
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

BEATRIZ LISBOA SANCHEZ

**INTERAÇÕES ANTAGÔNICAS ENTRE
FUNGOS NEGROS E O PARASITA
ESCOVOPSIS SPP.**



Rio Claro
2016

BEATRIZ LISBOA SANCHEZ

INTERAÇÕES ANTAGÔNICAS ENTRE FUNGOS NEGROS E O
PARASITA *ESCOVOPSIS* SPP.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca

Co-orientador: Dr^a. Ana Paula Miranda Duarte

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau
de Bacharela em Ciências Biológicas

Rio Claro
2016

589.2 Sanchez, Beatriz Lisboa
S211i Interações antagônicas entre fungos negros e o parasita
Escovopsis spp. / Beatriz Lisboa Sanchez. - Rio Claro, 2016
25 f. : il., figs., quadros, fots.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Rio Claro

Orientador: Fernando Carlos Pagnocca

Coorientadora: Ana Paula Miranda Duarte

1. Fungos. 2. Antagonismo. 3. Micologia. 4. Simbiose
fungo-formiga. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e pelas portas que nela tem se aberto.

Ao Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca por todo o aprendizado, oportunidades, atenção, dedicação e paciência. Foi um privilégio tê-lo como meu orientador.

À Dra. Ana Paula Miranda-Duarte, pela amizade, orientação e auxílio em todos os momentos que necessitei. Sem você eu não conseguiria finalizar este trabalho.

À Necis e aos meus companheiros de laboratório Maria Carolina Canali, Daiane Polezel e Virgínia Masiulionis por toda a ajuda.

Ao Prof. Dr. André Rodrigues e seus orientados pelo fornecimento do *E. kreiselii* e pela colaboração.

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

À UNESP, pela oportunidade e pelo conhecimento aqui adquirido.

A meus pais Keila e José Paulo, pelo apoio, incentivo, exemplo e amor incondicional.

A meu irmão Daniel, pelos momentos de descontração

A meus avós, em especial meu avô Lázaro, pela confiança e credibilidade em mim depositadas.

A meu namorado Gustavo, pelo suporte, companheirismo e incentivo em todos os momentos.

A todos os meus amigos e colegas que tornaram este período repleto de boas lembranças e me ofereceram motivação nos momentos de cansaço.

E outros aqui não citados que de alguma forma colaboraram para que este trabalho fosse possível.

RESUMO

As formigas da tribo Attini mantêm associações com diversos micro-organismos, sendo que ainda não há conhecimento total sobre tais interações. Dentre os micro-organismos encontrados nos ninhos de formigas, fungos filamentosos do gênero *Escovopsis* são conhecidos parasitas do fungo mutualista. Além disso, trabalhos recentes têm isolado uma grande diversidade de fungos melanizados no integumento de formigas Attini. Apesar dos estudos taxonômicos realizados, ainda não há conhecimento sobre o papel dos fungos negros no mutualismo formiga-fungo cultivado e se interagem com outros micro-organismos associados às formigas. Assim, este trabalho tem como objetivo verificar a ocorrência de relações antagônicas entre fungos negros isolados de formigas-cortadeiras e o fungo parasita especializado *Escovopsis*. Para tal, foram realizados ensaios de antagonismo entre fungos negros dos gêneros *Aureobasidium*, *Exophiala*, *Kabatiella*, *Ochroconis*, *Penidiellopsis*, *Phialophora*, *Pyrenochaeta*, *Pyriculariopsis*, *Sporothrix* e *Xenopenidiella*; e três espécies de *Escovopsis*, sendo elas *E. trichodermoides*, *E. kreiselii* e *Escovopsis* sp., linhagem *Atta* sulf 4. De maneira geral, os fungos negros apresentaram maior inibição ao *E. kreiselii* e menor inibição ao *Atta* sulf 4. Apesar disto, esta linhagem de *Escovopsis* foi inibida pela grande maioria das linhagens de fungos negros, enquanto *E. kreiselii* e *E. trichodermoides*, foram inibidos em menos ensaios. Estes resultados parecem indicar uma relação com a origem e distância evolutiva dos isolados, sendo que os isolados de uma espécie de formiga mais próxima evolutivamente demonstraram inibições mais frequentes porém de menor intensidade que os isolados de espécies de formiga evolutivamente mais distantes. As espécies do gênero *Phialophora* se mostraram capazes de inibir os *Escovopsis*, o que indica que, apesar de inibirem actinobactérias, podem favorecer a simbiose formiga-fungo mutualista, necessitando mais estudos para averiguar esta relação.

Palavras-chave: fungos, antagonismo, micologia, simbiose fungo-formiga

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	5
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	7
2.1. Formigas Attini e fungos cultivados.....	7
2.2. O parasita <i>Escovopsis</i>	8
2.3. Fungos negros.....	9
3. OBJETIVO.....	12
3.1. Objetivo Geral.....	12
3.2. Objetivo Específico.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1. Testes de antagonismo.....	13
4.2. Confirmação de identificação.....	16
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
5.1. Confirmação da identificação.....	17
5.2. Inibição dos fungos negros.....	17
5.3. Padrão comportamental dos <i>Escovopsis</i>	20
6. CONCLUSÃO.....	22
7. REFERÊNCIAS	23

1. INTRODUÇÃO

Os fungos negros, também chamados de dematiáceos, formam um grupo heterogêneo, sendo caracterizados pela sua pigmentação escura devido à presença do complexo melanínico Dihidroxi-naftaleno (DNH) na parede micelial, que os protege de condições de estresse ambiental (HENSON et al., 1999), incluindo ambientes restritos em nutrientes e água (SELBMANN et al., 2005), substâncias tóxicas e pH ácido (de HOOG, 1993).

Esses micro-organismos são patógenos oportunistas para seres humanos, sendo a cromoblastomicose um exemplo de doença que pode ser causada por vários agentes etiológicos fúngicos diferentes, tais como *Fonsecaea pedrosoi* e *Phialophora verrucosa* (VICENTE et al., 2008), sendo todos representantes da ordem Chaetothyriales.

Além da associação com plantas (HENSON et al., 1999), os fungos negros também interagem com insetos, como é o caso da associação da levedura negra *Phialophora* com formigas da tribo Attini (LITTLE; CURRIE, 2007).

As formigas da tribo Attini tem uma associação obrigatória com fungos basidiomicetos, os quais são cultivados como fonte de alimento (WEBER, 1972). Ocasionalmente, o cultivo é parasitado por um fungo patógeno especializado do gênero *Escovopsis* (Ascomycota, Hypocreales), o qual destrói a biomassa do fungo mutualista e pode levar o formigueiro ao colapso total (REYNOLDS; CURRIE, 2004; GERARDO et al., 2004). O principal foco deste projeto é o de verificar eventuais relações de antagonismo entre espécies do fungo parasita *Escovopsis* e fungos melanizados isolados das formigas Attini visando a melhor compreensão das interações desses organismos.

Dentre as sete espécies de *Escovopsis* descritas até o momento, no presente projeto focamos em três delas. A primeira espécie que selecionamos foi a linhagem de *Escovopsis* sp. *Atta* sulf 4, havendo indicativos de tratar-se de uma espécie ainda não descrita. A segunda espécie selecionada por nós foi *E. trichodermoides*, descrita recentemente por nosso laboratório e que foi isolada de jardins da formiga *Mycocepurus goeldii*, também da tribo Attini. *E. trichodermoides* é caracterizado morfológicamente pela semelhança de seus ramos laterais com os das espécies do gênero *Trichoderma*, células conidogênicas monoblásticas e ausência de vesículas no conidióforo (MASIULIONIS et al., 2015).

Já a terceira espécie selecionada, *E. kreiselii*, também descrita em 2015, foi isolada de jardins de *Mycetophylax morschi* e suas principais diferenças morfológicas em relação às

espécies de *Escovopsis* anteriormente descritas são a conidiogênese simpodial holoblástica e esporos com coloração rosada (MEIRELLES et al., 2015).

É sabido que os ninhos das formigas Attini abrigam uma grande diversidade microbiana (PAGNOCCA et al., 2011), cujas interações ainda não foram totalmente elucidadas. Sabe-se que bactérias actinomicetas do gênero *Pseudonocardia* produzem antibióticos que inibem os fungos do gênero *Escovopsis*, protegendo as colônias das formigas. Essas bactérias podem ser encontradas na cutícula de formigas da tribo Attini, beneficiando indiretamente esses insetos (CURRIE et al., 1999).

Por outro lado, segundo Little e Currie (2007, 2008), essas bactérias aparentemente têm seu desenvolvimento comprometido pela presença de fungos negros (relacionados ao gênero *Phialophora*) também presentes na cutícula das formigas, o que, indiretamente, acaba por beneficiar a sobrevivência do parasita *Escovopsis*. Assim sendo, fica evidente que muitos aspectos envolvendo as interações microbianas no ambiente dos formigueiros merecem uma maior atenção dos pesquisadores pelo potencial que representam quanto à descoberta de novas drogas antimicrobianas e de possíveis inimigos naturais que podem atuar em processos de controle biológico desses insetos.

Desde o relato de Little e Currie (2007, 2008), sobre a ocorrência de leveduras negras (*Phialophora*) na cutícula das formigas, nosso laboratório desenvolveu estudos nessa área e contribuímos com alguns avanços. Por exemplo, nossos estudos mostraram a presença de outros fungos negros no integumento dessas formigas. Assim, Duarte et al. (2014) relataram a presença marcante de fungos melanizados no integumento das formigas-cortadeiras *A. capiguara* e *A. laevigata*. Duarte et al. (2016) revelaram um novo gênero e novas espécies de fungos negros, além de outras reportadas pela primeira vez no integumento das formigas-cortadeiras do Brasil.

Ainda nessa linha de investigação, o estudo realizado com espécies de *Atta capiguara* e *A. laevigata* do Estado de São Paulo isolou e identificou diversas espécies de fungos melanizados, incluindo a descrição de duas espécies novas (ATTILI-ANGELIS et al, 2014).

Esses estudos e o de GUEDES et al (2012) também realizado em nosso laboratório, são os únicos sobre a diversidade de fungos negros no ambiente das formigas Attini. Entretanto, além da suposta ação sobre o desenvolvimento das actinobactérias protetoras do ambiente interno dos formigueiros, outras possíveis propriedades biológicas desempenhadas por esses fungos negros no mutualismo das formigas e fungo cultivado (mutualista) ainda são desconhecidas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Formigas cultivadoras de fungos

As formigas cultivadoras de fungos pertencem à tribo Attini (Hymenoptera: Formicidae), que é considerado um grupo monofilético (SCHULTZ; MEIER, 1995; WETTERER et al., 1998; SCHULTZ; BRADY, 2008). Estas formigas possuem a capacidade de cultivar um fungo basidiomiceto, nutrindo-o e estimulando seu crescimento, para utilizá-lo em sua alimentação, podendo ser chamadas de agricultoras ou jardineiras devido a esse hábito (WEBER, 1972).

Estima-se que a associação entre formigas e fungos simbiossiontes originou-se em um único evento há aproximadamente 50 milhões de anos na região amazônica (MUELLER et al., 2001; SCHULTZ; BRADY, 2008). De acordo com Schultz e Brady (2008), a tribo então divergiu em dois clados (Paleoattini e Neoattini). O grupo das Paleoattini apresenta características mais basais da tribo, sendo constituído pelos gêneros *Mycocepurus*, *Myrmicocrypta* e *Apterostigma*. O grupo das Neoattini possui as características evolutivas mais derivadas e pode ser subdividido em um grupo de Neoattini mais basais, contendo os gêneros *Mycetophylax*, *Mycetarotes*, *Mycetosoritis*, *Mycetagroicus*, *Cyphomyrmex*, *Paramycetophylax* e *Kalathomyrmex* (KLINGENBERG; BRANDÃO, 2009), e um grupo mais derivado, no qual se encontram os gêneros *Sericomyrmex*, *Trachymyrmex*, *Atta* e *Acromyrmex* (SCHULTZ; BRADY, 2008).

O substrato que as Attini utilizam para o cultivo do fungo mutualista varia conforme o gênero em questão. Os gêneros mais derivados de Attini, *Acromyrmex* e *Atta*, utilizam folhas e flores frescas (WETTERER et al., 1998), sendo conhecidos como formigas-cortadeiras por possuírem tal comportamento. Ambos os gêneros são considerados pragas nos países onde são encontrados, pois danificam pastagens e áreas cultivadas, impactando negativamente a economia destes (WEBER, 1972; WILSON, 1976).

Para o cultivo do fungo mutualista, as formigas da tribo Attini mantêm em seu ninho uma estrutura conhecida como *jardim de fungos*, onde se encontram os fragmentos compostos por matéria orgânica coletados e depositados pelas operárias e os micélios do fungo cultivado, de aparência esbranquiçada. O fungo mutualista degrada o substrato depositado pelas formigas, obtendo açúcares simples; e por outro lado, é utilizado como principal fonte de

alimento das larvas (WEBER, 1972; SILVA et al., 2003) e pode ser utilizado na alimentação das operárias (SILVA et al., 2003) e de outros micro-organismos (MENDES et al., 2012).

Além do fungo mutualista, há ainda diversos outros micro-organismos que habitam os ninhos de formigas Attini (PAGNOCCA et al., 2011), entre eles fungos filamentosos (RODRIGUES et al., 2008; MASIULIONIS et al., 2015; MEIRELLES et al., 2015), bactérias (BACCI et al., 1995; RIBEIRO, 2000, MEIRELLES et al., 2015) e fungos negros (LITTLE; CURRIE, 2007, 2008; DUARTE et al., 2014).

2.2. O parasita *Escovopsis*

Nos ninhos de formigas cultivadoras de fungos é comum que se encontre fungos filamentosos anamórficos do gênero *Escovopsis* (Ascomycota: Hypocreales), os quais são considerados patógenos especializados dos fungos cultivados, tendo coevoluido com seu hospedeiro (CURRIE et al., 1999; GERARDO et al., 2004, 2006).

Estudos sugerem que o fungo *Escovopsis* é um micoparasita, retirando seus nutrientes das hifas do fungo mutualista e destruindo sua biomassa, o que pode acarretar em retardos no desenvolvimento da colônia e afetar a integridade da mesma (REYNOLDS; CURRIE, 2004; GERARDO et al., 2004). As diferentes espécies de *Escovopsis* são atraídas pelos seus hospedeiros através de quimiotaxia, sendo que esta resposta é hospedeiro-específica (GERARDO et al. 2006).

Infecções múltiplas causadas por diferentes tipos de *Escovopsis* podem ocorrer em ninhos de formigas-cortadeiras, sendo que as diferentes linhagens envolvidas em uma mesma infecção não parecem competir fortemente entre si (TAERUM et al., 2010).

A ocorrência de *Escovopsis* em ninhos de formigas Attini foi primeiramente relatada por Möller (1893), porém ele equivocadamente relacionou as espécies hoje denominadas *E. weberi* (MUCHOVEJ; DELLA LUCIA, 1990) e *E. aspergilloides* (SEIFERT et al., 1995) como sendo a fase anamórfica do fungo cultivado por *Acromyrmex disciger*. Tais fungos foram observados também por Stahel e Geijskes (1941) e Weber (1979) em ninhos de formigas da tribo Attini.

Posteriormente, Kreisel (1972) encontrou em Cuba, em um ninho de *Atta insularis*, um dos fungos citados por Möller e o identificou como *Phialocladus zsoltii*. Anos depois, Muchovej e Della Lucia (1990) alegaram que a identificação do fungo encontrado por Kreisel seria inválida e propuseram uma nova classificação para a espécie, nomeando-o *Escovopsis*

weberi. Após a identificação da espécie *E. aspergilloides* por Seifert (1995), muitos anos se passaram sem que houvesse descobertas de novas espécies do gênero, até que recentemente 5 novas espécies de *Escovopsis* foram descobertas e também um novo gênero, *Escovopsoides*, foi proposto (AUGUSTIN et al., 2013; MEIRELLES et al., 2015; MAISULIONIS et al., 2015).

Para o presente trabalho, selecionamos três espécies de *Escovopsis*, sendo elas a linhagem de *Escovopsis* sp. *Atta* sulf 4, *E. weberi*, *E. kreiselii* e *E. trichodermoides*. A espécie *E. kreiselii*, isolada de jardins de *Mycetophylax morschi*, difere das demais espécies do gênero devido a seus esporos de coloração rosada e conidiogênese simpodial holoblástica (MEIRELLES et al., 2015).

A espécie *E. trichodermoides*, isolada de jardins da formiga *Mycocepurus goeldii* e descrita por nosso laboratório, apresenta ramos laterais muito semelhantes aos das espécies do gênero *Trichoderma*, o que deu origem à sua nomenclatura. Além disso, ela também é caracterizada pela presença de células conidogênicas monoblásticas e ausência de vesículas (MASIULIONIS et al., 2015).

O modo de transmissão desse parasita parece ser exclusivamente horizontal (CURRIE et al., 1999; CURRIE, 2001), podendo haver trocas de hospedeiros ao longo do tempo evolutivo, o que explicaria a falta de congruência entre a sua filogenia e a das formigas Attini (MUELLER et al., 1998).

De acordo com Currie et al. (1999), os *Escovopsis* podem ser inibidos por bactérias do gênero *Pseudonocardia*, encontradas no integumento das formigas Attini, devido à produção de antibióticos com propriedades antagonistas contra o *Escovopsis* (CURRIE et al., 1999).

O *Escovopsis* teve seu potencial como agente de controle biológico de formigas-cortadeiras recentemente analisado através de bioensaios “in vitro” e os resultados apontam que seu potencial é promissor especialmente se for considerado o uso de linhagens de *Escovopsis* isoladas de uma espécie de formiga-cortadeira diferente da que se deseja combater (FOLGARAIT et al., 2011).

2. 3. Fungos negros

O grupo heterogêneo de fungos conhecidos como fungos negros ou dematiáceos é caracterizado pela presença do complexo melanínico Dihidroxinaftaleno (DNH) na parede micelial, o que os confere uma pigmentação escura, além de garantir proteção em condições de

estresse ambiental (HENSON et al, 1999), como ambientes restrito em água e nutrientes (SELBMANN et al., 2005), substâncias tóxicas e pH ácido (de HOOG, 1993).

Tais micro-organismos são patógenos oportunistas para seres humanos, podendo provocar diversas doenças, como por exemplo a cromoblastomicose, que pode ser causada por diferentes agentes etiológicos, como os representantes da ordem Chaetothyriales (VICENTE et al., 2008).

Do ponto de vista ecológico, alguns fungos negros também possuem associações com plantas (HENSON et al., 1999), como no caso de *Cladophialophora hostae*, que causa manchas escuras em folhas vivas (BADALI et al., 2008).

Os pesquisadores Little e Currie (2007), relataram a associação da levedura negra *Phialophora* com formigas *Apterostigma* (da tribo Attini, além de considerarem as leveduras negras como o quinto simbiote da interação entre formigas Attini e micro-organismos, tendo provavelmente estado presente nos estágios iniciais da simbiose.

Também de acordo com estudos de Little e Currie (2007, 2008), a presença das leveduras negras do gênero *Phialophora* compromete o crescimento das actinobactérias protetoras (gênero *Pseudonocardia*), consequentemente beneficiando a sobrevivência do parasita especializado *Escovopsis*.

Nos últimos anos nosso laboratório deu início aos estudos sobre fungos negros associados a formigas Attini tendo por exemplo, demonstrado a ocorrência de diferentes gêneros e espécies de fungos negros no intertegumento dessas formigas. O estudo de Duarte et al. (2014) realizado com *A. capiguara* e *A. laevigata*, relataram a presença de fungos melanizados no integumento dessas formigas-cortadeiras, incluindo patógenos oportunistas dos gêneros *Phialophora*, *Ochroconis*, *Exophiala* e *Cladophialophora*. Duarte (2016), também revelou em seus estudos a presença de um novo gênero de fungo negro, denominado *Simpliciediella*. Além disso foram descritas seis novas espécies de *Xenopenidiella* e descobertas algumas outras nunca antes relatadas no integumento das formigas-cortadeiras do Brasil.

Outro estudo semelhante realizado com as espécies *Atta capiguara* e *A. laevigata* do estado de São Paulo, isolou e identificou diferentes espécies de fungos melanizados, descrevendo duas novas espécies, *Phialophora attae* e *P. capiguarae* (ATTILI-ANGELIS et al, 2014). Além desses estudos, o de Guedes et al. (2012), investigou a presença de fungos dematiáceos em formigas da espécie *Atta laevigata*, encontrando diversos desses fungos, incluindo alguns fitoassociados.

Os estudos com fungos negros citados acima são os únicos envolvendo a diversidade de fungos negros no ambiente das formigas da tribo Attini, sendo que o papel desempenhado por esses fungos no mutualismo das Attini e seu fungo cultivado permanece desconhecido. Essas interações merecem maior atenção por apresentarem grande potencial em relação à descoberta de novas drogas antimicrobianas e de inimigos naturais em potencial, que podem atuar no controle biológico desses insetos.

O presente trabalho busca então avaliar as interações antagônicas entre fungos negros isolados de formigas-cortadeiras e o parasita especializado do gênero *Escovopsis*, a fim de compreender um pouco mais sobre o papel dos fungos dematiáceos nas interações microbianas no ambiente dos formigueiros das Attini.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar a ocorrência de antagonismo entre fungos negros isolados de formigas-cortadeiras e o fungo parasita especializado *Escovopsis*, através de ensaios de cocultivo.

3.2 Objetivo Específico

Avaliar o antagonismo de 36 linhagens de fungos negros, isoladas de formigas do gênero *Atta*, frente a 3 linhagens de *Escovopsis* isoladas de formigas da tribo Attini: *E. weberi* (isolado de *Atta sexdens rubropilosa*), *E. trichodermoides* (isolada de *Mycocepurus goeldii*) e *E. kreiselii* (isolada de *Mycetophylax morschi*) através de ensaios de cocultivo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os fungos negros (Quadros 1 e 2) encontram-se depositados na Central de Recursos Microbianos (CRM) da UNESP (Rio Claro, SP) e foram previamente isolados e identificados em trabalhos anteriores (DUARTE et al., 2014; ARCURI et al., 2014; MELO, 2014). Os fungos parasitas do gênero *Escovopsis* utilizados também se encontram depositados na CRM-UNESP.

4.1 Testes de antagonismo

Nos testes de antagonismo foram utilizadas 36 linhagens de fungos negros, isoladas do material de descarte e do integumento de formigas-cortadeiras. Os fungos melanizados utilizados englobam os gêneros *Aureobasidium*, *Exophiala*, *Kabatiella*, *Ochroconis*, *Penidiellopsis*, *Phialophora*, *Pyrenochaeta*, *Pyriculariopsis*, *Sporothrix* e *Xenopenidiella* (Tabela 1). Quanto ao fungo parasita *Escovopsis*, foram utilizadas as linhagens *Atta* sulf 4 (isolada dos jardins de *Atta sexdens rubropilosa*), VEM-2014 (isolada dos jardins de *Mycocephalus goeldii*) e LESF305 (isolada dos jardins de *Mycetophylax morschi*), de *E. weberi*, *E. trichodermoides* e *E. kreiselii*, respectivamente.

Para avaliação das possíveis interações antagônicas entre os fungos negros e *Escovopsis*, foi utilizada uma adaptação dos métodos anteriormente utilizados por Mendes (2010) e Meirelles (2012) em seus estudos de antagonismo entre actinobactérias e *Escovopsis*.

Desta forma, um bloco de 7 mm de diâmetro dos fungos negros, previamente cultivados em PDA (*Potato Dextrose Agar*) por 7-14 dias, foi inoculado no centro de placas contendo o mesmo meio. Foi semeado um fungo por placa. Após a inoculação, as placas foram incubadas a 25°C por 7 ou 14 dias, para o desenvolvimento dos fungos negros de crescimento rápido e lento, respectivamente.

Decorrido esse período, um bloco de 7 mm de diâmetro de *Escovopsis* previamente cultivado em PDA por 7 dias, foi inoculado a 1,0 cm da borda das placas na extremidade oposta ao fungo negro e estas foram incubadas por mais 14 dias a 25°C. Nesta etapa preliminar, a leitura dos resultados foi feita visualmente, observando-se inibição ou não inibição do *Escovopsis*.

Para cada desafio “fungo negro-*Escovopsis*”, foram realizadas três réplicas. Como controle experimental, as linhagens de *Escovopsis* também foram inoculadas em placas de PDA sem a presença dos fungos negros e incubadas a 25°C por 14 dias.

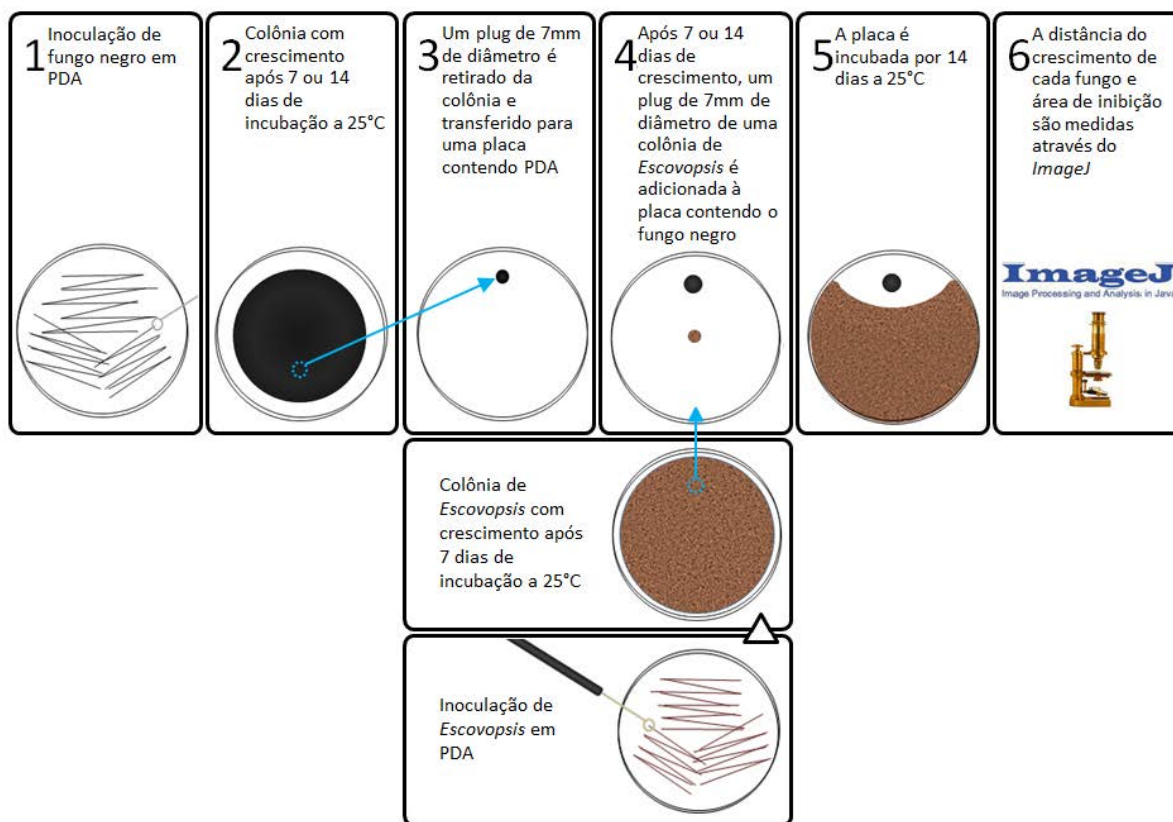
Quadro 1. Fungos negros utilizados nos ensaios preliminares.

Táxon	Similaridade, acesso GenBank	Código	Fonte de isolamento
<i>Aureobasidium</i> sp.	100%, JN712553	DOC205	bitú de <i>Atta capiguara</i>
	100%, JN712553	DOC209	bitú de <i>Atta capiguara</i>
	99%, FJ150916	LB6.1	bitú de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>
<i>Exophiala dermatitidis</i>	100%, AB498925	AP147	içá de <i>Atta capiguara</i>
	100%, AB498925	AP323	pellet de <i>Atta laevigata</i>
	100%, JN675372	AP318	içá de <i>Atta capiguara</i>
	100%, AB498925	AP402	içá de <i>Atta capiguara</i>
	99%, DQ826738	AP424	içá de <i>Atta laevigata</i>
	100%, AY663828	AP425	pellet de <i>Atta laevigata</i>
	99%, EU910264	AP426	pellet de <i>Atta laevigata</i>
	99%, FJ387565	AP427	pellet de <i>Atta laevigata</i>
<i>Exophiala spinifera</i>	98%, AY484985	AP128	içá de <i>Atta capiguara</i>
	100%, AY156975	AP359	içá de <i>Atta capiguara</i>
	97%, AY484985	AP449	bitú de <i>Atta laevigata</i>
	100%, AY156975	DOC11	bitú de <i>Atta capiguara</i>
	100%, AY156975	DOC12	bitú de <i>Atta capiguara</i>
	100%, AY156975	DOC388	içá de <i>Atta capiguara</i>
	100%, AY156975	DOC393	içá de <i>Atta capiguara</i>
	100%, AY156975	DOC398	içá de <i>Atta capiguara</i>
	97%, EU257701	DOC407	içá de <i>Atta capiguara</i>
<i>Kabatiella microsticta</i>	100%, EU167608	PB10	bitú de <i>Atta sexdens rubropilosa</i>
<i>Ochroconis globalis</i>	100%, KF961088	AP171	içá de <i>Atta capiguara</i>
<i>Ochroconis sexualis</i>	100%, KF156018	AP297	içá de <i>Atta capiguara</i>
<i>Penidiellopsis radicularis</i>	100%, KT833148	AP386	içá de <i>Atta capiguara</i>
	100%, KT833158	DOC350	bitú de <i>Atta capiguara</i>
<i>Phialophora attae</i>	100%, KF928460	AP399	içá de <i>Atta capiguara</i>
	100%, KF928460	AP462	bitú de <i>Atta laevigata</i>
	100%, KF928460	AP79	içá de <i>Atta capiguara</i>
<i>Phialophora capiguarae</i>	100%, KF928464	AP376	içá de <i>Atta capiguara</i>
<i>Pyrenochaeta</i> sp.	93%, EU750693	AP176	pellet de <i>Atta capiguara</i>
<i>Pyriculariopsis parasitica</i>	96%, AY265340	DOC292	bitú de <i>Atta capiguara</i>
<i>Sporothrix schenkii</i>	98%, AB363791	DOC147	bitú de <i>Atta laevigata</i>
<i>Xenopenidiella formica</i>	100%, KT833164	AP380	içá de <i>Atta capiguara</i>
<i>Xenopenidiella inflata</i>	100%, KT833171	87N	bitú de <i>Atta laevigata</i>
<i>Xenopenidiella laevigata</i>	100%, KT833170	89N	içá de <i>Atta laevigata</i>
<i>Xenopenidiella nigrescens</i>	100%, KT833169	DOC356	bitú de <i>Atta capiguara</i>

Fonte: elaborado pela autora com dados da pesquisa.

Para determinar a porcentagem de inibição, as placas foram digitalizadas em digitalizador (Genius, modelo HR7x) e a área de inibição do fungo negro (em cm²) foi medida utilizando o software ImageJ v.1.45 (ABRAMOFF et al., 2004), sendo feita uma média das três réplicas de cada teste. A figura 1 apresenta um esquema dos passos realizados nos testes de antagonismos descritos.

Figura 1 – Passos realizados nos testes de antagonismo



Fonte: elaborado pela autora.

A porcentagem de inibição de cada linhagem de fungo negro em relação a cada um dos *Escovopsis* foi calculada de acordo com a equação:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{\text{média aritmética da área de inibição em cm}^2}{\text{área total da placa em cm}^2} \times 100\%.$$

Visando facilitar a análise dos resultados, as inibições foram classificadas em *weak* (fraca), *medium* (média) e *strong* (forte) de acordo com o valor de cada porcentagem, da seguinte forma: 7 (menor porcentagem obtida) a 25% de inibição foi considerado inibição fraca, de 26 a 50% de inibição foi considerado inibição média e 51 a 88% (maior porcentagem obtida) foi considerado inibição forte.

4.2 Confirmação de identificação dos *Escovopsis*

Após os ensaios de antagonismo e análise dos resultados, foi feita a extração de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento das espécies de *Escovopsis kreiselii* e *E. cf. weberi*, a fim de confirmar a identificação dos mesmos. A identificação da estirpe de *E. trichodermoides* foi confirmada apenas morfollogicamente por ter sido utilizada uma réplica da linhagem holotipo (acesso GenBank KF033128.1).

Para a extração, os fungos foram cultivados em PDA a 25°C por 7 dias. A extração de DNA pelo método CTAB (modificado de MÖLLER et al., 1992; GERARDO et al., 2004) foi realizada adicionando ao micélio fragmentado 500 µL de tampão de lise TES (Tris 100 mM; EDTA 10 mM; SDS 2%) pré-aquecido a 65°C e micro-esferas de vidro (Sigma G9268) previamente esterilizadas. Dez µL de proteinase K (50 mg/mL) foram adicionados e os microtubos foram agitados vigorosamente por 4 min. Após, os microtubos foram incubados a 65°C por 30 min e agitados novamente por mais 4 min. Em seguida, 140 µL de NaCl 5M e 64 µL de CTAB 10% foram adicionados e os microtubos foram invertidos 25 vezes seguido de incubação a 65°C por 60 min. Após uma agitação por 4 min, 600 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) foram misturados à solução em agitação por 5 min e, em seguida, os microtubos foram centrifugados por 10 min a 14000 r.p.m. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo contendo 300 µL de isopropanol gelado e 50 µL de acetato de sódio 3M (pH 5,2), misturado cuidadosamente invertendo-se o microtubo 25 vezes seguido por centrifugação por 10 min a 14.000 r.p.m. O pellet resultante foi lavado com 600 µL de etanol 70% gelado. Após secagem em temperatura ambiente, o pellet foi ressuscitado em 30 µL de tampão TE e armazenado a -20°C.

Foi realizada a amplificação das regiões ITS, TEF e CLA do DNA ribossômico de acordo com o trabalho de Meirelles et al. (2015). Para verificação dos produtos de amplificação foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% e os amplicons foram purificados com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante.

As reações de sequenciamento foram feitas utilizando Big Dye Terminator v3.1™ (Life Technologies). Após purificação, as amostras foram ressuscitadas em 10µL de Hi Di Formamida e aplicadas no sequenciador ABI 3500 (AppliedBiosystems). As sequencias resultantes foram editadas no software BioEditv.7.0.5.3 (HALL, 1999) e comparadas com o banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (GenBank).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Confirmação da identificação

A região ITS parcial (616pb) obtida da estirpe de *Escovopsis kreiselii* LESF305 foi comparada às sequências do banco de dados do NCBI (National Center of Biotechnology information) através da ferramenta de alinhamento heurístico BLASTn® (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Foi obtido identidade de 100% e cobertura de 85% quando alinhada com a sequência ITS 1 da linhagem *Escovopsis kreiselii* LESF53 (acesso GenBank KJ808767.1).

Quanto à linhagem *Atta* sulf 4, suas sequências parciais de TEF (889pb), CLA (606pb) e ITS (644pb) também foram submetidas à comparação com as sequências do GenBank e foram obtidos 99% de identidade e 100% de cobertura para TEF e 100% de identidade e 90% de cobertura para CLA quando comparados à linhagem de *Escovopsis* sp. Esc612, depositada por Currie et al. (Acesso GenBank AY172604.1, e AY172621.1). A comparação da região ITS parcial resultou em 100% de identidade com a sequência de 538pb de ITS parcial da linhagem de *Escovopsis* sp. UT006, depositada por Meirelles. Sendo assim, a linhagem *Atta* sulf 4 provavelmente se trata de uma espécie ainda não descrita.

5.2. Inibição dos fungos negros

O Quadro 2 apresenta os níveis de inibição observados durante os desafios entre as três espécies de *Escovopsis* e as 36 linhagens de fungos negros. O período de incubação do cocultivo foi de 15 dias.

Na Fig. 2., observa-se que o *E. weberi* *Atta* sulf 4 não foi inibido por apenas 3 das 36 linhagens de fungos negros, sendo que a maioria das linhagens o inibiu fracamente. O *E. trichodermoides* VEM-2014 não foi inibido por 7 linhagens, e, quando houve inibição, esta foi considerada média (fig. 2). Apesar de aproximadamente metade das linhagens de fungos negros (17) não terem inibido o *E. kreiselii* LESF305, a maior parte das inibições foi de intensidade forte (fig. 2).

Esta diferença no nível de inibição das diferentes linhagens de *Escovopsis* provavelmente está relacionada com suas diferentes origens, já que as linhagens de fungos negros e *Escovopsis weberi* foram isoladas de ninhos de formigas-cortadeiras, enquanto que as linhagens de *Escovopsis kreiselii* e *Escovopsis trichodermoides* foram isoladas de ninhos de formigas attine não cortadeiras. Desta maneira, os resultados possivelmente indicam uma relação de

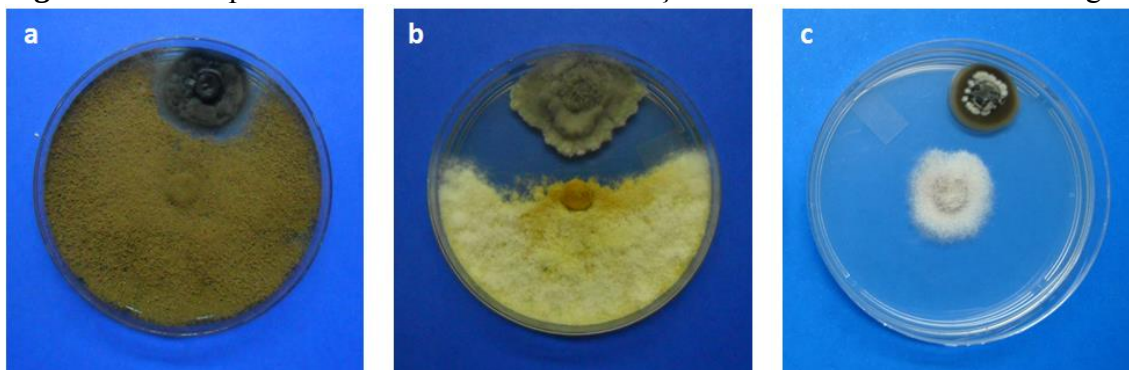
especificidade, adquirida por uma co-evolução entre fungos negros e *Escovopsis* existentes em ninhos de formigas attine de espécies evolutivamente próximas.

Quadro 2 - Níveis de inibição observados nos ensaios de antagonismo.

Táxon	Código	Porcentagem de inibição		
		<i>Escovopsis</i> sp.	<i>E. trichodermoides</i>	<i>E. kreiselii</i>
<i>Aureobasidium</i> sp.	DOC205	W	W	S
	DOC209	W	M	-
	LB6.1	M	M	S
<i>Exophiala dermatitidis</i>	AP147	W	W	S
	AP323	-	-	S
	AP318	W	W	S
	AP402	W	M	S
	AP424	-	W	S
	AP425	W	M	S
	AP426	W	M	M
	AP427	-	M	W
<i>Exophiala spinifera</i>	AP128	W	M	S
	AP359	M	M	S
	AP449	W	M	S
	DOC11	W	M	S
	DOC12	W	M	S
	DOC388	W	M	-
	DOC393	W	M	S
	DOC398	W	W	M
	DOC407	M	M	-
<i>Kabatiella microsticta</i>	PB10	W	W	-
<i>Ochroconis globalis</i>	AP171	W	W	-
<i>Ochroconis sexualis</i>	AP297	W	W	-
<i>Penidiellopsis radicularis</i>	AP386	W	-	-
	DOC350	W	-	-
<i>Phialophora attae</i>	AP399	W	M	-
	AP462	W	M	-
	AP79	M	-	-
<i>Phialophora capiguarae</i>	AP376	M	M	-
<i>Pyrenochaeta</i> sp.	AP176	M	M	S
<i>Pyriculariopsis parasitica</i>	DOC292	W	W	-
<i>Sporothrix schenkii</i>	DOC147	W	S	S
<i>Xenopenidiella formica</i>	AP380	W	-	-
<i>Xenopenidiella inflata</i>	87N	W	-	-
<i>Xenopenidiella laevigata</i>	89N	W	-	-
<i>Xenopenidiella nigrescens</i>	DOC356	W	S	-

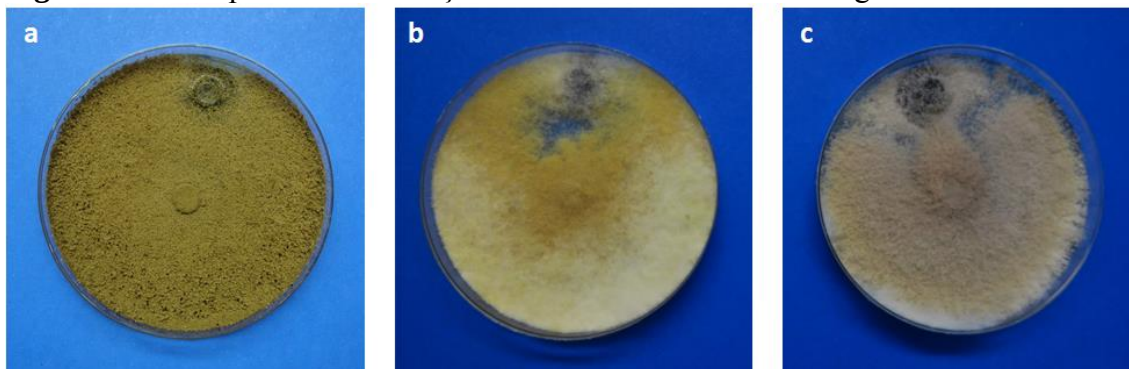
(-): sem inibição; (W): *weak* (inibição fraca); (M): *medium* (inibição média); (S): *strong* (inibição forte). Fonte: elaborado pela autora com dados da pesquisa

Figura 2 – Exemplos dos diferentes níveis de inibição observados nos testes de antagonismo.



(a): inibição fraca, observada principalmente nos testes de antagonismo contra *E. weberi*; (b): inibição média, observada principalmente nos testes de antagonismo contra *E. trichodermoides*; (c): inibição forte, observada principalmente nos testes de antagonismo contra *E. kreiselii*. Fonte: elaborado pela autora.

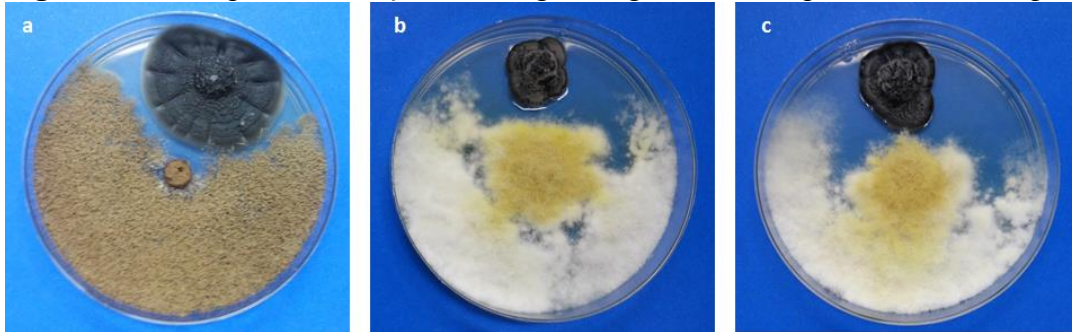
Figura 3 – Exemplos de não inibição observada nos testes de antagonismo.



(a): não inibição observada nos testes contra *E. weberi*; (b): não inibição observada nos testes contra *E. trichodermoides*; (c): não inibição observada nos testes contra *E. kreiselii*. Fonte: elaborado pela autora.

De acordo com os resultados, todas as linhagens de fungos negros inibiram ao menos uma espécie de *Escovopsis*. Este dado é especialmente relevante no caso das leveduras melanizadas do gênero *Phialophora* (figura 4), que foram responsáveis por inibições fracas e médias aos *Escovopsis* das espécies *E. weberi* e *E. trichodermoides*. Esta observação é contrária à suposição de Little e Currie (2008) de que os fungos negros presentes na cutícula de operárias, em especial os relacionados ao gênero *Phialophora*, seriam prejudiciais à simbiose por serem antagonistas das actinobactérias, que protegem o ninho do parasita *Escovopsis*.

Figura 4 – Exemplos de inibição dos fungos do gênero *Phialophora* aos *Escovopsis*

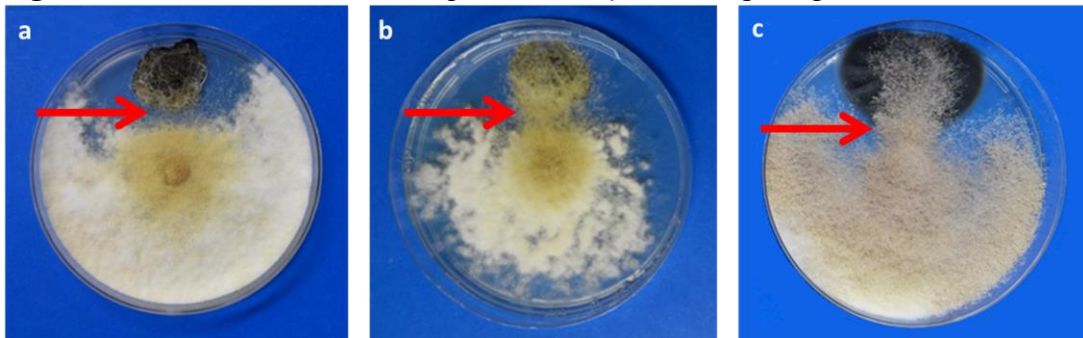


(a): *E. weberi* e *Phialophora capiguarae* AP376; (b): *E. trichodermoides* e *Phialophora attae* AP462; (c): *E. trichodermoides* e *Phialophora attae* AP399.

5.3. Padrão comportamental dos *Escovopsis*

Em alguns ensaios foi observado o crescimento de *E. trichodermoides* e *E. kreiselii* em direção ao fungo negro (figura 5). Esta aparente atração precisa ser melhor investigada para saber se há participação de compostos químicos (voláteis ou não) neste fenômeno. Tal atração também foi relatada por Haifig (2014) em relação ao fungo mutualista (*Leucoagaricus gongylophorus*).

Figura 5 – Crescimento do *Escovopsis* em direção ao fungo negro



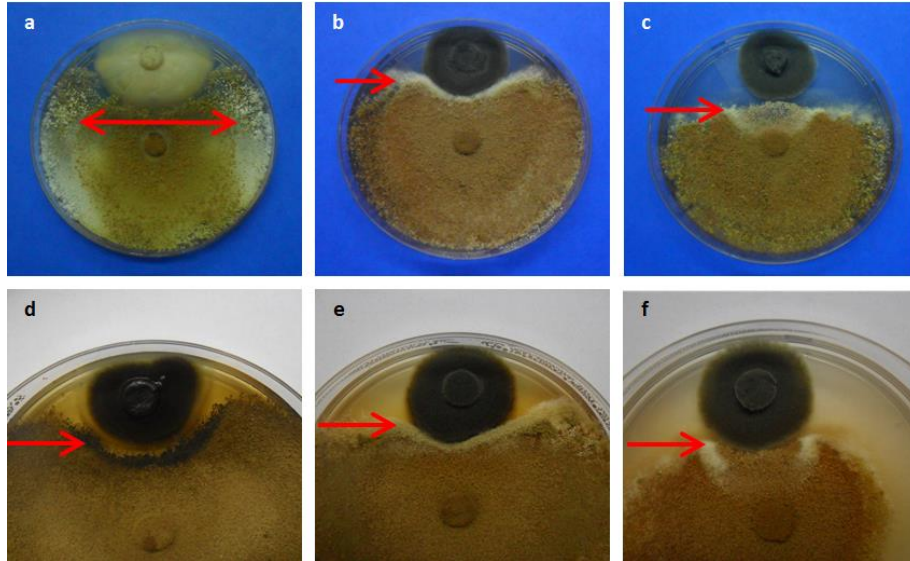
a - DOC350 (*Teratosphaeriaceae* sp.) contra *E. trichodermoides*; b – AP386 (*Teratosphaeriaceae* sp.) contra *E. trichodermoides*; c – AP376 (*Phialophora capiguarae*) contra *E. kreiselii*. A seta vermelha aponta para os micélios do *Escovopsis* crescendo em direção ao fungo negro. Fonte: elaborado pela autora.

Nos testes contra algumas linhagens de *Exophiala dermatitidis*, *E. spinifera* e *Aureobasidium* sp., notou-se mudanças de coloração do *E. weberi* em seus micélios mais próximos ao fungo negro. Na maioria dos casos observou-se uma cor esbranquiçada (Fig. 6), o que não foi comumente observado nos testes de antagonismo com o *E. weberi*.

No caso da linhagem de *Exophiala spinifera* AP359, o *E. weberi* apresentou cor preta em uma das triplicatas e esbranquiçada nas demais (Fig. 6). Tal mudança de coloração ocorreu

somente em testes em que houve inibição. Mais estudos precisam ser feitos para melhor entendimento do significado deste fenômeno. Mudanças de coloração nos micélios nas regiões próximas ao fungo negro também foram observadas no *E. trichodermoides*, porém com maior frequência (Figuras 2, 3, 4 e 7).

Figura 6 – Mudança de coloração do *Escovopsis weberi* em regiões próximas ao fungo negro



A seta vermelha aponta a região de coloração distinta: a – cor esbranquiçada observada no teste contra o fungo negro DOC209 (*Aureobasidium* sp.); b – cor esbranquiçada observada no teste contra o fungo negro DOC388 (*Exophiala spinifera*); c – cor esbranquiçada observada no teste contra o fungo negro DOC407 (*Exophiala spinifera*); d, e, f - triplicata do teste contra o fungo negro AP359 (*Exophiala spinifera*), em que foi observada a coloração branca em duas das três placas e a cor preta na restante. Fonte: elaborado pela autora.

Figura 7 – Coloração amarelada do *Escovopsis trichodermoides* nos micélios mais próximos ao fungo melanizado,



Exemplo do teste contra *Sporothrix schenckii* DOC147. Fonte: elaborado pela autora

6. CONCLUSÃO

As observações deste trabalho mostraram que, ao contrário do que se supõe, os fungos negros são capazes de antagonizar com o parasita *Escovopsis*; com isso, ao invés de contribuir indiretamente para a diminuição nos mecanismos de resistência ao principal fungo parasita dos jardins das formigas Attini, eles podem ser benéficos para a simbiose formiga-fungo cultivado.

Os resultados sugerem que a intensidade das respostas está inversamente relacionada com a origem e distância evolutiva dos isolados, ou seja, fungos negros e *Escovopsis* isolados de uma mesma espécie ou gênero de formiga aparentemente já desenvolveram estratégias de defesa e ou reconhecimento visando anular ou diminuir os efeitos, enquanto que os mais distantes (quanto a origem) aparentemente respondem de modo mais intenso quando em contato. Este aspecto (relações evolutivas x antagonismo) deverão ser melhor analisados num estudo mais amplo, envolvendo maior diversidade de *Escovopsis*, principalmente.

7. REFERÊNCIAS

- ABRAMOFF, M. D.; MAGALHÃES, P. J.; RAM, S. J. Image Processing with ImageJ. **Biophotonics International**, v. 11, n. 7, p. 36-42, 2004.
- ALMEIDA, J. Yeast community survey in the Tagus estuary. **FEMS Microbiology Ecology**, v.53, p.295–303, 2005.
- ARCURI, S.L.; PAGNOCCA, F.C.; MELO, W.G.P.; NAGAMOTO, N.S.; KOMURA, D.L.; RODRIGUES, A. Yeasts found on an ephemeral reproductive caste of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.106, p.475-487, 2014.
- ATTILI-ANGELIS, D.; DUARTE, A. P. M.; PAGNOCCA, F. C.; NAGAMOTO, N. S.; DE VRIES, M.; STIELOW, J. B.; de HOOG, G. S. Novel *Phialophora* species from leaf-cutting ants (tribe Attini). **Fungal Diversity**, v. 65, n. 1, p. 65-75, 2014.
- AUGUSTIN, J.O.; GROENEWALD, J.Z.; NASCIMENTO, R.J.; MIZUBUTI, E.S.; BARRETO, R.W.; ELLIOT, S. L.; EVANS, H. C. Yet more “weeds” in the garden: fungal novelties from nests of leaf-cutting ants. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e82265, 2013.
- BADALI, H.; GUEIDAN, C.; NAJAFZADEH, M.J.; BONIFAZ, A., VAN DEN ENDE, A.G.; DE HOOG, G.S. Biodiversity of the genus *Cladophialophora*. **Studies in Mycology**, v. 61, p. 175-191, 2008.
- 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.
- de HOOG, G. S. Evolution of black yeasts: possible adaptation to the human host. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 63, n. 2, p. 105-109, 1993.
- DUARTE, A.P.M.; ATTILI-ANGELIS, D.; BARON, N. C.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W.; PAGNOCCA, F.C. Riding with the ants. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 38, p. 81-99, 2016.
- DUARTE, A.P.M.; ATTILI-ANGELIS, D.; BARON, N.C.; FORTI, L.C.; PAGNOCCA, F.C. Leaf-cutting ants: an unexpected microenvironment holding human opportunistic black fungi. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.106, n.3, p.465-73, 2014.
- FOLGARAIT, P.; GOROSITO, N.; POULSEN, M.; CURRIE, C.R. Preliminary in vitro insights into the use of natural fungal pathogens of leaf-cutting ants as biocontrol agents. **Current microbiology**, v. 63, n. 3, p. 250-258, 2011.
- 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, p.1791–1798, 2004.
- GERARDO, N.M.; JACOBS, S.R.; CURRIE, C.R.; MUELLER, U.G. Ancient host–pathogen associations maintained by specificity of chemotaxis and antibiosis. **PLoS Biol**, v. 4, n. 8, p. e235, 2006.

GUEDES, F. L. A.; ATTILI-ANGELIS, D.; PAGNOCCA, F. C. Selective isolation of dematiaceous fungi from the workers of *Atta laevigata* (Formicidae: Attini). **Folia microbiologica**, v. 57, n. 1, p. 21-26, 2012.

HAIFIG, S. S. V. Natureza do parasitismo de *Escovopsis* e *Escovopsioides* sobre *Leucoagaricus gongylophorus*, fungos associados aos jardins de formigas cortadeiras. 2014. 58f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista, São Paulo

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic acids symposium series**, v.41, p.95-98, 1999.

HENSON, J.M.; BUTLER, M.J.; DAY, A.W. The dark side of the mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. **Annual review of phytopathology**, v. 37, n. 1, p. 447-471, 1999.

KREISEL, H. Pilze aus pilzgärten von *Atta insularis* in Kuba. **Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie**, v.12, n.8, p.643-654, 1972.

KLINGENBERG, C.; BRANDAO, C.R.F. Revision of the fungus-growing ant genera Mycetophylax Emery and Paramycetophylax Kusnezov rev. stat., and description of Kalathomyrmex n. gen.(Formicidae: Myrmicinae: Attini). **Zootaxa**, v. 2052, p. 1-31, 2009.

LITTLE, A.E.F.; CURRIE, C.R. Symbiotic complexity: discovery of a fifth symbiont in the attine ant-microbe symbiosis. **Biology letters**, 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**, v. 89, n. 5, p. 1216-1222, 2008.

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.

MEIRELLES, L.A. Antagonismo de actinobactérias isoladas de *Trachymyrmex* frente ao fungo parasita *Escovopsis*. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso - (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro.

MEIRELLES, L.A.; MONTOYA, Q.V.; SOLOMON, S.E.; RODRIGUES, A. New Light on the Systematics of Fungi Associated with Attine Ant Gardens and the Description of *Escovopsis kreiselii* sp. nov. **PloS one**, v. 10, n. 1, 2015.

MELO, W.G.P. Leveduras isoladas de ninhos de *Acromyrmex balzani* (Hymenoptera: Formicidae) de áreas de cerrado do Estado do Tocantins. 2014. 161 f. Tese - (Doutorado em Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro.

MENDES, T.D. Atividade antimicrobiana de actinobactérias isoladas de formigas Attini (Hymenoptera: Formicidae). 2010. Dissertação – (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro.

MÖLLER, A.F.W. Die Pilzgärten einiger südamerikanischer Ameisen. **Botanische Mitteilungen aus den Tropen**, Jena, v. 6, [s.n.], p. 1-127, 1893.

MÖLLER, E.M.; BAHNWEG, G.; SANDERMANN, H.; GEIGER, H.H. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. **Nucleic Acids Research**, v. 20, n. 22, p. 6115, 1992.

MUCHOVEJ, J.J.; DELLA LUCIA, T.M. *Escovopsis*, a new genus from leaf cutting ant nests to replace *Phialocladus* nomem invalidum. **Mycotaxon**, 1990.

MUELLER, U.G.; SCHULTZ, T.R.; CURRIE, C.R.; ADAMS, R.M.; MALLOCH, D. The origin of the attine ant-fungus mutualism. **Quarterly Review of Biology**, p. 169-197, 2001.

MUELLER, U.G.; REHNER, S.A.; SCHULTZ, T.R. The evolution of agriculture in ants. **Science**, v. 281, n. 5385, p. 2034-2038, 1998.

PAGNOCCA, F.C.; RODRIGUES, A.; BACCI Jr, M. Microrganismos associados às formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T.M.C. (Ed) *Formigas-Cortadeiras da Bioecologia ao Manejo*. Editora UFV, Viçosa, 2011. p. 262-283.

REYNOLDS, H.T.; CURRIE, C.R. Pathogenicity of *Escovopsis weberi*: The parasite of the attine ant-microbe symbiosis directly consumes the ant-cultivated fungus. **Mycologia**, v. 96, n. 5, p. 955-959, 2004.

SELBMANN, L.; de HOOG, G. S.; MAZZAGLIA, A.; FRIEDMANN, E. I.; ONOFRI, S. Fungi at the edge of life: cryptoendolithic black fungi from Antarctic desert. **Studies in Mycology**, v. 51, p. 1-32, 2005.

SCHULTZ, T.R.; BRADY, S.G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 14, p. 5435-5440, 2008.

SCHULTZ, T.R.; MEIER, R.A. Phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. **Systematic Entomology**, v. 20, n. 4, p. 337-370, 1995.

STAHEL, G; GEIJSKES, D.C. Weitere Untersuchungen über Nestbau un Gartenpilz von *Atta cephalotes* L. und *Atta sexdens* L. (Hym. Formicidae). *Revista de Entomologia*, v. 12, n. 1-2, p. 243-268, 1941.

TAERUM, S. J.; CAFARO, M. J.; CURRIE, C. R. Presence of multiparasite infections within individual colonies of leaf-cutter ants. **Environmental entomology**, v. 39, n. 1, p. 105-113, 2010.

VICENTE, V.A.; ATTILI-ANGELIS, D.; PIE, M.R.; QUEIROZ-TELLES, F.; CRUZ, L. M.; NAJAFZADEH, M.J.; DE HOOG, G.S.; ZHAO, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies in Mycology**, v. 61, p. 137-144, 2008.

WEBER, N.A. The gardening ants. **The Attines**. Philadelphia: American Philosophical Society, 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**, v. 9, n. 1, p. 42-47, 1998.