 10, p. 2252-2265, 2004.
- WALKER, G. M.; MCLEOD, A. H.; HODGSON, V. J. Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 127, n. 3, p. 213-222, 1995.
- WEBER, N. A. Pure cultures of fungi produced by ants. **Science**, Washington, v. 121, n. 3134, p. 109, 1955.
- WEBER, N. A. Fungus growing ants and their fungi: *Trachymyrmex septentrionalis*. **Ecology**, Washington, v. 37, n. 1, p. 150-161, 1956.
- WEBER, N. A. **Fungus-growing ants**. **Science**, Washington, v. 153, n. 3763, p. 587-604, 1966.

- WEBER, N. A. **Gardening ants: The Attines**. Philadelphia: American Philosophical Society, v. 92, 1972. 146 p.
- WETTERER, J. K.; SCHULTZ, T. R.; MEIER, R. Phylogeny of fungus-growing ants (Tribe Attini) based on mtDNA sequence and morphology. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 9, n. 1, p. 42-47, 1998.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. 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**. New York: Academic Press, 1990. p. 315-322.
- YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. (Eds.) **The yeasts: a taxonomic study**, 4th edn. Amsterdam: Elsevier, 1998. pp 77-100
- YOUNGSTEADT, E. All that makes fungus gardens grow. **Science**, Washington, v. 320, n. 5879, p. 1006-1007, 2008.
- ZARE, R.; GAMS, W. A revision of *Verticillium* section *Prostata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. **Nova Hedwigia**, Stuttgart, v. 73, n. 1-2, p. 1-50, 2001.
- ZHANG, M. M.; POULSEN, M.; CURRIE, C. R. Symbiont recognition of mutualistic bacteria by *Acromyrmex* leaf-cutting ants. **The ISME Journal**, New York, v. 1, n. 4, p. 313-320, 2007.
- ZWICKL, D. J. **Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion**. 2006. Tese – The University of Texas at Austin, Texas 2006.
- ZYCHA, H. **Mucorineae**. Weinheim: Verlag von J. Cramer, 1935. 264 p.

10.
ANEXO



1

Escavação



2

Jardim de fungos



3

Coleta dos jardins



4

Amostra pronta para análise

Esquema geral de escavação dos ninhos. 1) Abertura de trincheira lateral às câmaras de fungos; 2) Exposição das câmaras com os jardins de fungos; 3) Coleta dos jardins de fungos (com pinça e materiais estéreis) e 4) Armazenagem de fragmento de jardim de fungo em recipiente estéril (amostra levada ao laboratório num período máximo de 5-8 horas após coleta).