

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 22/02/2021.

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

RODOLFO BIZARRIA JÚNIOR

LACK OF HOST FIDELITY AND LOW VIRULENCE OF THE
FILAMENTOUS FUNGUS *Escovopsis trichodermoides*

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Março – 2019

RODOLFO BIZARRIA JÚNIOR

**LACK OF HOST FIDELITY AND LOW VIRULENCE OF THE
FILAMENTOUS FUNGUS *Escovopsis trichodermoides***

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Orientador: Prof. Dr. André Rodrigues

Rio Claro - SP

Março – 2019

B6251 Bizarria Júnior, Rodolfo
 Lack of host fidelity and low virulence of the
 filamentous fungus *Escovopsis trichodermoides* / Rodolfo
 Bizarria Júnior. -- Rio Claro, 2019
 62 f. : il., tabs., fotos

 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
 (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
 Orientador: André Rodrigues

 1. Simbiose. 2. Fungos. 3. Micologia. 4. Fungicultura.
 5. Formigas cultivadoras de fungos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do
Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

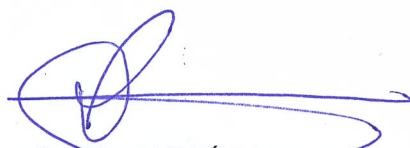
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: LACK OF HOST PREFERENCE AND LOW INFECTION OF THE
FILAMENTOUS FUNGUS *Escovopsis trichodermoides*

AUTOR: RODOLFO BIZARRIA JÚNIOR

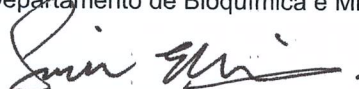
ORIENTADOR: ANDRÉ RODRIGUES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA), área: Microbiologia Aplicada pela Comissão Examinadora:



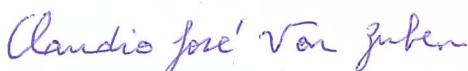
Prof. Dr. ANDRÉ RODRIGUES

Departamento de Bioquímica e Microbiologia / UNESP - Instituto de Biociências de Rio Claro - SP



Prof. Dr. SIMON LUKE ELLIOT

Departamento de Entomologia / Universidade Federal de Viçosa



Prof. Dr. CLAUDIO JOSÉ VON ZUBEN

Departamento de Zoologia / UNESP - Instituto de Biociências de Rio Claro - SP

Rio Claro, 22 de fevereiro de 2019

Título alterado para: "Lack of host fidelity and low virulence of the filamentous fungus
Escovopsis trichodermoides"

*Dedico esse trabalho aos meus professores,
fontes de inspiração.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Primeiramente ao Prof. Dr. André Rodrigues, pela orientação, dedicação, compromisso, paciência, pela confiança que dispôs em meu trabalho e por todos os ensinamentos que contribuíram grandemente para a minha formação como cientista.

Ao Departamento de Bioquímica e Microbiologia e ao Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF), pela estrutura concedida para o desenvolvimento do projeto.

Aos professores e funcionários da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – Câmpus de Rio Claro, do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada) e do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, pelo acolhimento e dedicação.

Aos amigos do LESF e do programa, pela ajuda e pelos momentos vivenciados durante o mestrado. Aos amigos da vida e aos meus familiares que me acompanharam e incentivaram ao longo dessa jornada. A minha companheira, Ariane, que sempre esteve ao meu lado, nos bons e maus momentos.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de mestrado (processo nº 2017/10631-9) e pelo auxílio financeiro concedido ao LESF (Processo nº 2017/12689-4) para o desenvolvimento desse estudo. O presente trabalho também foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“I've seen things you people wouldn't believe. Attack ships on fire off the shoulder of Orion. I watched C-beams glitter in the dark near the Tannhäuser Gate. All those moments will be lost in time, like tears in rain. Time to die”
Roy Batty, replicant (Blade Runner)

RESUMO

Uma das associações simbióticas fascinantes na natureza é o mutualismo entre as formigas da tribo Attini (atíneas) e fungos que cultivam como alimento. Fungos do gênero *Escovopsis* são considerados parasitas dos fungos cultivados por esses insetos. Tais parasitas são especializados a determinados fungos das formigas, embora eventuais trocas de hospedeiros ocorreram durante a evolução. Recentemente, nosso grupo de pesquisa descreveu o fungo *Escovopsis trichodermoides* em colônias de atíneas basais. Entretanto, a especificidade e infectividade frente aos fungos cultivados por esses insetos ainda não foram abordados. Evidências provenientes de ensaios *in vitro* e em colônias sugerem um padrão generalista de infecção de *E. trichodermoides*, com ausência de fidelidade frente a diferentes fungos mutualistas. A produção de metabólitos inibitórios está envolvida no antagonismo de *E. trichodermoides*, caracterizando a competição por interferência como mecanismo frente aos diferentes hospedeiros. Além disso, foi observada baixa suscetibilidade de colônias de *Mycocepurus goeldii* (uma atínea basal) à infecção de *E. trichodermoides*, com alta porcentagem de sobrevivência. No geral, os resultados confirmam o antagonismo de *E. trichodermoides*, entretanto, com baixa virulência e ausência de fidelidade frente a diferentes cultivares, padrão ainda não observado na fungicultura das formigas atíneas.

Palavras-chave: Fungicultura. Antibiose. Antagonismo. Formigas cultivadoras de fungos. Simbiose.

ABSTRACT

A fascinating symbiotic association in nature is the mutualism between ants in the tribe Attini (attine) and fungi they cultivate for food. Fungi in the genus *Escovopsis* are parasites of the ant fungal cultivars. Such parasites are specialized to certain fungal cultivars, although host-switching events occurred during the evolution of this parasite. Recently, our research group described *E. trichodermoides* associated with lower attine ant colonies. However, the specificity and infectivity towards the ant fungal cultivars are still elusive. Evidence from *in vitro* assays as well as experiments in live ant colonies indicates a generalist pattern of infection of *E. trichodermoides*, with lack of host fidelity. The production of inhibitory metabolites is implicated in the antagonism of *E. trichodermoides*, characterizing interference competition as a mechanism towards the different hosts. In addition, colonies of the ant species *Mycocepurus goeldii* (a lower attine ant) showed high survival rates after exposure to conidia of *E. trichodermoides*. Collectively, our results confirm the antagonism of *E. trichodermoides*, with low virulence and absence of fidelity towards different fungal cultivars, a pattern first reported in the fungiculture of attine ants.

Keywords: Fungiculture. Antibiosis. Antagonism. Fungus-growing ants. Symbiosis.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	9
LACK OF HOST FIDELITY AND LOW VIRULENCE OF THE FILAMENTOUS FUNGUS <i>ESCOVOPSIS TRICHODERMOIDES</i>	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUCTION	12
2. MATERIAL AND METHODS	14
2.1. Preservation and maintenance of fungal cultures	14
2.2. Molecular characterization of cultivars.....	14
2.3. Pairwise culture assays.....	15
2.4. Bioassays with multiple host possibilities.....	16
2.5. Production of soluble antifungal metabolites.....	16
2.6. Assays in live colonies of <i>Mycocephurus goeldii</i>	17
2.7. Statistical analysis	18
3. RESULTS	20
3.1. Inhibition of different hosts by <i>Escovopsis trichodermoides</i>	20
3.2. Lack of host fidelity by <i>Escovopsis trichodermoides</i>	20
3.3. Interference competition by <i>Escovopsis trichodermoides</i>	21
3.4. Low virulence of <i>Escovopsis trichodermoides</i> in ant colonies	21
4. DISCUSSION	22
5. ACKNOWLEDGEMENTS	24
6. CONFLICT OF INTEREST	24
7. REFERENCES	25
Tables	29
Figures.....	31
8. SUPPLEMENTARY MATERIAL	37

INTRODUÇÃO

Simbiose pode ser definida como uma estreita interação entre organismos, tendo como resultado associações benéficas ou não. Associações entre plantas e endófitos, leguminosas e bactérias fixadoras de nitrogênio, algas e fungos formando líquens são alguns exemplos de tais interações. Uma simbiose fascinante é o mutualismo obrigatório entre formigas da subtribo *Attina*¹ e fungos basidiomicetos (ordem Agaricales, gêneros *Leucocoprinus* e *Leucoagaricus*), originado há cerca de 50 milhões de anos. Esses insetos cultivam o parceiro fúngico como única fonte de alimento para as larvas e a rainha; em contrapartida, a formiga providencia: substrato para o crescimento do fungo, meios para sua dispersão e proteção contra antagonistas.

Diferentes tipos de fungicultura são praticados pelas atíneas e são definidos pelo fungo associado e pelos hábitos de forrageamento das formigas. Cinco fungiculturas são descritas, sendo: (i) fungicultura das atíneas basais (i.e. na filogenia da subtribo), que cultivam diferentes espécies de fungos do gênero *Leucocoprinus* sp. (família Agaricaceae), e forrageiam detritos vegetais, fezes e carcaças de insetos para nutrição do simbiote; (ii) Fungicultura de fungos-coral, realizado por formigas do gênero *Apterostigma* que cultivam fungos da família Pterulaceae; (iii) Fungicultura praticada por formigas do gênero *Cyphomyrmex* gr. *rimosus*, que cultivam o fungo em forma de levedura; (iv) Fungicultura das atíneas derivadas (i.e. formigas mais derivadas na filogenia), praticada pelos gêneros *Trachymyrmex* e *Sericomyrmex*, consideradas não cortadeiras de folhas; e (v) Fungicultura das formigas cortadeiras, uma subdivisão das derivadas (gêneros *Atta* e *Acromyrmex*) que cultivam o fungo *Leucoagaricus gongylophorus* e cortam folhas e flores frescas para nutrição do fungo.

Nessa relação, outro simbiote descrito é o fungo do gênero *Escovopsis*, considerado micoparasita que infecta os jardins de fungo² e que potencialmente pode devastar as colônias das formigas atíneas. Esse parasita apresenta adaptações que o auxiliam sobrepujar as defesas do fungo cultivado e das próprias formigas. Encontrado unicamente associado às colônias desses insetos, *Escovopsis* causa diminuição do crescimento do jardim, o qual não acumula biomassa fúngica para suprir a colônia. Os mecanismos do parasitismo estão associados à produção de enzimas, reconhecimento de metabólitos produzidos pelo fungo mutualista e de mecanismos estruturais, com degeneração das hifas do hospedeiro pelo contato direto com hifas de *Escovopsis*. Apesar dos estudos que sugeriram tais mecanismos, ainda não está claro como *Escovopsis* parasita o fungo cultivado pelas formigas.

¹ **Formigas da subtribo *Attina*.** Conhecidas também como “atíneas”, são informalmente divididas em derivadas e basais, segundo características morfológicas, ecológicas, filogenia e fungicultura.

² **Jardim de fungo.** Estrutura elaborada pelas formigas que compreende o fungo mutualista e o substrato (vegetal ou restos e fezes de insetos) coletado pelas operárias.

A co-evolução entre o parasita e o hospedeiro pode resultar em co-cladogênese e especialização dos simbioses. Nesse contexto, há superação das defesas do hospedeiro pelo parasita e a intensificação dos mecanismos defensivos pelo hospedeiro, responsáveis por manter os padrões de especificidade da interação, fenômeno previsto pela hipótese evolutiva da Rainha Vermelha (*Red Queen hypothesis*). Existem linhagens de *Escovopsis* que apresentam padrões de especificidade para com os tipos de fungiculturas praticados pelas atíneas. Entretanto, alguns estudos indicam incongruências na co-cladogênese entre *Escovopsis* e o fungo mutualista. Eventos de troca de hospedeiro por *Escovopsis* foram relatados, os quais podem estar associados às incongruências observadas.

O requerimento para que haja troca de hospedeiro na natureza, é que um parasita seja capaz de superar as defesas do novo hospedeiro e estabelecer com sucesso a infecção. Parasitas com arsenal diverso para infecção e mecanismos eficientes de transmissão possuem vantagem na infecção de hospedeiros diferentes. Entretanto, a diversidade de espécies de *Escovopsis* é ainda desconhecida, assim como seus modos de transmissão entre colônias. Nosso grupo de pesquisa descreveu *Escovopsis trichodermoides*, um fungo associado à colônias de diferentes espécies de atíneas basais. O estilo de vida desse fungo, bem como aspectos de sua infectividade e preferência de hospedeiros ainda são desconhecidos.

Baseado no papel descrito para espécies conhecidas de *Escovopsis* que infectam jardins de formigas atíneas derivadas e basais, o estudo teve como objetivo: (i) Descrever os padrões de interação de *E. trichodermoides* frente a diferentes fungos mutualistas; (ii) Descrever os padrões de preferência e fidelidade do fungo frente aos hospedeiros; (iii) Determinar se a infecção está associada a mecanismos químicos de ação e (iv) Determinar a infectividade de *E. trichodermoides*.

Para atingir os objetivos, ensaios de cultivo pareado entre *E. trichodermoides* e diferentes fungos mutualistas foram realizados, assim como ensaios com chance de escolha de hospedeiros. Também foi avaliada a interação entre os fungos mutualistas e os metabólitos produzidos por *E. trichodermoides*. Colônias da formiga atínea basal *Mycocepurus goeldii* foram coletadas e utilizadas como modelo de estudo para avaliar a infectividade de *E. trichodermoides*.

Ainda existem lacunas sobre a evolução do parasitismo em *Escovopsis* e sobre aspectos ecológicos na interação com as formigas atíneas. Utilizando *E. trichodermoides* como modelo de estudo, pretende-se com o presente trabalho, adicionar novos elementos para esse campo de estudo.

7. REFERENCES

- AKIYAMA, K.; MATSUZAKI, K.I.; HAYASHI, H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. **Nature**, v. 435, p. 824–27, 2005.
- ANTONOVICS, J.; BOOTS, M.; EBERT, D.; KOSKELLA, B.; POSS, M.; SADD, B. M. The origin of specificity by means of natural selection: evolved and nonhost resistance in host–pathogen interactions. **Evolution**, v. 67, n. 1, p. 1–9, 2013
- AUGUSTIN, J. O.; SIMÕES, T. G.; DIJKSTERHUIS, J.; ELLIOT, S. L.; EVANS, H. C. Putting the waste out: a proposed mechanism for transmission of the mycoparasite *Escovopsis* between leafcutter ant colonies. **Royal Society Open Science**, v. 4, n. 5, p.161013, 2017.
- BATRA, L. R. Ecology of ambrosia fungi and their dissemination by beetles. **Transactions of the Kansas Academy of Science**, v. 66, n. 2, p. 213–236, 1963.
- BIRNBAUM, S. S. L; GERARDO, N. M. Patterns of specificity of the pathogen *Escovopsis* across the fungus-growing ant symbiosis. **The American Naturalist**, v. 188, n. 1, p. 52–65, 2016.
- CASTRESANA, J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 17, n. 4, p. 540–552, 2000.
- 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**, v. 266, n. 5191, p. 1691–1694, 1994.
- CURRIE, C. R. Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. **Oecologia**, v. 128, n. 1, p. 99–106, 2001.
- CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 96, n. 14, p. 7998–8002, 1999.
- CURRIE, C.R.; SCOTT, J.A.; SUMMERBELL, R.C.; MALLOCH, D. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, v. 398, n. 6729, p. 701–704, 1999.
- CURRIE, C. R.; STUART, A. E. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 268, n. 1471, p. 1033–1039, 2001.
- CURRIE, C. R.; WONG, B.; STUART, A. E.; SCHULTZ, T. R.; REHNER, S. A.; MUELLER, U. G.; SUNG, G.; SPATAFORA, J. W.; STRAUS, N. A. Ancient tripartite coevolution in the attine ant-microbe symbiosis. **Science**, v. 299, n. 5605, p. 386–388, 2003.
- CUSTODIO, B. C., RODRIGUES, A. *Escovopsis kreiselii* specialization to its native hosts in the fungiculture of the lower attine ant *Mycetophylax morschi*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 112, n. 2, p. 305–317, 2019.
- DARRIBA, D., TABOADA, G. L., DOALLO, R., POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature methods**, v. 9, n. 8, p. 772, 2012.
- DE MAN, T. J.; STAJICH, J. E.; KUBICEK, C. P.; TEILING, C.; CHENTHAMARA, K.; ATANASOVA, L.; DRUZHININA, I. S.; LEVENKOVA, N.; BIRNBAUM, S. S.; BARRIBEAU, S. M; BOZICK, B. A. Small genome of the fungus *Escovopsis weberi*, a specialized disease agent of ant agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 113, n. 13, p. 3567–3572, 2016.

- DE MENDIBURU, F. Package 'agricolae'. Statistical procedures for agricultural research. **R package version**, v. 1, n. 1, 2017.
- DHODARY, B.; SCHILG, M.; WIRTH, R.; SPITELLER, D. Secondary metabolites from *Escovopsis weberi* and their role in attacking the garden fungus of leaf-cutting ants. **Chemistry**, v. 24, n. 17, p. 4445–4452, 2018.
- DEJEAN, A.; SOLANO, P. J.; AYROLES, J.; CORBARA, B.; ORIVEL, J. Insect behaviour: arboreal ants build traps to capture prey. **Nature**, v. 434, n. 7036, p. 973, 2005.
- DRUZHININA, I. S.; SEIDL-SEIBOTH, V.; HERRERA-ESTRELLA, A.; HORWITZ, B. A.; KENERLEY, C. M.; MONTE, E.; MUKHERJEE, P. K.; ZEILINGER, S.; GRIGORIEV, I. V.; KUBICEK, C. P. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 749–59, 2011.
- FERNÁNDEZ-MARÍN, H.; ZIMMERMAN, J. K.; REHNER, S. A.; WCISLO, W. T. Active use of the metapleural glands by ants in controlling fungal infection. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 273, n. 1594, p.749–759, 2006.
- FOLGARAIT, P. J.; MARFETÁN, J. A.; CAFARO, M. J. Growth and conidiation response of *Escovopsis weberi* (Ascomycota: Hypocreales) against the fungal cultivar of *Acromyrmex lundii* (Hymenoptera: Formicidae). **Environmental entomology**, v. 40, n. 2, p. 342–349, 2011.
- 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**, v. 4, n. 8, p. 1358–1363, 2006a.
- GERARDO, N. M.; MUELLER, U. G.; PRICE, S. L.; CURRIE, C. R. Exploiting a mutualism: parasite specialization on cultivars within the fungus–growing ant symbiosis. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 271, n. 1550, 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**, v. 6, n. 1, p. 88–96, 2006b.
- GILBERT, G. S; WEBB, C. O. Phylogenetic signal in plant pathogen–host range. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 104, n. 12, p. 4979–4983, 2007.
- HALL, T. A. BioEdit 5.0.9: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, n. 41, p. 95–98, 1999.
- HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 1–9, 2001.
- HEINE, D.; HOLMES, N. A.; WORSLEY, S. F.; SANTOS, A. C.; INNOCENT, T. M.; SCHERLACH, K.; PATRICK, E. H.; DOUGLAS, W. Y.; MURRELL, J. C.; VIERIA, P. C.; BOOMSMA, J. J. Chemical warfare between leafcutter ant symbionts and a co-evolved pathogen. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 2208, 2018.
- HELGASON, T.; DANIELL, T. J.; HUSBAND, R.; FITTER, A. H.; YOUNG, J. P. W. Ploughing up the wood-wide web?. **Nature**, v. 394, p. 431, 1998.
- KÄMPER, J. et al. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. **Nature**, v. 444, n. 7115, p. 97, 2006.

- KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, p. 772–780, 2013.
- KELLER, L.; NONACS, P. The role of queen pheromones in social insects: queen control or queen signal? **Animal Behaviour**, v. 45, n. 4, p. 787–794, 1993.
- KELLNER, K.; FERNANDEZ-MARIN, H.; ISHAK, H.D.; SEN, R.; LINKSVAYER, T.A.; MUELLER, U.G. Co-evolutionary patterns and diversification of ant-fungus associations in the asexual fungus-farming ant *Mycocepurus smithii* in Panama. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 26, n. 6, p. 1353–1362, 2013.
- KELLNER, K.; KARDISH, M.R.; SEAL, J.N.; LINKSVAYER, T.A.; MUELLER, U.G. Symbiont-mediated host-parasite dynamics in a fungus-gardening ant. **Microbial Ecology**, v. 76, n. 2, p. 530–543, 2018.
- KUBICEK, C. P. et al. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. **Genome Biology**, v. 12, n. 4, p. 1, 2011.
- LACERDA, L. T.; GUSMÃO, L. F. P.; RODRIGUES, A. Diversity of endophytic fungi in *Eucalyptus microcorys* assessed by complementary isolation methods. **Mycological Progress**, v. 17, n. 6, p. 719–727, 2018.
- LI, H., SOSA-CALVO, J., HORN, H. A., PUPO, M. T., CLARDY, J., RABELING, C., SCHULTZ, T. R., CURRIE, C. R. Convergent evolution of complex structures for ant–bacterial defensive symbiosis in fungus-farming ants. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 115, n. 42, p. 10720–10725, 2018.
- LUMLEY, T., THERNEAU, T. The survival package. **R News**, v. 4, n. 1, p. 26–28, 2004.
- LUTZONI, F.; PAGEL, M.; REEB, V. Major fungal lineages are derived from lichen symbiotic ancestors. **Nature**, v. 411, n. 6840, p. 937, 2001.
- MARTIN, F. M.; UROZ, S.; BARKER, D. G. Ancestral alliances: plant mutualistic symbioses with fungi and bacteria. **Science**, v. 356, n. 6340, p. eaad4501, 2017.
- MASIULIONIS, V. E.; CABELLO, M. N.; SEIFERT, K. A.; RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F. C. *Escovopsis trichodermoides* sp. nov., isolated from a nest of the lower attine ant *Mycocepurus goeldii*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 107, n. 3, p. 731–740, 2015.
- MEHDIABADI, N. J.; SCHULTZ, T. R. Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini). **Myrmecological News**, v. 13, p. 37–55, 2009.
- MEIRELLES, L. A.; SOLOMON, S. E.; BACCI JR, M.; WRIGHT, A. M.; MUELLER, U. G.; RODRIGUES, A. Shared *Escovopsis* parasites between leaf-cutting and non-leaf-cutting ants in the higher attine fungus-growing ant symbiosis. **Royal Society Open Science**, v. 2, n. 9, p. 1–11, 2015.
- MONDEGO, J. M. et al. A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. **BMC Genomics**, v. 9, n. 1, p. 548, 2008.
- MUELLER, U. G., GERARDO, N. Fungus-farming insects: multiple origins and diverse evolutionary histories. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 99, n. 24, p. 15247–15249, 2002.

- MUELLER, U. G.; KARDISH, M. R.; ISHAK, H. D.; WRIGHT, A. M.; SOLOMON, S. E.; BRUSCHI, S. M.; CARLSON, A. L.; BACCI JR, M. Phylogenetic patterns of ant–fungus associations indicate that farming strategies, not only a superior fungal cultivar, explain the ecological success of leafcutter ants. **Molecular ecology**, v. 27, n. 10, p. 2414–2434, 2018.
- MUELLER, U. G.; REHNER, S. A.; SCHULTZ, T. R. The evolution of agriculture in ants. **Science**, v. 281, n. 5385, p. 2034–2038, 1998.
- NEWMAYER, D. Filtering small quantities of conidial suspensions to remove mycelial fragments. *Fungal Genetics Newsletter, Manhattan*, v.37, p. 27, 1990.
- NIXON, K. C. WinClada ver. 1.00. 08. **Published by the author, Ithaca, NY**, 2002.
- NOGUCHI, K., GEL, Y. R., BRUNNER, E., KONIETSCHKE, F. nparLD: an R software package for the nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments. **Journal of Statistical Software**, v. 50, n. 12, 2012.
- R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>, 2017.
- RAMBAUT, A. **Figtree v. 1.4.3**. Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>, 2016.
- REYNOLDS, H. T.; CURRIE, C. R. Pathogenicity of *Escovopsis weberi*: The parasite of the attine-microbe symbiosis directly consumes the ant-cultivated fungus. **Mycologia**, v. 96, n. 5, p. 955–959, 2004.
- RODRIGUES, A., BACCI, M., MUELLER, U. G., ORTIZ, A., PAGNOCCA, F. C. Microfungal “weeds” in the leafcutter ant symbiosis. **Microbial Ecology** v. 56, p. 604–614, 2008a.
- RODRIGUES, A.; CARLETTI, C. D.; PAGNOCCA, F. C. Leaf-cutting ant faecal fluid and mandibular gland secretion: effects on microfungi spore germination. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 64–67, 2008b.
- RONQUIST, F., TESLENKO, M., VAN DER MARK, P., AYRES, D. L., DARLING, A., HÖHNA, S., LARGET, B., LIU, L., SUCHARD, S. A., HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, n. 3, p. 539–542, 2012.
- SAVOIE, J. M.; MATA, G.; BILLETTE, C. Extracellular laccase production during hyphal interactions between *Trichoderma* sp. and Shiitake, *Lentinula edodes*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, n. 5, p. 589–593, 1998.
- SCHNEIDER, C. A., RASBAND, W. S., ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 2012.
- SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 105, n. 14, p. 5435–5440, 2008.
- SILVA, A.; RODRIGUES, A; BACCI, Jr. M.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C. Susceptibility of ant-cultivated fungus *Leucogaricus gongylophorus* (Agaricales: Basidiomycota) towards microfungi. **Mycopathologia**, v. 162, n. 2, p. 115–119, 2006.
- SIMARD, S. W.; PERRY, D. A.; JONES, M. D.; MYROLD, D. D.; DURALL, D. M.; MOLINA, R. Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. **Nature**, v. 388, n. 6642, p. 579, 1997.

SPRIBILLE, T.; TUOVINEN, V.; RESL, P.; VANDERPOOL, D.; WOLINSKI, H.; AIME, M. C.; SCHNEIDER, K.; STABENTHEINER, E.; TOOME-HELLER, M.; THOR, G.; MAYRHOFER, H.; JOHANNESSEN, H.; MCCUTCHEON, J. P. Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. **Science**, v. 353, n. 6298, p. 488–492, 2016.

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. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 274, n. 1621, p. 1971–1978, 2007.

VARANDA-HAIFIG, S. S.; ALBARICI, T. R.; NUNES, P. H.; HAIFIG, I.; VIEIRA, P. C.; RODRIGUES, A. Nature of the interactions between hypocrealean fungi and the mutualistic fungus of leaf-cutter ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 110, n. 4, p. 593–605, 2017.

WEBB, S. Australian ambrosia fungi. **Proceedings of the Royal Society of Victoria**, v. 57, p. 57–79, 1945.

WEBER, N.A. 1972. Gardening Ants: The Attines. **Memoirs of the American Philosophical Society**, 1992.

WICKLOW, D. T. Interference competition. **The fungal community: its organization and role in the ecosystem**, 2nd Edn. Carroll, GC and Wicklow, DT, Eds., 1992. p. 265–274.