
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

DESCRIÇÃO DA DIVERSIDADE DE FUNGOS ASSOCIADOS A
FORMIGAS ATTINI POR MÉTODO INDEPENDENTE DE
CULTIVO

JOANA DANIELA MANTOVANI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Campus de Rio Claro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Rio Claro
2013

JOANA DANIELA MANTOVANI

**DESCRIÇÃO DA DIVERSIDADE DE FUNGOS ASSOCIADOS A
FORMIGAS ATTINI POR MÉTODO INDEPENDENTE DE CULTIVO**

Orientador: Profº Dr. Maurício Bacci Júnior

Co-orientador: Profº Dr. André Rodrigues

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Rio Claro,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia
Celular e Molecular).

Rio Claro - SP
2013

*À Sandra pelo encorajamento para o término desse trabalho,
dedico.*

AGRADECIMENTOS

A minha família pelo apoio financeiro, moral e psicológico.

A minha mãe (Vilma Benedita de Oliveira Mantovani) pelo carinho com o qual criou sua filha mais nova. Obrigada por fazer comidas tão gostosas todas as vezes que eu voltava para casa. Vai ser difícil ficar longe de ti no doutorado, mas eu juro que os seus ensinamentos sempre estarão comigo!

Aos meus irmãos (Jonas, Gilson, Jiane e Josias) que jamais mediram esforços para me ajudar no que fosse preciso. Serei eternamente grata por tamanho amor fraterno.

As minhas sobrinhas Bruna e Giovana pelas piadinhas, filmes e carinho.

A minha tia Doraci de Oliveira e a minha prima Sandra Maria de Oliveira (in memoriam) por cuidarem de mim com tanto apreço, reconhecimento em vocês seres que maravilhosamente transmitiram a mim todo seu amor e sou muito grata por isso.

Aos meus cães. Por um amor puro e incondicional de criatura. Por estarem sempre dispostos a minha hiperatividade! Amo cada um com toda força que cabe em mim.

Aos tantos amigos, minha segunda família, pessoas mais que especiais e sem as quais eu jamais teria chegado até aqui.

À Fabiana Alonso Rocha (Fabi), uma amiga sem igual, praticamente uma irmã, como quem vivi os momentos mais engraçados e emocionantes desse mestrado! Um agradecimento especial por me ajudar tanto, por me ensinar a ser alguém melhor, a me controlar... Obrigada por sempre estar a uma ligação de distância!

À Cíntia Bezerra, a baiana mais engraçada e fofa que eu conheço! Obrigada por ser minha mãe de Rio Claro, por tantas comidas já preparadas, por tantos risos. Sou muito grata por seus conselhos que certamente fizeram de mim um ser humano melhor. Um obrigado com muito carinho pra ti.

Ao meu orientador Professor Dr. Maurício Bacci, pelo apoio e por acreditar em meu potencial como cientista. Obrigada.

Ao Professor Dr. André Rodrigues, co-orientador desse trabalho.

Aos amigos de laboratório, companheiros diários de tantas risadas. Ao Sérgio Kakaso (Miague) pelas coletas mais divertidas que já fiz. Ao Alexandre Somera por me permitir entender mais de fungos.

À Cynara de Melo Rodovalho por ajudar tanto... Eu podia estar desanimada e sem motivação, mas era só ouvir um "Oi Jô" que a energia negativa ia embora. Obrigada por ser tão maravilhosa, Cy! Você é um ser abençoado.

À Milene Ferro por tantos trotes, um mais surpreendente que outro, pela ajuda com meu trabalho, muito obrigada. Ao Tássio Brito por me ajudar tanto, me fazer rir, pelo companheirismo, humor elevado e danças!

À Ana Carolina Marchiori (Carol), Welliton, Diego, Alexandre (Chao), Mariana Lira (Mari) e Franco por aguentarem minhas piadas ruins durante nosso gostoso convívio.

À Necis Miranda (Nê) pela amizade e dedicação! Obrigada por sempre estar disposta a me ajudar, você fez muito por mim! Sou muito grata.

A Viviane de Cassia Pereira (Vivi) que mesmo estando longe sempre me apoia em todos meus planos. Obrigada pela sua amizade. Amo-te muito e como você e eu sabemos a gente vai estar velhinha e ainda vai rir dos nossos tempos de universitárias.

Aos funcionários da UNESP, desde os vigias até o pessoal da limpeza.

Aos professores da UNESP por instigarem em mim o desejo pelo conhecimento, em especial a Prof^a Dra. Maria Aparecida Marín Morales (Marín) pela excelente disciplina e pelos créditos mais gostosos de obter no meu mestrado!

As componentes da Manda-Chuva, a melhor república que já morei! Pucca, Fer, Thaty, Bia, Jaque e Karol. Obrigada a cada uma por tanto carinho, risadas e compreensão.

À Camila Alves de Brito, pela companhia, por tantas risadas, confidências, pela compreensão! Muito obrigada por dividir seu espaço geopolítico comigo!

À Larissa Siqueira Chaves, eterna amiga que tem seu lugarzinho reservado no meu coração. Obrigada por tudo! Você é uma amiga valiosa e jamais quero perdê-la de vista. Também a Beatriz Brabetz e Ana Paula grandes e inesquecíveis amigas.

A todos que de alguma forma se relacionaram comigo e colaboraram, mesmo que apenas com um sorriso, algo que pra mim já vale muito, obrigada por tudo.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP -processo 2011/04053-6) pelo apoio financeiro, à Universidade Estadual Paulista (UNESP), por ceder suas estruturas para realização desse trabalho.

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu
tamanho original”
(Albert Einstein)*

RESUMO

A associação entre formigas cortadeiras da tribo Attini e micro-organismos é reconhecidamente vasta. No presente trabalho verificou-se a presença de variados táxons de fungos relacionados às operárias da formiga cortadeira *Atta laevigata*. Operárias foram coletadas do interior do ninho e na trilha de forrageio, nas cidades de Rio Claro e Bauru, e parte dessas formigas passaram por um procedimento de limpeza para retirada de micro-organismos externos ao corpo e a outra parte não foi submetida à lavagem. Dos dois grupos o DNA foi extraído e amplificado para a região rRNA ITS de fungos. Essa região foi sequenciada e utilizada na identificação de unidades taxonômicas moleculares operacionais (MOTUs). Cinquenta táxons moleculares foram identificados, sendo vinte contaminantes eventuais, facilmente removíveis pela limpeza, e 30 simbiosites internos ou mais fortemente aderidos ao corpo das operárias. Dentre esses 30 táxons, quatro (*Cladosporium cladosporioides*, *Epicocum* sp., *Hypocrea virens* e *Nigrospora* sp.) foram identificados nas duas localidades geográficas e em grande quantidade, sendo candidatos a simbiosites mais estáveis e funcionais das formigas. Entre os demais táxons prospectados houve grande frequência de *Trichosporon chiarelli* e *Corioloopsis rigida*. Esse trabalho demonstrou ampla capacidade das formigas adquirirem e transportarem uma variada microbiota e consiste num passo inicial para elucidar o papel dos fungos associados ao corpo de *A. laevigata*.

Palavras chaves: simbiose, dispersão fúngica, ascomicetos, basideomicetos.

ABSTRACT

There is a deep and widely known association among Attini ants and microorganisms. In this paper it was investigated the presence of various taxa of fungi related to the Attini leaf-cutter ant *Atta laevigata*. Leafcutter ants were collected from inside the nests and foraging trails in two different localities (Rio Claro and Bauru), and they were washed in order to remove external microorganisms from their bodies. Leafcutters which have not been washed also were used. Ant DNA was extracted and purified and the fungal rRNA ITS region was amplified. PCR products were cloned and sequenced in order to identify fungal species based on the operational molecular taxonomic unit (MOTU) criteria. As a result, 50 fungal species were recognized; 20 of them were identified as casual contaminants and as 30 were found as symbionts more tightly adhered to ant body. Four out of these 30 symbionts (*Cladosporium cladosporioides*, *Epicocum* sp., *Hypocrea virens* and *Nigrospora* sp.) were identified in the two geographic localities and in large quantity. Thus, these are candidates to a more stable and functional symbionts of the ants. There were large quantity of the *Trichosporon chiarelli* and *Corioloropsis rigida* among the prospected ants. This paper shows the enhanced capacity of the ants to acquiring and transporting a varied of fungi and it is in an initial point to elucidate the role of fungi associated to the body of *A. laevigata*.

Key words: symbiosis, fungic dispersion, ascomycetes, basidiomycetes.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. FORMIGAS ATTINI	10
1.1.1 <i>Caracterização dos tipos de operárias</i>	11
1.1.2 <i>Castas de formigas cortadeiras</i>	14
1.2. TIPOS DE SISTEMAS AGRÍCOLAS E CULTIVARES DE FUNGOS EM ATTINI.....	15
1.3. OUTROS SIMBIONTES JÁ DESCRITOS EM ATTINI	16
1.4. FORMIGAS COMO VETORES DE MICRO-ORGANISMOS.....	18
1.5. CRITÉRIOS PARA ESCOLHA DE SIMBIONTES FUNCIONAIS EM NINHOS DE ATTINI	18
1.6. MÉTODOS INDEPENDENTES DE CULTIVO UTILIZADOS NA ANÁLISE DA DIVERSIDADE DE FUNGOS NOS INSETOS, VANTAGENS E DESVANTAGENS.	19
1.7. O ESTUDO DE RELAÇÕES SIMBIÓTICAS BASEADO EM MÉTODOS INDEPENDENTES DE CULTIVO	21
1.8. ESPAÇADORES TRANSCRITOS COMO MARCADORES MOLECULARES DE FUNGOS.....	21
1.9. AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DA REGIÃO ITS DE FUNGOS	22
1.10. ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	22
1.10.1 <i>Seleção dos dados de boa qualidade</i>	23
1.10.2 <i>Checagem de quimeras</i>	23
1.10.3 <i>Unidade taxonômica operacional molecular (MOTU)</i>	24
1.10.4 <i>MOTHUR</i>	25
2. OBJETIVOS	26
3. RESULTADOS	27
DIVERSIDADE DE FUNGOS ASSOCIADOS A OPERÁRIAS DA FORMIGA CORTADEIRA ATTA LAEVIGATA (FORMICIDAE: ATTINI)	27
RESUMO	27
INTRODUÇÃO	28
MATERIAL E MÉTODOS	29
ÁREAS DE ESTUDO	29
COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	29
EXTRAÇÃO DE DNA	30
AMPLIFICAÇÃO	31
PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR	31
CLONAGEM	31
SEQUENCIAMENTO	32
ANÁLISE DE DADOS	32
RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
ABUNDÂNCIA E DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE FUNGOS ASSOCIADOS AO CORPO DAS FORMIGAS	33
EFEITO DO PROCEDIMENTO DE LAVAGEM SOBRE AS ESPÉCIES DE FUNGOS ASSOCIADAS ÀS FORMIGAS	34
VINTE TÁXONS DE FUNGOS FORAM ELIMINADAS PELO PROCEDIMENTO DE LAVAGEM DAS FORMIGAS	36
QUATORZE TÁXONS DE FUNGOS RESISTIRAM AO PROCEDIMENTO DE LAVAGEM DAS FORMIGAS	36
DEZESSEIS TÁXONS DE FUNGOS FORAM DETECTADOS SOMENTE EM FORMIGAS LAVADAS	37
EFEITO DO PROCEDIMENTO DE LAVAGEM SOBRE A AMOSTRAGEM DE FUNGOS ASSOCIADOS ÀS FORMIGAS	41
FUNGOS SIMBIONTES DAS FORMIGAS E PROVÁVEIS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS.....	41
OS PROVÁVEIS FUNGOS SIMBIONTES FUNCIONAIS DAS FORMIGAS <i>A. LAEVIGATA</i>	44
TRANSFERÊNCIA DE FUNGOS ENTRE FORMIGAS E PLANTAS.....	45
CONCLUSÕES	46
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
REFERÊNCIAS	49

1. INTRODUÇÃO

1.1. Formigas attini

As associações simbióticas modelam a ecologia e a evolução de todos os organismos vivos. As formigas Attini são uma oportuna fonte de informação sobre a origem dessas associações e seus mecanismos genéticos e moleculares, pois apresentam grande capacidade de cooperar com diversos organismos.

Todas as espécies de formigas estão agrupadas na família Formicidae, que possui 21 subfamílias. Dentro da subfamília Myrmicinae está a tribo Attini, um grupo monofilético que reúne todas as formigas cultivadoras de fungos mutualistas, pertencentes a 13 gêneros (*Acromyrmex*, *Apterostigma*, *Atta*, *Cyphomyrmex*, *Mycetagroicus*, *Mycetarotes*, *Mycetophylax*, *Mycetosoritis*, *Mycocepurus*, *Myrmicocrypta*, *Pseudoatta*, *Sericomyrmex*, *Trachymyrmex*) e mais de 230 espécies (SCHULTZ; MEIER, 1995; SCHULTZ; BRADY, 2008).

Figura 1: Cabeça de um soldado de *A. laevigata*. Retirado de ANTWEB, código da espécie: CASENT0173811. Fotografia: Michele Esposito. Foto retirada em Amambay, Paraguai.



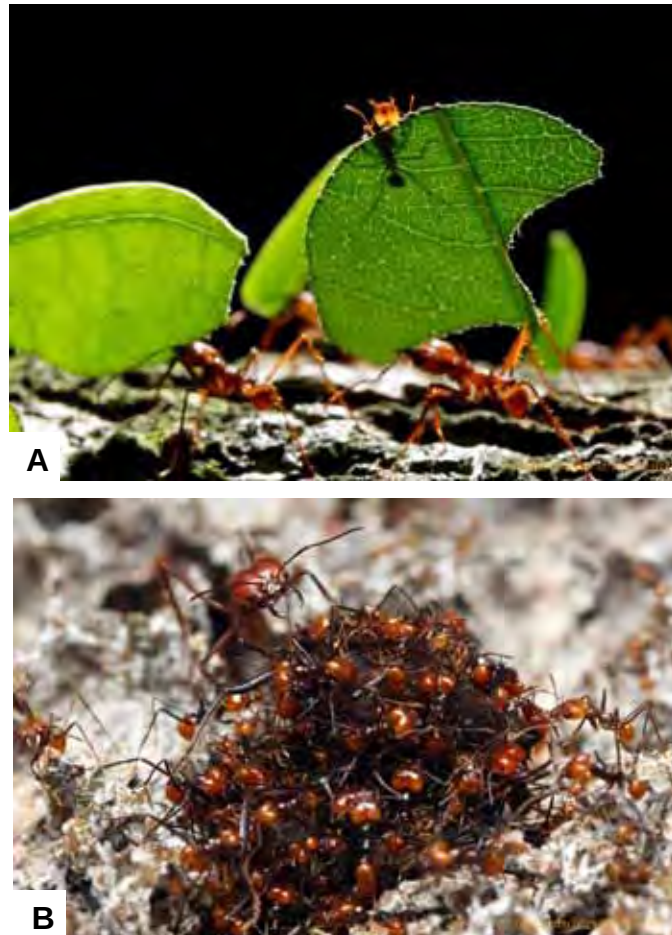
1.1.1 Caracterização dos tipos de operárias

Colônias de formigas cortadeiras são organizadas por grupos de indivíduos morfologicamente diferentes (polimorfismo), configurando castas (LATREILLE, 1796) diversas. Também são organizadas conforme a função exercida no ninho (polietismo).

Num ninho de formigas cortadeiras podem ser encontradas castas temporárias, químicas e comportamentais, como são definidas a seguir:

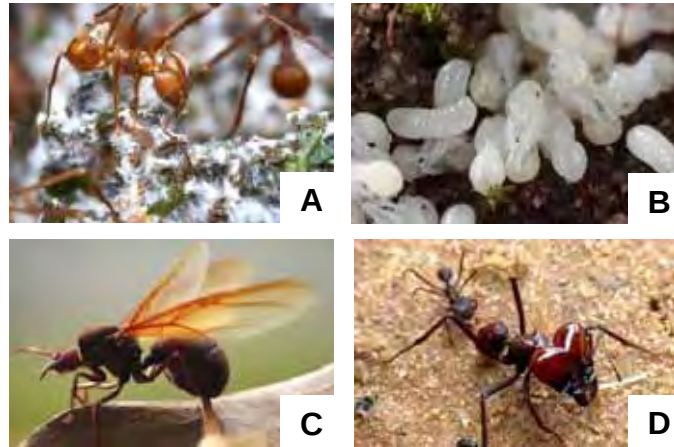
Castas temporárias: designada pela idade, normalmente os indivíduos mais jovens realizam tarefas no interior dos ninhos e conforme vão envelhecendo passam às tarefas externas.

Figura 2: Operárias de *A. laevigata*. **A:** forrageira cortando material vegetal para levar ao ninho. **B:** jardineiras e generalistas trabalhando no interior do ninho. Imagens: Alex Wild.



Castas químicas: os sinais que as formigas emitem ou recebem são percebidos de forma diferente por cada tipo de indivíduo da colônia, por isso são denominadas castas diferentes para cada tipo de sinal.

Figura 3: Castas de *A. laevigata*, cada uma recebe um tipo diferente de sinal emitido pelas demais operárias. **A:** generalistas cuidando do ninho; **B:** pupas; **C:** a rainha; **D:** soldado protegendo a colônia. Fotos retiradas do site AntWeb.



Castas comportamentais: designadas pelo estado fisiológico principal, mas não necessariamente associado à anatomia ou idade, um exemplo é a inseminação.

Figura 4: Castas comportamentais de *A. laevigata*. **A:** fêmea; **B:** macho inseminando a rainha. Fotos retirada em Itirapina – SP pela autora Joana D. Mantovani.





1.1.2. Castas de formigas cortadeiras

As castas temporárias em formigas cortadeiras constituem as fêmeas e machos alados que são encontrados apenas em épocas específicas nas colônias, vindo à superfície dos ninhos durante o vôo nupcial.

As fêmeas de *Atta* são aladas e os maiores indivíduos do formigueiro, elas são as primeiras a deixar o ninho durante o vôo nupcial, são também muito longevas, chegando a durar 10 anos. Os machos possuem o tórax e o abdômen muito desenvolvidos. Atuam no processo de aeração das larvas e no resfriamento da colônia com o bater das asas. Sua longevidade é pequena.

As demais operárias que fazem parte do formigueiro encarregam-se das tarefas da colônia e são estéreis. Segundo WILSON (1980) são distinguidos os seguintes tipos de operárias:

Jardineiras e babás: operárias mínimas que cuidam das hifas, do tratamento final na implantação do substrato, da prole, de “andar de carona” sobre o material vegetal transportado afim de proteger contra o ataque de forídeos, eliminação de esporos contaminantes nas folhas e coleta e armazenamento da seiva (VIEIRA-NETO et al., 2006).

Generalistas dentro do ninho: degradam a vegetação antes de incorporá-la ao jardim de fungo, transporte de outras operárias, assistência à prole durante a ecdise, cuidados com a rainha, descarte do lixo e reconstrução das esponjas de fungos.

Forrageadoras e escavadoras: exploram, coletam a vegetação nova, cortam e recuperam a vegetação, além de escavar o ninho.

Defensoras ou soldados: maiores operárias, em caso de perigo para a colônia atuam como defensores retirando primeiramente a prole e a seguir o fungo, ao evacuarem uma câmara.

Figura 5 : Castas típicas de formigas costadeiras. Extraído de FORMICIDAS MIREX, imagem do Professor Dr. Luiz Carlos Forti - UNESP Botucatu.

LARGURA DA CABEÇA (MM)	DESCRIÇÃO	TAREFAS TÍPICAS MAIS COMUNS	IMAGEM
1,0	Jardineiras ou enfermeiras, com no máximo 2mm de comprimento de corpo	Cuidam do jardim de fungo, incorporam os vegetais na cultura de fungo, inoculam hifas de fungo no novo substrato, lambem as partículas vegetais, limpam e alimentam outros indivíduos.	
1,4	Generalistas - são médias ou pequenas e trabalham dentro do ninho.	Cortam os vegetais dentro do ninho, incorporam vegetais na cultura de fungo, lambem os vegetais, cuidam da rainha e levam partículas de vegetal exaurido para as câmaras do lixo.	
2,2	Forrageiras e escavadoras (formigas médias a grandes)	São escoteiras, recrutam outras formigas, cortam e transportam vegetais, escavam o ninho.	
3,0	Soldados	Defendem o ninho.	
2,9	Machos (bitús)	Fertilizam a rainha	
5,2	Rainhas (iças, tanajuras)	Fundam as colônias, produzem vários tipos de ovos e propagam a espécie.	

1.2. Tipos de sistemas agrícolas e cultivares de fungos em attini

A tribo de formigas Attini (Formicidae: Mirmicinae) é caracterizada por estabelecer um tipo de sistema agrícola de acordo com o fungo cultivado. MEHDIABADI & SCHULTZ (2009) classificaram filogeneticamente cada um desses sistemas:

- **Agricultura basal**, praticada pela maioria das espécies atíneas e na qual são cultivados variadas espécies de fungos da família Leucocoprineae;
- **Agricultura dos fungos de coral** praticada por formigas do grupo *Apterostigma pilosum* que cultivam fungos pertencentes à família Pterulaceae (gêneros *Pterula* and *Deflexula*);
- **Agricultura leveduriforme** praticada por formigas do grupo "*Cyphomyrmex rimosus*" que cultivam uma fase unicelular (leveduriforme) dos fungos da família Leucocoprineae;

Pseudonocardia. Elas se localizam no integumento das operárias e atuam como agentes supressores de doenças que possam existir no jardim de fungos das Attini (MULLER et al., 2008). Cafaro et al. (2010), analisando diferentes operárias de gêneros de Attini (basais e derivados), apontou ubiquidade de *Pseudonocardia* spp. E, interessantemente, observou a dificuldade de isolar esses micro-organismos em *Attasp*. Isso, hipoteticamente se relaciona ao fato de as cortadeiras processarem o material vegetal antes de servi-lo ao seu fungo, restando assim poucos actinomicetos, e também pelo seu intenso cuidado com o jardim, redistribuindo os micro-organismos por diferentes locais dentro do ninho.

Ribeiro et al. (2012) detectaram espécies de *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Mucor* sp. e *Penicillium* sp. com potenciais efeitos deletérios a operárias de *Atta bisphaerica*.

Rodrigues et al. (2009) encontraram espécies de leveduras dos gêneros *Aureobasidium* sp., *Candida* sp., *Cryptococcus* sp., *Saccharomyces* sp., *Bullera* sp., *Bulleromyces* sp., *Pseudozima* sp., *Rhodosporidium* sp., *Rhodotorula* sp., *Sporidiobolus* sp., *Sporisorium* sp., *Sympodiomyces* sp. e *Trichosporon* sp. associadas aos jardins de *Atta texana*.

Em ninhos de *Atta sexdens*, Carreiro et al. (2004) identificaram a presença de uma nova espécie de levedura, *Sympodiomyces attinorum*. Também em ninhos de *A. sexdens*, Middelhoven et al. (2003) descreveram o isolamento da levedura *Cryptococcus haglerorum*. Já em um estudo com um ninho de *Myrmicocryptasp*., Pagnocca et al. (2012) descreveram o isolamento de uma nova espécie de levedura, denominada *Trichosporon chiarellii*.

Leveduras negras também foram consideradas na rede de associações que ocorre em formigas Attini. Little e Currie (2007) identificaram a presença de leveduras do gênero *Phialophora* na parte ventral do abdômen de formigas do gênero *Apterostigma* sp. Guedes et al. (2012) também relataram a presença de leveduras negras dos gêneros *Alternaria*, *Bipolaris*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Paraphaeosphaeria* e *Phoma*, além de outros fungos (hialinos) dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Paecilomyces* e *Penicillium* em ninhos de *Atta laevigata*.

1.4. Formigas como vetores de micro-organismos

O forrageio realizado pelas formigas cortadeiras introduz uma série de micro-organismos novos ao jardim. As operárias cortam as folhas, carregam até o ninho, processam o material e o usam como substrato para o crescimento de seus fungos simbiotes. Nesse processo, outros fungos presentes no ambiente (solo, folhas, flores) podem ser introduzidos. Definir que fungos são esses e quais seus papéis ecológicos junto ao ninho das formigas é uma tarefa complexa.

Por exemplo, microfungos dos gêneros *Cunninghamella*, *Fusarium*, e *Trichoderma* são frequentemente encontrados em ninhos de *Atta* e *Acromyrmex* (RODRIGUES et al., 2005, 2008), mas, até o momento, não há evidências conclusivas sobre a função que estes fungos poderiam apresentar para a vida das formigas.

Uma elucidação sobre o papel ecológico de alguns destes micro-organismos é a observação de que a presença de endofíticos nas folhas pode ser um fator limitante para o sucesso do jardim. Os endofíticos presentes nas folhas poderiam, ao serem introduzidos nos jardins, competir com o fungo mutualista. Sendo assim, as formigas cortadeiras gastariam uma boa parte do seu tempo de forrageio “esterelizando” o material vegetal que vai para o ninho numa tentativa de diminuir a quantidade de fungos externos (VAN BAEL et al., 2009; VAN BAEL et al., 2012).

1.5. Critérios para escolha de simbiotes funcionais em ninhos de attini

As formigas interagem com diferentes micro-organismos do ambiente. Por onde passam carregam esporos fúngicos. O material coletado também é fonte de aquisição de micróbios.

Quando as operárias cortam folhas, como no caso de *Atta* e *Acromyrmex*, podem adquirir endofíticos que são incorporados aos ninhos. O processo de limpeza e cuidado com o jardim auxilia no controle desses simbiotes eventuais. Entretanto, alguns deles podem persistir, causando efeitos deletérios aos jardins e/ou às próprias operárias.

Essa persistência dependerá de quão infectado está o material vegetal ou o ambiente pelo qual o inseto forrageia. E, em se tratando de fungos, isso é ainda

mais complexo, pois eles produzem esporos que podem resistir ao cuidado extremado exercido pelas operárias, permanecer em seu exoesqueleto e pernas e serem carregados para dentro dos ninhos (GANTER, 2006).

Alguns dos simbioss representam uma associação efêmera com formigas, sendo fungos que podem estar presentes no ambiente pelo qual as operárias forrageiam. Uma abordagem técnica para eliminar esses possíveis contaminantes é utilizar uma estratégia de “limpeza” da superfície das operárias. Isso facilitaria a pesquisa de fungos no seguinte aspecto: a remoção da camada externa de fungos ou fungos que não se aderiram à cutícula das operárias resultaria na manutenção de um grupo de fungos que está mais fortemente ligado aos insetos, com maiores chances de adentrarem o ambiente do formigueiro e constituírem alguma forma de relação ecológica com as formigas. Além disso, uma segunda abordagem para estudar o papel dos organismos simbioss seria a utilização de um critério geográfico, que pode auxiliar na identificação de simbioss persistentes. Ninhos de localidades diferentes geralmente apresentam micro-organismos variados, mas quando um mesmo micróbio é encontrado em ninhos de locais distintos, pode haver indício de uma relação mais perene e estreita entre formigas e simbioss.

A utilização de um procedimento experimental de limpeza e a escolha de ninhos de diferentes localidades geográficas foram estratégias utilizadas no presente trabalho para identificar os simbioss funcionais entre os micro-organismos prospectados junto às formigas.

1.6. Métodos independentes de cultivo utilizados na análise da diversidade de fungos nos insetos, vantagens e desvantagens.

Os micro-organismos são essenciais na natureza, entretanto são muito pouco conhecidos. O número de táxons descritos representa apenas uma porção da diversidade que pode ser existir no meio ambiente. Os métodos moleculares, independentes de cultivos têm ajudado a diminuir esse abismo entre o real número de espécies que existe no ambiente e as que realmente conhecemos. Eles revelam um cenário de rica diversidade, no qual ainda falta muito estudo (WARD et al., 1990; LUDWIG et al., 1997; HUGENHOLTZ et al., 1998). A Tabela 1 mostra a dimensão dessa diversidade.

Tabela 1: Número de espécies baseado em estimativas. Retirado de MANFIO (2003)

Grupo ^b	Número aproximado de espécies conhecido	Número estimado de espécies	No. conhecido como % do no. estimado
Plantas			
Algas	40.000	60.000	67
Dicotiledôneas	170.000		
Pteridófitas	10.000		
Monocotiledôneas	50.000		
Musgos	17.000	25.000	68
Animais			
Aves	9.000	9.100	~100
Peixes	19.000	21.000	90
Insetos	800.000	2.000.000 a 80.000.000	1 a 40
		ou 5.000.000 a 10.000.000 ^c	ou 8 a 16
Mamíferos	4.000	4.000	~100
Nematóides	15.000	500.000	3
Répteis e anfíbios	9.000	9.500	95
Microrganismos			
Fungos	69.000	1.500.000	5
Procariotos ^d	4.760	40.000 a 3.500.000	0.1 a 12
Protozoários	30.800	100.000	31
Vírus	5.000	130.000	4

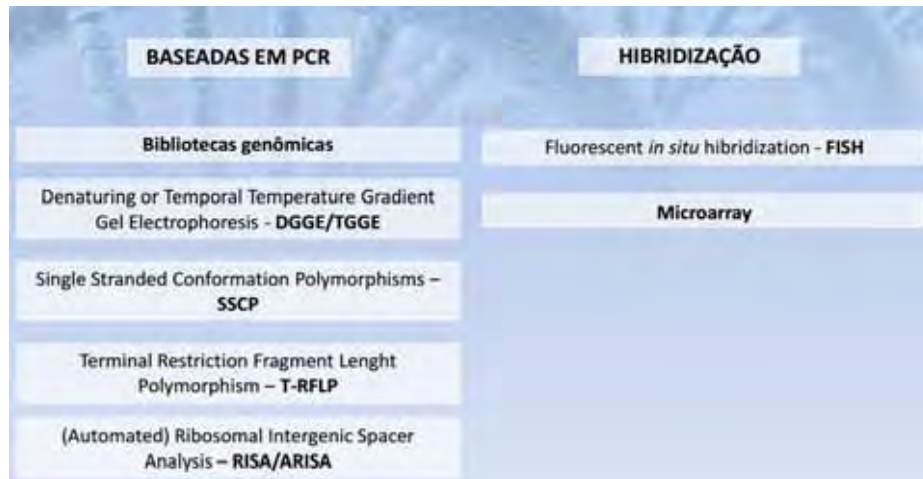
O isolamento de micro-organismos deu-se principalmente pela necessidade de conhecer sobre aqueles que causavam doenças ao homem e aos animais (ATLAS; BARTA, 1998). Entretanto dados indicam que apenas uma pequena parcela dos micro-organismos da natureza é cultivável, <0,1 a 1 % (AMANN et al., 1995). Muitos fatores são responsáveis pela dificuldade de cultivar esses organismos na natureza, tais como:

- pouco conhecimento sobre os requisitos nutricionais e biologia dos organismos;
- distribuição numérica desigual de táxons na natureza;

A vantagem de trabalhar com métodos não cultiváveis, além de atingir uma diversidade maior que métodos de cultivo, é poder lidar com qualquer ambiente, de lodo de esgoto até insetos e pele humana, basta padronizar um método de extração de DNA da amostra, amplificar para região específica do organismo a ser estudado e pronto, atinge-se a diversidade de qualquer local ou indivíduo.

São várias técnicas existentes para utilização de métodos independentes, tais como as mostradas no infográfico:

Figura 7: Métodos independentes de cultivo para estudos de diversidade.



1.7. O estudo de relações simbióticas baseado em métodos independentes de cultivo

Os estudos de diversidade sem a utilização de isolamento de micro-organismos (métodos independentes de cultivo) contam com uma sequência básica de técnicas moleculares que tem ajudado a entender melhor a diversidade microbiana, permitindo uma detecção de grande número de micro-organismos, o que contribui para caracterizar comunidades microbianas. Os métodos independentes de cultivo utilizam como marcadores moleculares genes que permitem a análise de variabilidade dentro de uma mesma espécie e de uma dada espécie com outras dentro de um mesmo grupo (variabilidade intra e interespecífica) (NILSSON et al., 2008).

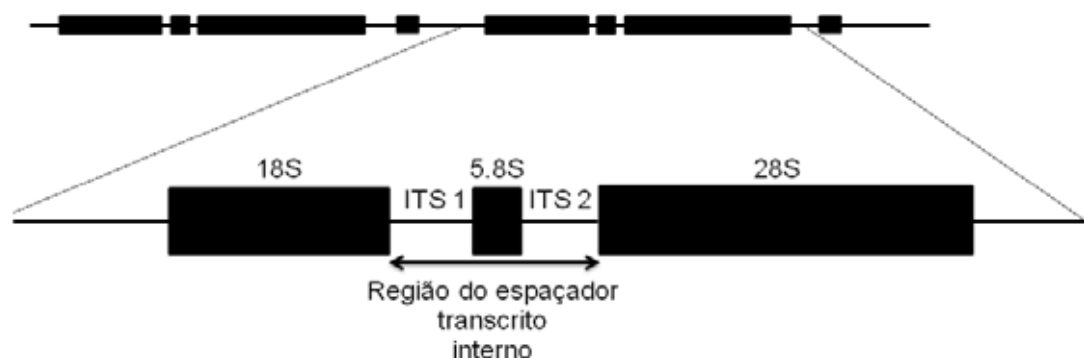
1.8. Espaçadores transcritos como marcadores moleculares de fungos

O *cistron* eucariótico rRNA consiste nos genes 18S, 5.8S e 28S transcritos pela ação da RNA polimerase I. No processo pós-transcricional ocorre a quebra do

cistron, removendo os espaçadores internos transcritos (ITS) 1 e 2. No *cistron*, os espaçadores ladeiam o gene 5.8S, formando uma região ITS1-5.8S-ITS2 contígua que, conjuntamente é denominada região ITS.

A região ITS (Figura 1) apresenta múltiplas cópias no genoma fúngico, o que facilita sua amplificação visando posterior sequenciamento (SCHOCH et al., 2012). Além disso, esse segmento tripartido combina vantagens de resolução em várias escalas evolutivas (ITS1: evolução rápida, 5.8S: altamente conservado, ITS2: evolução rápida a moderada) (NILSSON et al., 2008). Tais características possibilitaram a utilização da região ITS como um marcador padrão para identificação molecular de fungos (NILSSON et al., 2008; SCHOCH et al., 2012).

Figura 7– Região ITS de fungos.



1.9. Amplificação e clonagem da região ITS de fungos

A partir de uma amostra de DNA ambiental, a amplificação com *primers* específicos para a região ITS resulta em uma população de *amplicons* que pode ser utilizada na tentativa de traduzir a diversidade de fungos presentes na amostra. Para possibilitar sequenciar individualmente cada um dos *amplicons* (ou ao menos uma boa parte deles), pode ser utilizada uma técnica de clonagem. Os clones, a seguir podem ser sequenciados, de modo a fornecer a sequência de nucleotídeos de cada um dos *amplicons* representando a diversidade de regiões ITS da amostra.

1.10. Análise *in silico*

Para construir hipóteses a respeito das sequências geradas num estudo, é primordial que se utilize um critério para seleção de sequências de boa qualidade técnica. Tal processo de seleção envolve várias etapas, conforme descrito a seguir.

1.10.1. Seleção dos dados de boa qualidade

Inicialmente, é necessário tratar os dados brutos gerados pelo sequenciador de DNA, eliminando os dados de baixa qualidade. A medida da qualidade pode ser feita através do cálculo do valor Phred (EWING et al., 1998; EWING; GREEN, 1998; PROSDOCIMI, 2006).

Posteriormente, devem ser verificadas e filtradas sequências contaminantes como *primer* e vetor.

Após a identificação de trechos de sequência com baixa qualidade e com possíveis contaminantes, essas regiões são mascaradas (marcadas) e retiradas da sequência final.

Já limpas, é possível ainda filtrar as sequências por tamanho, descartando sequências menores que um tamanho pré-determinado. Geralmente os filtros descartam sequências menores que 100 pb.

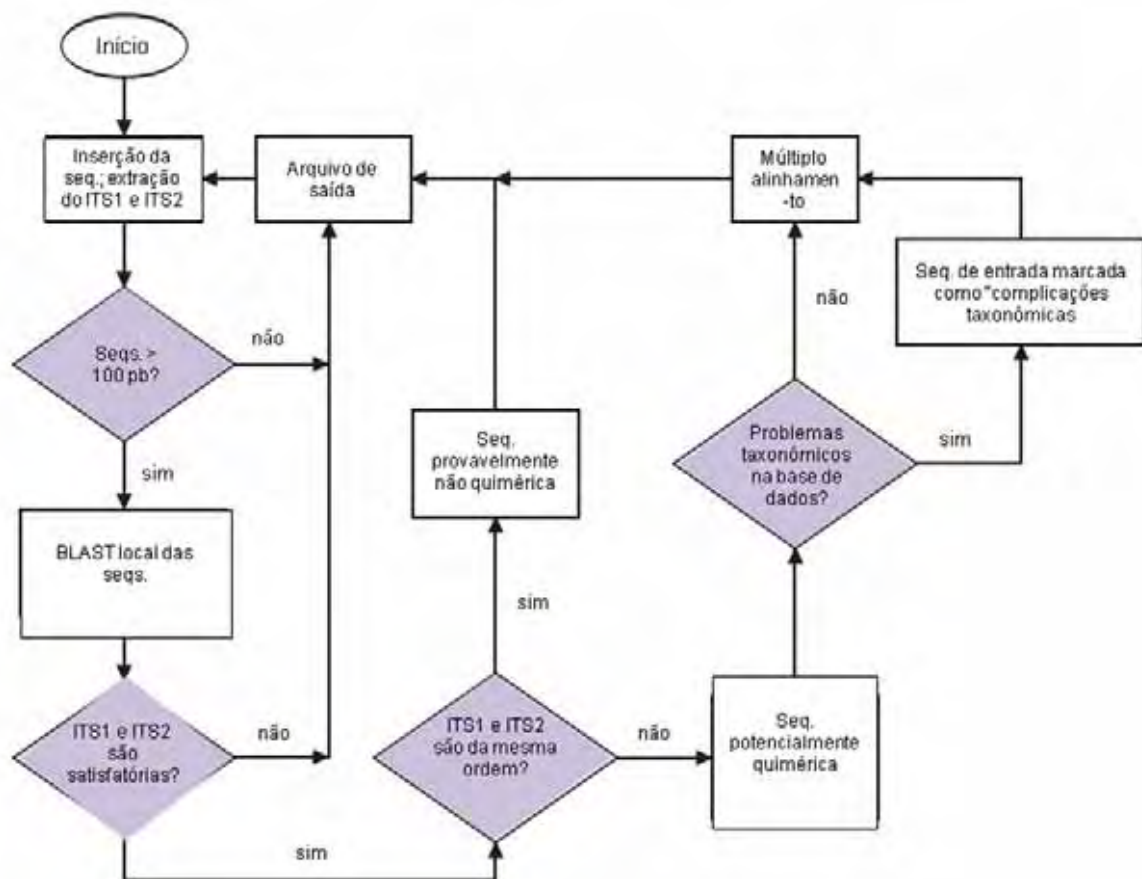
1.10.2. Checagem de quimeras

Boa porcentagem das sequências depositadas nos bancos de dados são amplificações quiméricas (HIBBETT et al., 2011), geradas acidentalmente durante a reação da polimerase em cadeia.

Essas sequências representam um misto de dois táxons numa mesma sequência e não têm significado ecológico. A fim de eliminar esses erros é necessário identificar essas sequências antes de prosseguir com as análises. O programa *Chimera checker* (NILSSON et al., 2010) analisa sequências que são geradas a partir da região ITS do DNA de fungos. O algoritmo é responsável por separar a sequência de interesse em duas partes (ITS1 e ITS2), e então realizar um

alinhamento no Banco de Dados NCBI de cada parte da sequência. Se as sequências pertencerem a ordens diferentes a sequência é potencialmente quimérica. São gerados arquivos de saída que permitem ainda uma análise manual das sequências para confirmação das quimeras. A Figura 2 apresenta essas etapas descritas.

Figura 7 - Esquema do processo de identificação de quimeras utilizado pelo programa *Chimerachecker*. Traduzido e adaptado de NILSSON et al., 2010.



1.10.3. Unidade taxonômica operacional molecular (MOTU)

Estimar a identidade e o número de espécies, utilizando critérios taxonômicos pode ajudar a entender a complexa realidade ecológica de um ambiente. Para obter tais estimativas, é possível basear-se nas sequências nucleotídicas para uma

amostra. Para que isso seja plausível é necessária uma maneira de associar dados das sequências com a classificação taxonômica dos organismos. Tal associação se faz utilizando o critério de Unidade Operacional Taxonômica Molecular (MOTU). Nessa abordagem não há o conceito tradicional de espécie, mas apenas populações de sequências similares entre si, que compõem um *pool* gênico (ZANDER, 2007), considerado como uma unidade taxonômica operacional molecular. Usualmente, para a região ITS de fungos, considera-se que sequências ao menos 97% semelhantes entre si pertençam à mesma MOTU (LANDEWWERT et al., 2003; O'BRIEN et al., 2005; SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005; HIBETT et al., 2011).

1.10.4. MOTHUR

A plataforma Mothur (SCHLOSS ET AL., 2009) foi criada reunindo ferramentas necessárias para estudos envolvendo sequências de micro-organismos, com a finalidade de subsidiar estudos independentes de cultivo. Com ela é possível analisar as sequências obtidas de uma determinada amostra, organizar tais sequências em MOTUs e fazer comparações entre diferentes ambientes através da geração de índices de riqueza, estimadores de espécies e curvas de rarefação.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Analisar a diversidade de fungos associados às formigas cortadeiras da espécie *Atta laevigata* (Hymenoptera: Formicidae) de duas localidades no estado de São Paulo: Bauru e Rio Claro.

Objetivos específicos:

- Identificar fungos com base nos espaçadores internos transcritos do RNA ribossomal;
- Avaliar padrões de diversidade fúngica entre diferentes localidades geográficas: Bauru – SP e Rio Claro – SP;
- Verificar a utilidade de um método de limpeza para retirar fungos presentes no exoesqueleto das operárias de formigas da espécie *A. laevigata*;
- Comparar a diversidade de fungos antes e após a utilização de um método de limpeza do exoesqueleto;
- Estabelecer inferências a respeito de possíveis funções dos fungos prospectados, utilizando os dados gerados no presente trabalho e os dados de literatura.

Forma de apresentação dos resultados

O presente trabalho é apresentado na forma de um artigo científico, visando formatar os dados para futura publicação.

3. RESULTADOS

DIVERSIDADE DE FUNGOS ASSOCIADOS A OPERÁRIAS DA FORMIGA CORTADEIRA *Atta laevigata* (FORMICIDAE: ATTINI)

Resumo

As formigas da tribo Attini vivem em simbiose com diversos micro-organismos, incluindo bactérias e fungos. No presente trabalho, nós caracterizamos a diversidade de fungos associados às formigas Attini da espécie *Atta laevigata*. Para tanto, 60 operárias foram assepticamente coletadas da trilha de forrageio de três ninhos (20 indivíduos por ninho) em duas localidades geográficas distintas: uma em Bauru e outra em Rio Claro. Metade das formigas de cada ninho foi reunida em um *pool* e submetida à extração de DNA. Os indivíduos da outra metade foram, um a um, lavados com uma solução de hipoclorito de sódio 2% e submetidos ao ultrassom e, a seguir, reunidos em um segundo *pool*, que foi também submetido à extração de DNA. O DNA extraído foi amplificado na região ITS ribossomal fúngica, os produtos gerados foram clonados e a sequência de nucleotídeos foi determinada. Quatrocentas e nove sequências foram obtidas e classificadas em 50 espécies fúngicas distintas, com base no critério de unidade taxonômica operacional molecular. Entre estas 50 espécies, 20 só foram detectadas nas formigas não lavadas e foram consideradas como fungos contaminantes eventuais, com pouca capacidade de aderir ao corpo das formigas; 14 espécies não foram eliminadas pelo procedimento de lavagem e correspondem a fungos fortemente aderidos ao corpo das formigas; 16 espécies ocorreram apenas em formigas lavadas e foram consideradas como espécies de fungos presentes em menor população e também fortemente aderidas às formigas. Entre as 30 espécies aderidas ao corpo das formigas, quatro espécies (*Cladosporium cladosporioides*, *Epicocum* sp., *Hypocrea virens* e *Nigrospora* sp.) foram encontradas em ambas as localidades geográficas e foram consideradas como potenciais candidatos a simbiontes estáveis e funcionais. Com base no que se conhece na literatura sobre essas espécies, tais simbiontes funcionais poderiam atuar no metabolismo de polissacarídeos vegetais ou na produção de antibiótico úteis para as formigas. Afora estes quatro simbiontes

funcionais, a maioria dos demais fungos identificados, e que estiveram presentes somente em uma das regiões geográficas amostradas, se mostraram geneticamente semelhantes a espécies fúngicas normalmente associadas com plantas ou saprófitas decompositores de matéria vegetal. Eles são provavelmente contaminantes eventuais vetorizados pelas formigas, o que demonstra o intenso papel dessas formigas como dispersores de fungos no ambiente onde vivem. Entre os contaminantes aderidos ao corpo das formigas, duas espécies (*Trichosporon chiarelli* e *Corioloopsis rigida*) com grande capacidade de colonização são possivelmente entomopatógenos em potencial para esses insetos; e uma espécie (*Trichosporon asahii*) é um reconhecido patógeno de importância crescente para humanos imunodeprimidos.

Palavras chaves: diversidade fúngica, ascomicetos, basidiomicetos, espaçador transcrito intero de fungos.

Introdução

As relações de simbiose definem a ecologia e evolução de todos os organismos vivos. As formigas da tribo Attini são uma oportuna fonte de informação sobre a origem de tais relações e seus mecanismos genéticos e moleculares, pois apresentam grande capacidade de cooperar com diversos organismos (BACCI et al., 1995a).

Em um ninho de formigas cortadeiras é possível identificar o fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus* (MUELLER et al., 1998), cultivado pelas formigas para sua nutrição (MARTIN et al., 1969), o parasita *Escovopsis* sp. (CURRIE et al., 1999a) e bactérias do gênero *Pseudonocardia* (CURRIE et al., 1999b), que produzem antibióticos para o controle de parasitas. Além desses simbioses, os ninhos das formigas Attini contêm bactérias do gênero *Burkholderia* (SANTOS et al., 2004), bactérias que degradam celulose (BACCI et al., 1995b), microfungos (RODRIGUES et al., 2011; GUEDES et al., 2012) e leveduras (CARREIRO et al., 1997).

Levando em consideração a gama de micro-organismos que pode coexistir num ninho de formigas, o reconhecimento de novos desses micro-organismos pode

ajudar na compreensão do complexo consórcio microbiano atuando nos ninhos. Uma forma de caracterizar os componentes desse consórcio é a abordagem baseada no critério de Unidade Taxonômica Operacional Molecular (MOTU). Nesta abordagem, sequências de DNA são obtidas a partir do *pool* de micro-organismos do consórcio. A seguir, estas sequências são agrupadas por similaridade, de modo que sequências guardando grande similaridade entre si são reunidas em um único táxon ou unidade taxonômica em potencial (ZANDER et al., 2007).

No presente trabalho, nós utilizamos uma abordagem baseada em MOTU para identificar fungos associados às formigas *Atta laevigata*. Nós buscamos determinar se um determinado fungo estava fortemente aderido ou se poderia ser facilmente lavado da superfície do corpo dos insetos. Procuramos também verificar se havia algum fungo que colonizasse formigas de diferentes regiões geográficas. A forte aderência ao corpo das formigas e a presença em diferentes áreas geográficas foram interpretados como indicativos de uma associação estável entre as formigas e os fungos.

Material e métodos

Áreas de estudo

Operárias de *Atta laevigata* foram coletadas de duas áreas de estudo: dois ninhos presentes no município de Bauru (S 22° 12' 54.07", W 49° 0' 57.49" e S 22° 13' 6.17", W 49° 0' 32.54") e um ninho no município de Rio Claro (S 22° 23.697', W 47° 32.542'). Em ambas as regiões predominava a vegetação do tipo Cerrado.

Coleta e processamento das amostras

Um total de 60 operárias (20 indivíduos de cada ninho) foi coletado de trilhas e do interior dos ninhos, utilizando material estéril. Os indivíduos coletados de cada ninho foram divididos em dois grupos compostos por 10 operárias cada. O primeiro grupo foi submetido a um processo de lavagem para retirada de material contaminante antes da extração de DNA, enquanto o segundo grupo não passou pelo procedimento de lavagem.

O procedimento de lavagem seguiu o descrito em Marchiori et al. (em preparação) e foi feito da seguinte forma: cada formiga foi colocada em um microtubo, contendo 1 mL de água deionizada. Procedeu-se à agitação em *vórtex* por 10 seg. Os tubos foram então colocados em sonicador de ultrassom por 10 min. As formigas foram transferidas para novos microtubos, com auxílio de pinças estéreis. Acrescentou-se 1 ml de hipoclorito de sódio 2 % e a mistura foi submetida a agitação por 10 seg em *vórtex* e a 10 min no sonicador. As formigas foram transferidas para novos microtubos, foi adicionado 1mL de água deionizada, novamente agitando-se em *vórtex* e levando ao sonicador por mais 10 min. Por fim, cada amostra foi armazenada em novo microtubo.

Extração de DNA

A extração de DNA foi feita com o *pool* de 10 formigas do grupo “lavado” e o *pool* de 10 formigas do grupo “não lavado”, para cada ninho. Em um cadinho contendo as formigas, foi acrescentado nitrogênio líquido e, então, procedeu-se a maceração com pistilo. O material completamente macerado foi transferido para microtubos de 1,5 ml, aos quais foram adicionados 100 µL de tampão de lise (Tris-NaCl-Sacarose-EDTA-SDS), repetindo a maceração. Foram acrescentados mais 100 µL de tampão e as amostras incubadas a 58 °C por 1 h e 30 min. Após centrifugação por 30 seg a 10.000 rpm, foram acrescentados 56 µL de NaCl 5M e 40 µL de CTAB 10%, sendo a mistura homogeneizada por inversão. As amostras foram incubadas a 65 °C por 10 min e centrifugadas por 30 seg a 10.000 rpm. Foram adicionados 600 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e a mistura homogeneizada por inversão dos tubos durante 5 min. Adicionou-se 90 µL de acetato de amônio 5 M, com nova homogeneização por inversão dos tubos. As amostras foram incubadas em gelo por 10 min e centrifugadas a 14.000 rpm também por 10 min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de 1,5 ml. Foram adicionados 200 µL de etanol 100%, seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi retirado e acrescentou-se 500 µL de etanol 70% gelado, centrifugando-se a amostra a 14.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi novamente retirado e foram adicionados mais 500 µL de etanol 100% com nova centrifugação a 14.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi novamente retirado, o DNA permaneceu secando por 12 h à temperatura

ambiente e foi ressuspenso em 30 μ L de *Low TE* (TE: 1:9). O tampão TE (Tris 10 mM e EDTA 0,1 em pH=8,0) foi feito utilizando Tris Base (Promega Cat.#H5135) e EDTA (Promega Cat.# 5032). As amostras foram armazenadas a -20 °C.

Amplificação

Foi utilizado o *PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads kit* (GE Healthcare, catálogo número 27-9557-01). A montagem das reações partiu de 50 ng de DNA e 10 pmol de cada *primer* ITS1F e ITS4 (MANTER; VIVANCO, 2007), num volume final de 25 μ L. As amplificações iniciaram-se com uma desnaturação de 5 min a 95 °C, seguida por 32 ciclos (95 °C por 30 seg, 55 °C por 30 seg, 72 °C por 60 seg) e uma extensão final a 72 °C por 10 min.

Purificação dos produtos de PCR

Para purificação foi utilizado o *Nucleo Spin Gel and PCR Clean upkit* (MACHEREY-NAGEL), seguindo recomendações dos fabricantes.

Clonagem

A clonagem foi realizada utilizando-se o *pGEM®-T Cloning Kit*, (PromegaCat.# A1360). Foram utilizados 37,5 ng do produto de PCR purificado, de acordo com a razão molar 3 inserto: 1 vetor. Após ligação, foi realizada transformação em *Escherichia coli* DH5 α , adicionando-se 5 μ L da solução de inserto ligado ao vetor a 100 μ L de suspensão de células competentes em tampão CaCl₂, 100 mM. Após 20 min no gelo, foi aplicado um choque térmico a 42 °C por 1 min. As amostras foram então resfriadas em gelo por 2 min. Foram adicionados 300 μ L de meio CG (HIMEDIA CAT# M1151) sem antibiótico e as amostras incubadas a 37 °C, 180 rpm por 50 min. Em seguida, 200 μ L da cultura foram semeados em placas com meio CG ágar contendo ampicilina (20 μ g. μ L⁻¹), que permaneceram em estufa a 37 °C por 16 h. Para selecionar colônias positivas para o inserto de interesse, foi adicionado X-Gal (AMRESCO Lot 0428) ao meio de cultura em placa.

Sequenciamento

Para sequenciamento dos clones obtidos utilizou-se sequenciador ABI 3500 e o BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). As reações partiram de 700 ng de DNA e 3,2 pmol do *primer* ITS 1F num volume final de 10 µL. As reações de sequenciamento seguiram as seguintes condições: 96 °C por 2 min, seguidos de 25 ciclos (96 °C por 45 s, 50 °C por 30 seg 60 °C por 4 min).

Análise de dados

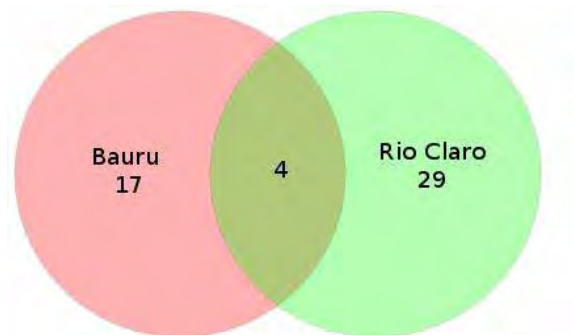
As sequências obtidas a partir dos clones selecionados foram pré-processadas pelo sistema de geração de *pipelines* EGene(DURHAM et al., 2005) no qual foram selecionadas sequências de boa qualidade (phred $\geq$ 20), livres de vetores e com ao menos a 360 pb. As quimeras foram eliminadas utilizando o programa *Chimera checker*(NILSSON et al., 2010). As sequências resultantes foram alinhadas utilizando Clustal W2 (LARKIN et al., 2007)e uma matriz de distâncias foi gerada no *DnaDist*(FELSENSTEIN, 1993) utilizando o modelo de substituição nucleotídica Kimura 2-parâmetros. Essa matriz foi utilizada na plataforma MOTHUR versão 1.24.1 (SCHLOSS et al., 2009) para classificação da diversidade fúngica, com base no critério de Unidade Taxonômica Operacional Molecular (MOTU). A similaridade considerada para agrupamento das sequências em uma MOTU foi de 97%. Sequências representativas de cada MOTU foram utilizadas para a identificação de espécies fúngicas através de comparação com sequências ITS da base de dados *Nucleotide Collection* do GenBank, utilizando a ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1990). Curvas de rarefação e diagramas de Venn foram gerados na plataforma MOTHUR.

Resultados e discussão

Abundância e diversidade de espécies de fungos associados ao corpo das formigas

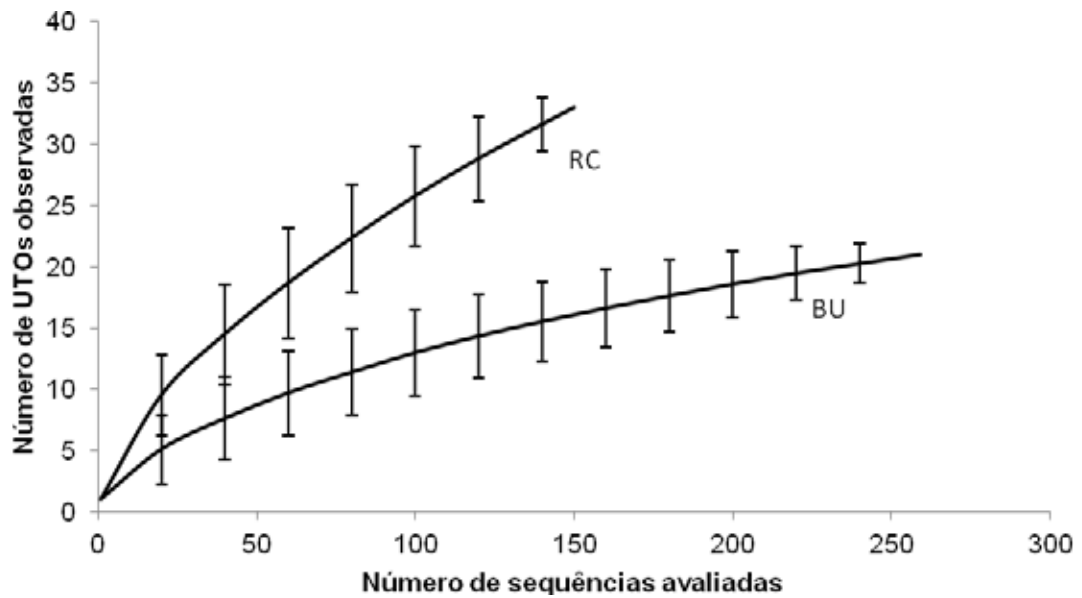
A diversidade de fungos mostrou-se maior para as formigas do ninho localizado na cidade de Rio Claro, nas quais foram encontradas 33 espécies de fungos. As formigas de Bauru, por sua vez, apresentaram 21 espécies de fungos (Figura 1). Quatro espécies de fungos estiveram presentes em formigas de ambas as localidades geográficas (Figura 1). Estas quatro espécies foram consideradas como potenciais candidatos a simbiossiontes estáveis das formigas (ver detalhes mais à frente no texto).

Figura 1 -Diagrama de Venn mostrando a quantidade e o compartilhamento de espécies entre as amostras de Bauru ou Rio Claro. Os números indicam a quantidade de espécies encontradas.



Em razão da diferença de riqueza em ninhos das localidades geográficas distintas, a curva de rarefação obtida com a amostragem em Bauru esteve próxima da saturação, o que não ocorreu em Rio Claro (Figura 2).

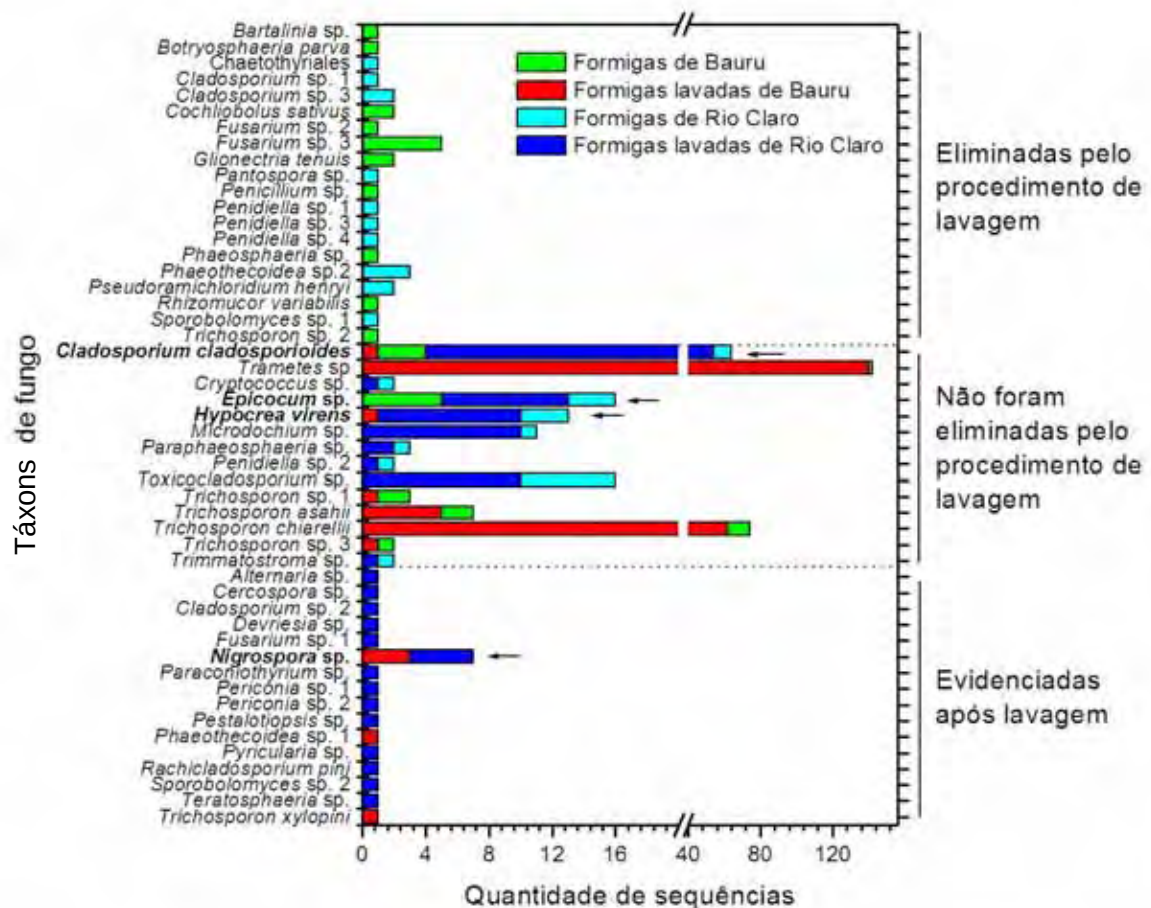
Figura 2 - Curva de rarefação para as amostras dos municípios de Bauru e Rio Claro (média $\pm$ desvio padrão).



Efeito do procedimento de lavagem sobre as espécies de fungos associadas às formigas

A Figura 3 mostra a quantidade de sequências em cada uma das espécies de fungo encontradas em formigas de cada localidade geográfica e após os diferentes tratamentos das amostras.

Figura 3 -Táxons de fungos encontradas em localidades geográficas e processamentos de amostras distintos. Entre as 30 espécies fortemente associadas ao corpo das formigas, quatro espécies (em negrito, apontadas por setas) foram encontradas em ambas as localidades geográficas e foram consideradas como potenciais candidatos a simbiossiontes estáveis e funcionais das formigas.



Devido à grande diversidade de grupos fúngicos encontrados, as sequências ITS foram muito distintas, com vários pares delas apresentando abaixo de 80% de identidade. Assim, foi impossível gerar um alinhamento múltiplo e inferir uma filogenia com segurança. Os resultados mostram várias MOTUs classificadas num mesmo gênero como, por exemplo, em três espécies de *Cladosporium*, três espécies de *Fusarium*, quatro espécies de *Trichosporon*, e assim por diante. Dentro de cada um destes gêneros, as sequências foram entre 5 e 14% distintas entre si, uma alta diversidade genética que justifica a sua classificação em táxons distintos. Possivelmente, cada um desses táxons representa uma associação característica e individualizada com as formigas.

Vinte táxons de fungos foram eliminadas pelo procedimento de lavagem das formigas

Foram encontrados 34 táxons de fungos associadas às formigas que foram processadas diretamente, sem lavagem prévia. Em formigas previamente lavadas, apenas 14 destas 34 táxons foram detectadas. Sendo assim, 20 táxons de fungos deixaram de ser encontradas após o método de lavagem ser aplicado. Estas 20 táxons eliminadas pelo procedimento de lavagem das formigas apresentavam somente uma a cinco sequências cada (Figura 3) e, portanto, provavelmente representam fungos contaminantes eventuais vetorizados pelas formigas.

A maioria dos 20 táxons foram genotipicamente semelhantes a fungos associados a plantas (Tabela 1). Portanto, essas 20 espécies de fungos devem ser originárias da contaminação a qual as formigas são submetidas durante a atividade de forrageio. Três dessas espécies podem também ser contaminações originárias do solo e duas espécie de *Cladosporium* sp. já haviam sido detectadas em jardins de fungo de Attini.

Quatorze táxons de fungos resistiram ao procedimento de lavagem das formigas

Os 14 táxons que puderam ser detectadas mesmo após o procedimento de lavagem representam fungos que provavelmente estão fortemente associados ao corpo das formigas (Tabela 2). Esses 14 táxons foram geneticamente semelhantes a fungos usualmente associados a diversos ambientes e funções. Entre estes fungos estão endofíticos, alguns dos quais capazes de desconstruir parede das células vegetais, entomopatógenos ou, então, saprófitos decompositores de vegetais mortos. De alguma forma, estes 14 fungos podem se associar mais fortemente ao corpo das formigas, o que é uma característica importante facilitando a simbiose entre formigas e fungos.

Entre estes 14 táxons fortemente associadas às formigas, três se destacaram por apresentarem um grande número de sequências, com 64, 74 ou até 142 sequências ITS detectadas em cada espécie (Figura 3). Estas três espécies foram identificadas como *Cladosporium cladosporioides*, *Trichosporum chiarelli* e

Corioloopsis rigida e representam fungos que estavam provavelmente presentes em grandes populações nas formigas amostradas. *Cladosporium cladosporioides* foi encontrado em formigas de ambas as localidades geográficas, enquanto *Trichosporum chiarelli* e *Corioloopsis rigida* foram encontrados somente em formigas de Bauru. Os 11 táxons restantes, embora mais fortemente associadas às formigas, contiveram no máximo 16 sequências cada (Figura 3) e, portanto, representam provavelmente fungos de menor prevalência relativa e que não conseguem colonizar em grandes populações as operárias.

Dezesseis táxons de fungos foram detectados somente em formigas lavadas

Após o procedimento de lavagem das formigas, foram detectados 16 táxons de fungos distintas daquelas 36 espécies de fungos que haviam sido amostradas nas formigas não lavadas (Tabela 3). Portanto, essas 16 espécies também estavam mais fortemente associadas ao corpo das formigas. Uma ou duas sequências foram encontradas em cada uma dessas espécies, que, portanto, devem estar em populações reduzidas. Esses 16 táxons são fungos normalmente associados a plantas, com exceção de *Trichosporon chiarellii*, que já foi encontrado associado a formigas do gênero *Myrmicocrypta* sp. (PAGNOCCA et al., 2010) e *Trichosporon xylopinii*, que já foi isolado de besouros da espécie *Xylopinus saperdioides* (Tenebrionidae) (GUJJARI et al., 2011).

Tabela 1 -Os 20 táxons eliminadas pelo procedimento de lavagem e que foram considerados como fungos contaminantes eventuais. (²): Zygomycota. (^b): Basidiomycota. Demais fungos são do filo Ascomycota.

Nome	Táxon de Referência	Best Hit	Cobertura (%)	E-value	Id (%)	Classificação Funcional	Função de Referência
<i>Bartalinia</i> sp.	Loro et al., 2012	JN207256	62	4,00E-171	99	endofítico	Loro et al., 2012
<i>Botryosphaeria parva</i>	Nakabonge et al., 2003	AY228097	99	0.0	99	fitopatígeno	Urbez Torres et al., 2006
<i>Chaetothyriales</i> sp.	Mouhamadou et al., 2011	HM136629	96	0.0	92	rizosfera	Mouhamadou et al., 2011
<i>Cladosporium</i> sp.1	Rodrigues et al., 2011	HQ607834	91	0.0	96	jardim de fungo ¹ , serrapilheira ²	¹ Rodrigues et al., 2011; ² Kelly et al., 2010
<i>Cladosporium</i> sp.3	Rodrigues et al., 2011	JF812149	92	0.0	92	jardim de fungo	Rodrigues et al., 2011
<i>Cochliobolus sativus</i>	Leite et al., 2013	JQ936099	99	0.0	99	endofítico	Leite et al., 2013
<i>Fusarium</i> sp. 2	Amutha; Lavanya, 2012	KC119203	99	0.0	100	endofítico	Wang et al., 2013
<i>Fusarium</i> sp.3	Martinez-Cardenas et al., 2011	JF773630	99	0.0	99	endofítico ¹ , solo ²	¹ Martinez-Cardenas et al.,2011; ² Tang et al., 2010
<i>Glionectria tenuis</i>	Zhou et al., 2007	EF495240	99	0.0	99	rizoma	Zhou et al., 2007
<i>Mycosphaerella aurantia</i>	Pérez, et al., 2013	EU853471	99	0.0	99	Myrtaceae	Pérez, et al., 2013
<i>Penicillium</i> sp.	Kyotani et al., 2009	JN565301	99	0.0	98	solo	Waldrop et al., 2006
<i>Penidiella</i> sp.1	Crous; Groenewald, 2011	JQ905751	99	0.0	92	endofítico	Gazis et al., 2012; Crous & Groenewald, 2011
<i>Penidiella</i> sp.3	Crous et al., 2007	GU721244	95	0.0	94	solo ¹ , Myrtaceae ²	¹ Ferrari et al., 2011; ² Cheewangkoon et al., 2009
<i>Penidiella</i> sp.4	Crous et al., 2007	JN104566	99	0.0	95	solo ¹ , Myrtaceae ²	¹ Ferrari et al., 2011; ² Cheewangkoon et al., 2009
<i>Phaeosphaeria</i> sp.	Shrestha et al., 2011	HQ631018	99	0.0	99	serapilheira	Shrestha et al., 2011
<i>Phaethecoidea</i> sp.2	Crous et al., 2010	HQ599594	99	0.0	94	folhas de <i>Melaleuca quinquenervia</i>	Crous et al., 2010
<i>Pseudoramichloridium henryi</i>	Cheewangkoon et al. 2009	GQ303289	99	0.0	90	Myrtaceae	Cheewangkoon et al. 2009
<i>Rhizomucor variabilis</i> ^z	Qiao, 2012	KC215137	93	0.0	99	endofítico	Pan et al., 2008
<i>Sporobolomyces</i> sp.1 ^b	Chang; Liu, 2009	FJ515188	92	0.0	97	endofítico	Gai et al., 2009
<i>Trichosporon</i> sp.2	Sano et al., 2008	AB456738	99	0.0	99	solo	Chen et al., 2002

Tabela 2 - Os 14 táxons de fungos não eliminadas pelo procedimento de lavagem das formigas e que correspondem a fungos aderidos ou internos ao corpo das formigas. ^(b): Basidiomycota; demais fungos são do filo Ascomycota.

Nome	Táxon de Referência	Best Hit	Cobertura (%)	E-value	Id (%)	Classificação Funcional	Função de Referência
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Leite et al., 2013	DQ421007	99	0.0	99	endofítico	Leite et al., 2013
<i>Coriopsis rigida</i> ^b	Vlásak et al., 2011	JF894112	96	0.0	99	madeira	Vlásak et al., 2011
<i>Cryptococcus</i> sp.	Scorzetti et al., 2002	DQ421212	98	0.0	97	solo	Waldrop et al., 2006
<i>Epicoccum</i> sp.	Silva-Rojas et al., 2012	JX984771	99	0.0	100	endofítico	Hoffman & Arnold, 2008
<i>Hypocrea virens</i>	Yang et al., 2012	JQ973614	99	0.0	100	solo	Yang et al., 2012
<i>Microdochium</i> sp.	Mandyam et al., 2010	DQ092523	99	0.0	90	endofítico	Mandyam et al., 2010
<i>Paraphaeosphaeria</i> sp.	Wu et al., 2013	JN198486	99	0.0	99	endofítico	Wu et al., 2013
<i>Penidiella</i> sp.2	Crous et al., 2007	GU721244	99	0.0	96	serrapilheira	Crous et al., 2007
<i>Toxycocladosporium</i> sp.	Crous et al., 2010	HQ599598	99	0.0	96	flores	Crous et al., 2011
<i>Trichosporon</i> sp.1	Hahner et al., 2008	AM901888	97	0.0	96	poeira	Pitkaranta et al., 2008
<i>Trichosporon asahii</i>	Wu, 2011	JQ039943	99	0.0	99	muco humano	Buzina et al., 2003
<i>Trichosporon chiarellii</i>	Pagnocca et al., 2010	GQ338074	99	0.0	99	formigueiro	Pagnocca et al., 2010
<i>Trichosporon</i> sp.3	Pitkaranta et al., 2008	EF153624	97	0.0	96	ambiente	Pitkaranta et al., 2008
<i>Trimmatostroma</i> sp.	Ferrari et al., 2011	JN104566	91	0.0	98	solo	Ferrari et al., 2011

Tabela 3 -Os 16 táxons raros evidenciados somente em formigas lavadas e também considerados aderidos ou internos ao corpo das formigas.^(b): Basidiomycota; demais fungos são do filo Ascomycota

Nome	Táxon de Referência	Best Hit	Cobertura (%)	E-value	Id (%)	Classificação Funcional	Função de Referência
<i>Alternaria alternata</i>	Gao; Yang, 2011	JQ346915	99	0.0	99	simbionte vegetal	Gao; Yang, 2011
<i>Cercospora</i> sp.	Lura et al., 2011	JX984701	99	0.0	99	fitopatígeno	Lura et al., 2011
<i>Cladosporium</i> sp. 2	Rodrigues et al., 2011	JF812149	92	0.0	92	jardim de fungo	Rodrigues et al., 2011
<i>Devriesia</i> sp.	Crous et al., 2009	GU214634	98	0.0	95	saprófitos e fitopatógenos	Crous et al., 2009
<i>Fusarium</i> sp.1	Martinez-Cardenas et al., 2011	JF773630	99	0.0	99	endofíticos ¹ , solo ²	¹ Martinez-Cardenas et al., 2011; ² Tang et al., 2010.
<i>Nigrospora</i> sp	Hokama et al., 2012	GU053863	99	0.0	99	endofíticos ¹ , fitopatógenos ²	¹ Hokama et al., 2012; ² Silva-Rojas et al., 2012
<i>Paraconiothyrium</i> sp.	Miles, 2012	HM037644	99	0.0	94	endofítico	Miles, 2012
<i>Periconia</i> sp.1	Trovão et al., 2013	HQ607981	97	0.0	98	simbionte com artrópodes ¹ , jardins de fungos ²	¹ Trovão et al, 2013 ² Rodrigues et al., 2011
<i>Periconia</i> sp.2	Trovão et al., 2013	HQ607981	97	0.0	98	simbionte com artrópodes ¹ , jardins de fungos ²	¹ Trovão et al., 2013; ² Rodrigues et al., 2011
<i>Pestalotiopsis</i> sp	Rodrigues et al., 2011	AB758111	99	0.0	99	jardins de fungos ¹ , simbionte vegetal ²	¹ Rodrigues et al., 2011; ² U'ren et al., 2009
<i>Phaeothecoidea</i> sp.1	Crous et al., 2010	HQ599594	99	7,00E-158	89	simbiontes vegetais	Crous et al., 2010
<i>Pyriculariasp.</i>	Bussaban et al., 2005	JQ692165	95	0.0	95	fitopatógenos	Bussaban et al., 2005
<i>Rachicladosporium pini</i>	Crous et al., 2011	JF951145	99	0.0	97	endofítico/fitopatógeno	Crous et al., 2011
<i>Sporobolomyces</i> sp.2 ^b	Nagahama et al., 2006	AB178481	99	0.0	96	endofítico	Gai et al., 2009
<i>Teratosphaeria</i> sp.	Crous et al., 2008	EU707864	99	0.0	94	fitopatógeno	Crous et al., 2008
<i>Trichosporon xylopinii</i>	Houseknecht et al., 2011	HQ999970	99	0.0	98	rizosfera ¹ , artrópodes ²	¹ Fisk et al., 2011; ² Renker et al., 2005

Efeito do procedimento de lavagem sobre a amostragem de fungos associados às formigas

Lavar as formigas permitiu detectar em torno de 32% (16 das 50 espécies caracterizadas) da diversidade de fungos a elas associados. Todos esses táxons fúngicos que foram detectados somente após a lavagem das formigas estiveram provavelmente presentes em pequenas quantidades, pois apresentaram somente uma a sete sequências cada. Tais fungos raros seriam somente encontrados com esforços de sequenciamento mais intenso, não fosse a lavagem das formigas. Sendo assim, lavar as formigas mostrou-se uma maneira econômica e rápida de detectar fungos presentes em menor número associados às formigas.

Além de aumentar a capacidade de amostragem da diversidade de fungos, o procedimento de lavagem das formigas retirou uma série de fungos que não estavam fortemente associados com o corpo das formigas. Estes fungos perfizeram 40% (20 em 50 espécies) da diversidade caracterizada. Tais dados que indicam que 40% dos fungos não estão fortemente associados ao corpo das formigas, enquanto os 60% restantes estão, provavelmente porque são capazes de colonizar mais eficiente o corpo das formigas, podendo, portanto, representar simbioses adaptados a crescer em associação mais estreita com os insetos. Portanto, o procedimento de lavagem permitiu classificar os fungos em dois grupos distintos, quanto à capacidade de adesão física ao corpo das formigas.

Fungos simbioses das formigas e prováveis propriedades biológicas

Entre os 50 táxons de fungos encontrados associados ao corpo das formigas, houve representantes nas ordens Xylariales, Hypocreales, Capnodiales, Pleosporales (todos ascomycetos), Tremellales (basidiomicetos) e Mucorales (Zigomiceto).

Nós utilizamos um critério para prever se, entre estes fungos simbioses, haveria alguma espécie que poderia ter uma função importante para a vida das formigas, ou seja, ser um simbiote funcional. Assumimos que algumas

características seriam importantes em um simbiote funcional, como (1) capacidade de aderir ao corpo das formigas, (2) presença em grandes populações, indicando sucesso em colonizar o corpo das formigas, e (3) presença em indivíduos de diferentes localidades geográficas, mostrando que a associação do fungo com as formigas independe da região geográfica onde está o ninho.

Entre os 50 táxons de fungos identificados nas formigas, 20 foram removidos prontamente pelo procedimento de lavagem das formigas (Tabela 1). Dos 30 táxons restantes, 20 estavam presentes em populações pequenas, com cinco ou menos clones encontrados em 409 clones amostrados. Portanto, estes táxons de fungos são provavelmente eventuais contaminantes vetorizados pelas formigas. Entre estes contaminantes estão principalmente fungos que vivem associados a plantas.

Entre os 10 táxons de fungos que não foram removidos pelo procedimento de lavagem e que estavam presentes em populações relativamente elevadas, seis táxons foram encontrados somente em uma das regiões geográficas. Embora estes seis táxons não satisfaçam a todas as condições que nós utilizamos para a seleção de candidatos a simbiotes funcionais, alguns delas merecem destaque por sua ocorrência em grandes populações ou por seu histórico de associação com formigas Attini, endofíticos ou patógenos humanos.

Dois destes fungos são provavelmente entomopatógenos potenciais para as formigas *Atta laevigata*. O primeiro deles é *Coriolopsis rigida*, que foi o fungo com maior população encontrado nas formigas, com 142 clones. Esta espécie estava fortemente associada ao corpo dos insetos, pois foi detectada somente em formigas lavadas, mas esteve presente exclusivamente em formigas de Bauru. *Coriolopsis rigida* é um fungo basidiomiceto (*whiterot*) decompositor de ligninas (SAPARRAT et al., 2002) e proveniente do solo. É, portanto, um provável contaminante com grande capacidade de colonização, que pode representar uma infecção eventual, mas importante, para as formigas. Este provavelmente também é o caso de *Trichosporon chiarelli*, com 72 clones encontrados exclusivamente em formigas de Bauru, a maioria deles em formigas lavadas. Esta espécie de levedura foi isolada e descrita a partir de

amostras coletadas de jardim de fungo e material de descarte (ou lixo) de um ninho da formiga Attini *Myrmicocryptasp.* de Botucatu.

Três outras espécies de fungos são prováveis patógenos de plantas ou de humanos e que podem ser vetorizados pelas formigas. É o caso de *Trichosporon asahii* (7 clones) encontrado somente em formigas de Botucatu, e que é um fungo infeccioso para humanos, que causa infecção oportunista, muitas vezes fatal, em pacientes imunodeprimidos (EBRIHT et al., 2001). Não se sabe ao certo a origem dessa infecção, mas, até onde indicam nossos dados, as formigas poderiam atuar como importantes vetores desse agente infeccioso. Outro caso ocorreu com *Microdochium* sp. (11 clones), presente somente em formigas de Rio Claro e que foi a espécie mais prevalente entre aquelas na ordem Xylariales encontradas em *Atta laevigata*. Muitas das espécies nesse gênero são endofíticos e reconhecidos fitopatogênicos (SYDOW, 1924) de modo que é possível que as formigas atuem como vetores desses fungos causadores de doenças em plantas. O quinto fungo de destaque foi *Fusarium oxysporum* (5 clones), um fungo de solo que pode ser patógeno para plantas (DI PIETRO et al., 2003) e humanos (PRADOS-ROSALES et al., 2006).

Finalmente, o sexto fungo que merece destaque é *Toxocladosporium* sp., que esteve presente em populações relativamente altas (15 clones), mas somente em formigas de Rio Claro. Este gênero de fungo contém espécies associadas a plantas, que poderiam também ser a fonte da espécie de fungo encontrada associada às formigas.

Entre as 50 espécies de fungos identificadas quatro estavam fortemente aderidas ao corpo das formigas, em populações relativamente altas e presentes em diferentes regiões geográficas: *Cladosporium cladosporioides*, *Epicocum* sp., *Hypocrea virens* e *Nigrospora* sp. Essas espécies de fungos são candidatas a simbioses estáveis, que poderiam desempenhar tanto papéis benéficos quanto prejudiciais para os ninhos das formigas, na produção de antibióticos protetores contra infecções entomopatogênicas. Também é possível que estes fungos degradem polissacarídeos vegetais ativamente, o que poderia ser benéfico para as formigas, se gerassem produtos por elas assimiláveis a partir da matéria vegetal forrageada, ou poderia resultar um efeito negativo para as formigas, se estes fungos competissem com os

mutualistas fungo e formiga na assimilação de carbonos dos vegetais a partir do substrato vegetal nos jardins de fungos.

Os prováveis fungos simbiossiontes funcionais das formigas *A. laevigata*.

Somente quatro táxons de fungos satisfizeram a cada um dos critérios propostos para selecionar simbiossiontes funcionais, ou seja, estiveram em populações relativamente altas, fortemente aderidos ao corpo das formigas e em ambas as localidades geográficas (Figura 3): *Cladosporium cladosporioides*, em maior população, com 64 sequências, seguido de *Epicocum* sp (16 sequências), *Hypocrea virens* (13 sequências) e *Nigrospora* sp (sete sequências). Algumas características descritas na literatura para estes quatro táxons de fungos permitem postular funções que eles possam ter na vida das formigas.

O primeiro destes táxons foi *Cladosporium cladosporioides*, um fungo que já foi isolado com bastante frequência de jardins de fungos das formigas Attini *Cyphomyrmex wheeleri*, presentes no Texas (RODRIGUES et al., 2011). Este gênero inclui fungos tipicamente saprofíticos (ELLIS, 1971; RIESEN; SIEBER, 1985; KUMARESAN; SURYANARAYANAN, 2002) ou fitopatógenos (PÉREZ et al., 2009) com crescimento extremamente rápido, podendo representar uma ameaça potencial para o funcionamento dos jardins de fungos. *Cladosporium cladosporioides* é entomopatogênico e é utilizado no biocontrole de insetos e de fungos produtores de toxinas em grãos de café (OLIVEIRA et al., 2004), podendo representar sério risco para as formigas. Estes fungos, por viverem em grande população e associados ao corpo das formigas, representam potenciais patógenos para estes insetos.

Epicocum sp. apresentou sequências ITS 99 ou 100% idênticas e de um fungo endofítico de coníferas da Carolina do Norte (HOFFMAN; ARNOLD, 2008) ou a um fungo de solo (PORRAS-ALFARO et al., 2011), sendo uma dessas fontes de contaminação provavelmente envolvidas com a aquisição desse fungo pelas formigas.

Hypocrea virens vive no solo ou em madeira em decomposição, produz celulasas e hemicelulasas, antibióticos (ESPOSITO; SILVA, 1998) e é usado para biocontrole (KUBICEK; HARMAN, 1998). É possível que este fungo possa

ser uma fonte de antibióticos para as formigas, ou mesmo um entomopatógeno, podendo também atuar como degradador de polissacarídeos vegetais, se for transmitido do corpo das operárias para os jardins de fungos no interior dos ninhos.

Nigrospora é gênero com representantes endofíticos (ROSA et al., 2012) com capacidade de produção de exopolissacarídeos (SUDHAKARAN; SHEWALE, 1988) e produção de metabólitos secundários (ROSA et al., 2012). *Nigrospora* sp. também contém espécies relacionadas à desconstrução da parede celular de *Miscanthus* sp e cana-de-açúcar (SHRESTHA et al., 2011). Desta forma, é possível inferir que o simbiote do gênero *Nigrospora* possa atuar na decomposição da matéria vegetal coletada pelas formigas. De modo alternativo, a espécie de *Nigrospora* encontrada associada aos ninhos de *A. laevigata* poderia atuar como competidor do fungo mutualista por carbonos advindos da hidrólise de polissacarídeos vegetais.

Não é possível saber ao certo qual seria o papel desses quatro simbiontes, a partir dos dados de ITS, que servem apenas para identificar as espécies e estimar a sua abundância relativa frente às demais espécies de fungos associados às formigas. Estudos posteriores de prevalência em diferentes ninhos, possivelmente com *primers* específicos, bem como a partir do isolamento dessas quatro espécies, devem ser feitos para uma caracterização mais detalhada desses quatro prováveis simbiontes funcionais das formigas cortadeiras *Atta laevigata*.

Transferência de fungos entre formigas e plantas

Cerca da metade dos fungos encontrados associados às formigas (26 dos 50 táxons) são espécies que são encontradas associadas a plantas. Dez deles são facilmente removidos das formigas, mas 16 táxons estão fortemente aderidos ao corpo das formigas, indicando que são capazes de colonizar os insetos. Isso mostra que há um considerável fluxo de fungos entre formigas e plantas, que provavelmente ocorre durante a atividade de forrageio. O fluxo de fungos das plantas para as formigas pode indicar a capacidade das formigas de adquirirem novos simbiontes a partir das plantas visitadas. Alguns destes simbiontes devem ser apenas contaminantes facilmente removidos pelas

formigas. Outros devem representar um estágio mais adiantado da simbiose, provavelmente um comensalismo ou parasitismo, que originou a partir de fungos das plantas, mas que se desenvolveu com os fungos que apresentaram a habilidade em aderir e colonizar o corpo das formigas. Estes fungos provavelmente venceram a barreira imposta pelas formigas, que são capazes de remover os fungos endofíticos das plantas forrageadas (VAN BAELE et al., 2009). Após vencer esta barreira, tornaram-se habitantes do corpo das formigas. Desta forma, provavelmente os endofíticos conseguem adentrar aos ninhos, dando origem aos contaminantes observados nos jardins de fungos das formigas cortadeiras (FISHER et al., 1996; RODRIGUES et al., 2008).

O caminho inverso, das formigas para as plantas, deve ser também considerado como uma importante forma de contaminação das plantas que pode ocorrer quando as formigas visitam e interagem com as diferentes espécies vegetais. Como as formigas cortadeiras visitam uma grande variedade de espécies de plantas (WIRTH et al., 2003) as formigas cortadeiras podem ser consideradas como uma importante forma de vetorização de fungos para as plantas. Como algumas das espécies de fungos identificadas no presente trabalho são fitopatógenos ou endofíticos, as formigas cortadeiras podem ser consideradas como vetores de simbiontes ou mesmo agentes infecciosos causadores de doenças para os vegetais.

Conclusões

Conclui-se que a estratégia aqui utilizada para preparação das amostras e identificação molecular de fungos associados a estas amostras mostrou-se simples e satisfatória. Tal estratégia resultou na detecção de 50 espécies de fungos e revelou potencial para a identificação de candidatos a simbiontes associados às formigas. A maioria desses fungos são contaminantes eventuais, grande parte deles vindos de plantas e provavelmente adquiridos pelas formigas durante a sua atividade de forrageio. É possível que as formigas tenham uma função importante para a vetorização desses fungos entre as diferentes plantas que visitam, pois muitos deles são endofíticos ou fitopatógenos. Duas espécies de fungos (*Trichosporon chiarelli* e *Corioloropsis rigida*), por estarem presentes em altíssimas populações, mas somente em

uma das regiões geográficas estudadas, podem representar contaminantes importantes fortemente aderidos ao corpo das formigas, com grande capacidade de colonização, e possivelmente entomopatógenos em potencial para esses insetos. Uma curiosidade foi a presença de *Trichosporon asahii*, que é um patógeno para humanos imunodeprimidos e que foi eventualmente encontrado e em população relativamente elevada, mas fortemente associado ao corpo das formigas.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente dissertação teve como foco o estudo da diversidade de táxons fúngicos em operárias da formiga cortadeira *A. laevigata*. Pode-se observar que as formigas adquirem uma microbiota vasta em suas atividades forrageadoras e de cuidado com o ninho. Um segundo ponto a se considerar é que essa microbiota fúngica pode simplesmente entrar em contato e ser vetorizada pelos insetos, como no caso dos 20 táxons aqui reportados, possíveis comensais na vida das formigas e no cotidiano do ninho. A terceira consideração é que o emprego de um critério geográfico no estudo tornou possível a caracterização de táxons possivelmente com alguma função junto às formigas *A. laevigata*. Esses táxons (*Cladosporium cladosporioides*, *Epicocum* sp., *Nigrospora* sp., e *Hypocrea virens*) têm funções variadas, conforme a literatura corrente. *C. cladosporioides*, já isolado em ninhos de Attini, apresenta crescimento rápido e pode competir por nutrientes com o fungo mutualista das formigas o que pode torná-lo um provável amensal. *Epicocum* sp. e *Nigrospora* sp. podem atuar como decompositores de matéria vegetal dentro do formigueiro, o que pode tornar essas espécies possíveis protooperários. *Hypocrea virens* é um fungo parasita endofítico provavelmente adquirido durante o processamento do material vegetal pelas formigas.

Esse trabalho demonstra quão vasto é o ninho das formigas em relação aos micro-organismos. As operárias são provavelmente capazes de realizar um trânsito gigantesco de simbiontes do ambiente para sua colônia e da colônia para o ambiente, em especial em relação aos vegetais que carregam. Dessa forma há ainda uma microbiota a se descobrir nesse ambiente, mais estudos podem demonstrar e confirmar o grau de complexidade das relações estabelecidas nos formigueiros.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D.J. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- AMANN, R.L.; Ludwig, W. & Schleifer, K.H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 59: 143-169.
- AMUTHA, K.; LAVANYA, M. *Molecular identification of fungi by ITS and LSU (D1/D2) region*. Department of Biotechnology, School of Life Sciences: VELS University, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KC119203>>. Acesso em: 25 de mar. 2013.
- ANTWEB. Disponível em: <<http://www.antweb.org>>. Acesso em 2 set. 2013.
- ATLAS, R.M. & BARTHA, R. (1998). *Microbial ecology: fundamentals and applications*. 4 ed. Benjamin Cumins, Redwood (CA, USA).
- BACCI, M.; ANVERSA, M.M.; PAGNOCCA, F. C. Cellulose degradation by *Leucocoprinus gongylophorus*, the fungus cultured by the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 67, p.385 – 386, 1995a.
- BACCI, M.; 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*, v.28, p. 79–82, 1995b.
- BUSSABAN, B.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; SEELANAN, T.; PARK, D.C.; MCKENZIE, E.H.; HYDE, K.D. Molecular and morphological characterization of *Pyricularia* and allied genera. *Mycologia*, v. 97, n. 5, p. 1002-1011, 2005.
- BUZINA, W.; BRAUN, H.; FREUDENSCHUSS, K.; LACKNER, A.; HABERMANN, W.; STAMMBERGER, H. Fungal biodiversity - as found in nasal mucus. *Medical Mycology*, v. 41, n. 2, p. 149-161, 2003.
- CAFARO, M. J. et al. Specificity in the symbiotic association between fungus-growing ants and protective *Pseudonocardia* bacteria. *Proceedings of the The Royal Society - Biological sciences*, v. 278, n. 1713, p. 1814-22, 2010.
- CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C., BACCI, M.; LACHANCE, M.; 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*, v.54, p. 1891-1894, 2004.

CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O.C.; BACCI, M.; HEBLING, M.J.A.; SILVA, O.A. Yeasts associated with the nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdensrubropilosa* Forel, 1908. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.71, p. 243– 248, 1997.

CHANG, C. F.; LIU, S. M. Molecular identification and characterization of yeasts isolated from sea surface microlayer and underlying water at Keelung on the north-east coast of Taiwan. Institute of Marine Biology: National Taiwan Ocean University, 2009. Disponível em:
< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FJ515188>>. Acesso em 25 mar. 2013.

CHEEWANGKOON, R.; GROENEWALD, J.Z.; SUMMERELL, B.A.; HYDE, K.D.; TO-ANUN, C.; CROUS, P.W. Myrtaceae, a cache of fungal biodiversity. *Persoonia*, v. 23, p. 55–85, 2009.

CHEN, D. M.; CAIRNEY, J. W. G. Investigation of the influence of prescribed burning on ITS profiles of ectomycorrhizal and other soil fungi at three Australian sclerophyll forest sites. *Mycological Research*, v. 106, n. 5, p. 532-540, 2002.

CROUS P.W.; GROENEWALD, J.Z. Why everlastings don't last. *Persoonia*, v. 26, p.70-84, 2011.

CROUS, P.W. et al. Fungal Planet description sheets: 69-91. *Persoonia*, v. 26, p.108-156, 2011.

CROUS, P.W.; BRAUN, U.; GROENEWALD, J.Z. *Mycosphaerella* is polyphyletic. *Studies in Mycology*, v. 58, p. 1-32, 2007.

CROUS, P.W.; GROENEWALD, J.Z.; SHIVAS, R.G. Fungal Planet 61: *Phaeothecoidea melaleuca*. *Persoonia*, v. 25, p.142-143, 2010.

CROUS, P.W.; GROENEWALD, J.Z.; SHIVAS, R.G.; MCTAGGART, A.R. Fungal Planet 63: *Toxicocladosporium banksiae*. *Persoonia*, v. 25, p. 146-147, 2010.

CROUS, P.W.; GROENEWALD, J.Z.; SHIVAS, R.G. Fungal Planet 61: *Phaeothecoidea melaleuca*. *Persoonia*, v. 25, p. 142-143, 2010.

CROUS, P.W.; SCHOCH, C.L.; HYDE, K.D.; WOOD, A.R.; GUEIDAN, C.; HOOG, G.S.; GROENEWALD, J.Z. Phylogenetic lineages in the Capnodiales. *Studies in Mycology*, v. 64:17-47S7, 2009.

CROUS, P.W.; SUMMERELL, B.A.; MOSTERT, L.; GROENEWALD, J.Z. Host specificity and speciation of *Mycosphaerella* and *Teratosphaeria* species associated with leaf spots of Proteaceae. *Persoonia*, v. 20, p. 59-86, 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, p. 701-705, 1999a.

CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 96, n. 14, p. 7998-8002, 6 jul. 1999b.

DI PIETRO, A.; MADRID, M. P.; CARACUEL, Z.; DELGADO-JARANA, J.; RONCERO, M. I. G. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molecular Plant Pathology*, p. 4315-4325, 2003

DURHAM, A. M.; KASHIWABARA, A. Y.; MATSUNAGA, F. T.; AHAGON, P.H.; et al. EGene: a configurable pipeline generation system for automated sequence analysis. *Bioinformatics*, v. 21, p. 2812-2813, 2005.

EBRIHT, J. R.; FAIRFAX, M. R.; VAZQUEZ, J. A. *Trichosporon asahii*, a non-*Candida* yeast that caused fatal septic shock in a patient without cancer or neutropenia. *Clinical Infectious Diseases*, v. 33, p. e28-e30, 2001.

ELLIS, M. B. *Dematiaceous hyphomycetes*. Pensilvânia: Commonwealth Mycological Institute, 1971.

ESPOSITO, E.; SILVA, M. Systematics and enviromental application of the genus *Trichoderma*. *Critical Review in Micribiology*, v. 24, p. 89 – 98, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using *Phred*.I. Accuracy Assessment. *Genome Research*, v.8, p. 175-185, 1998.

EWING, B; GREEN, P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using *Phred*.II. Error Probabilities. *Genome Research*, v.8, p. 186-194, 1998.

FELSENSTEIN, J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distribuído pelo autor. Departamento de Genetica, University of Washington, Seattle. 1993.

FERRARI, B.C.; ZHANG, C.; VAN DORST, J. Recovering greater fungal diversity from pristine and diesel fuel contaminated sub-antarctic soil through cultivation using both a high and a low nutrient media approach. *Frontiers in Microbiology*, v. 2, p. 217, 2011.

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. *Mycology Res*, v. 100, p. 541–546, 1996.

FISK, M. C. et al. Rhizosphere disturbance influences fungal colonization and community development on dead fine roots. *Plant and Soil*, v. 341, n. 1-2, p. 279-293, 2010.

FORMICIDAS MIREX. Acesso em: 2 set. 2013. Disponível em: <<http://www.mirex-s.com.br/index.php/formigas/especies>>.

GAI, C.S.; LACAVA, P.T.; MACCHERONI, W.; GLIENKE, C.; ARAUJO, W.L.; MILLER, T.A.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic yeasts from sweet orange and their localization by scanning electron microscopy. *Journal of Basic Microbiology*, v. 49 n. 5, p. 441-451, 2009.

GANTER, P.F. Yeasts and invertebrates associations. In: Rosa CA, Péter G (eds) *The yeast handbook: biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Springer Verlag, Berlin. p. 263–301, 2006.

GAO, Q.; YANG, Z.L. *Diversity and distribution patterns of mycobionts associated with grasses in alpine meadows, southwest China*. Laboratory of Biodiversity and Biogeography, Kunming Institute of Botany: Chinese Academy of Sciences, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JQ346915>>. Acesso em: 25 mar. 2013.

GAZIS, R.O.; CHAVERRI, P.; GRUNER, D. Sampling effect in estimating tropical fungal endophyte diversity: Are we undersampling? *Plant Sciences and Landscape Architecture*: University of Maryland, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JQ905751>>. Acesso em: 25 mar. 2013.

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.

GUJJARI, P.; SUH, S-O.; LEE, C-F.; ZHOU, J. J. *Trichosporon xylopinii* sp. nov., a hemicelluloses degrading yeast isolated from the wood-inhabiting beetle *Xylopinus saperdioides*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 61, p. 2538-2542, 2011.

HAHNER, D.; KIRSCHNER, R.; PIEPENBRING, M.; SCHOFER, H. First isolation of the anamorphic basidiomycetous yeast *Trichosporon faecale* in Germany, from the skin of a patient with tinea pedis. *Mycopathologia*, v. 165, n. 3, p. 149-153, 2008.

HARTMANN, M.; HOLLISTER, E. B.; LESNIEWSKI, R. A.; OAKLEY, B. B., HIBBETT, D. S., OHMAN, A., GLOTZER, D., NUHN, M., KIRK, P., NILSSON, R. H. Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. *Fungal Biology Reviews*, v. 25, n. 1, p. 38-47, 2011.

HOFFMAN, M.T.; ARNOLD, A.E. Geographic locality and host identity shape fungal endophyte communities in cupressaceous trees. *Micology Research*, v. 2, n. 112, p. 331-344, 2008.

HUGENHOLTZ, P; GOBEL, B. M.; PACE, N.R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*, v. 180, p. 4765-4774, 1998.

HOKAMA, Y.M.; ADAMOSKI, D.M.; GOMES, R.R.; SAVI, D.C.; POSSIEDE, Y.M.; GLIENKE, C. Diversity of endophytic fungi of *Vochysia divergens* Pohl of the Pantanal of Mato Grosso do Sul, Brazil. Departamento de Genetica: Universidade Federal do Paraná, 2012. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/410185588?report=genbank&log\\$=nucleotide&blast_rank=2&RID=TU5ZDBNV015](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/410185588?report=genbank&log$=nucleotide&blast_rank=2&RID=TU5ZDBNV015)>. Acesso em: 25 mar. 2013.

HOUSEKNECHT, J.L.; SUH, S. O.; ZHOU, J. ATCC Mycology Authentication Project. Mycology Department: American Type Culture Collection, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HQ999970>>. Acesso em: 25 mar. 2013.

KELLY, J.J.; BANSAL, A.; WINKELMAN, J.; JANUS, L.R.; HELL, S.; WENCEL, M.; BELT, P.; KUEHN, K.A.; RIER, S.T.; TUCHMAN, N.C. Alteration of microbial communities colonizing leaf litter in a temperate woodland stream by growth of trees under conditions of elevated atmospheric CO₂. *Applied Environmental Microbiology*, v. 76, n. 15, p. 4950-4959, 2010.

KUBICEK, C. P.; HARMAN, G. E. (Eds). *Trichoderma And Gliocladium (Vol. 1)*. Nova York: CRC Press, 1998. 300 p.

KUMARESAN, V.; SURYANARAYANAN, T. S. Endophyte assemblage in young, mature and senescent leaves of *Rhizophora apiculata*: evidence for the role of endophytes in mangrove litter degeneration. *Fungal Diversity*, v. 9, p. 81–91, 2002.

KYOTANI, D.; HASEGAWA, K.; OHISHI, H.; WU, W.; WANG, L.; HASUMI, K. Microbial conversion of L-ascorbic acid to L-erythro ascorbic acid. *Bioscience and Biotechnology Biochemistry*, v. 73, n. 4, p. 954-956, 2009.

LANDEWEERT, R.; LEEFLANG, P.; KUYPER, T. W.; HOFFLAND, E.; ROSLING, A.; WERNARS, K.; SMIT, E. Molecular Identification of Ectomycorrhizal Mycelium in Soil Horizons. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 1, p. 327–333, 2003.

LATREILLE, P. A. *Précis des caracteres generiques des insectes, disposés dans un ordre naturel*. - Paris-Brive, Prevot - F. Boudreaux XII, 3 201 (7) 1796.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, v. 23, p. 2947-2948, 2007.

LEITE, T. D. S. et al. Novel and Highly Diverse Fungal Endophytes in Soybean Revealed by the Consortium of Two Different Techniques. *Journal of Microbiology*, v. 51, n. 1, p. 56-69, 2013.

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.

LORO, M.; VALERO-JIMENEZ, C.A.; NOZAWA, S.; MARQUEZ, L.M. Diversity and composition of fungal endophytes in semiarid Northwest Venezuela. *Journal of Arid Environment*, v.85, p. 46-55, 2012.

LUDWIG, W.; BAUER, S. H.; BAUER, M.; HELD, I.; KIRCHHOF, G.; SCHULZE, R.; HUBER, I.; SPRING, S.; HARTMANN, A.; SCHLEIFER, K. H. Detection and *in situ* identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. *FEMS Microbiology Letters*, v. 153, p. 181-190, 1997.

LURÁ, M. C. et al. Genetic diversity of *Cercospora kikuchii* isolates from soybean cultured in Argentina as revealed by molecular markers and cercosporin production. *Mycopathologia*, v. 171, n. 5, p. 361-371, 2011.

MANDYAM, K.; LOUGHIN, T.; JUMPPONEN, A. Isolation and morphological and metabolic characterization of common endophytes in annually burned tall grass prairie. *Mycologia*, v. 102, n. 4, p.813-821, 2010.

MANter, D. K.; VIVANCO, J. M. Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. *Journal of Microbiological Methods* v. 71, p. 7-14, 2007.

MARTIN, M. M.; CARMAN, R. M.; MACCONNEL, J. G., Nutrients derived from the fungus cultured by the fungus-growing ant *Attacolombica tonsipes*. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 62, p. 11–13, 1969.

MARTINEZ-CARDENAS, A.; RIVERA-ORDUNA, F.N.; MALDONADO-GARCIA, F.; FLORES-COTERA, L.B. *Phylogenetic analysis and ecological relationship of endophytic fungi associated to Taxus globosa*. Biotecnología y Bioingeniería: Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, 2011. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/333454420?report=genbank&log\\$=nucleotide&blast_rank=3&RID=TTU72006014](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/333454420?report=genbank&log$=nucleotide&blast_rank=3&RID=TTU72006014)>. Acesso em: 25 mar. 2013.

MEHDIABADI, N. J. M.; SCHULTZ, T. R. S. Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera : Formicidae : Myrmicinae : Attini). *Myrmecological News*, v. 13, p. 37-55. 2009.

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*, v. 83, p. 167-174, 2003.

MILES, L. A. et al. Exploring the biocontrol potential of fungal endophytes from an Andean Colombian Paramo ecosystem. *BioControl*, v. 57, n. 5, p. 697-710, 2012.

MOUHAMADOU, B. et al. Differences in fungal communities associated to *Festuca paniculata* roots in subalpine grasslands. *Fungal Diversity*, v. 47, n. 1, p. 55-63, 2011.

MUELLER, U. G.; REHNER, S. A.; SCHULTZ, T. R. The Evolution of Agriculture in Ants. *Science*, v. 281, p. 2034-2038, 1998.

MUELLER, U. G. et al. Coevolution between attine ants and actinomycete bacteria: a reevaluation. *Evolution*, v. 62, n. 11, p. 2894-912, 2008.

NAGAHAMA, T.; HAMAMOTO, M.; NAKASE, T.; SHIMAMURA, S.; HORIKOSHI, K. Phylogenetic relationship within the *Erythrobasidium* clade: molecular phylogenies, secondary structure, and intron positions inferred from partial sequences of ribosomal RNA and elongation factor-1 α genes. *Journal of General and Applied Microbiology*, v. 52, n. 1, p. 37-45, 2006.

NAKABONGE, G.; ROUX, J.; COUTINHO, T.A.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M.J. *Botryosphaeria* sp. canker of *Eucalyptus* spp. in Uganda. *Microbiology and Plant Pathology*: University of Pretoria, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY228097>>. Acesso em 25 mar. 2013.

NILSSON R. H.; ABARENKOV, K.; VELDRE, V.; NYLINDER, S.; WIT, P.; BROSCHE, S.; ALFREDSSON, J. F.; RYBERG, M.; KRISTIANSSON, E. An open source chimera checker for the fungal ITS region. *Molecular Ecology Resources*, v.10, p. 1076-1081, 2010.

NILSSON, R. H.; KRISTIANSSON, E.; RYBERG, M.; HALLENBERG, N.; LARSSON, K.H. Intraspecific ITS Variability in the Kingdom *Fungi* as Expressed in the International Sequence Databases and Its Implications for Molecular Species Identification. *Evolutionary Bioinformatics*, v.4 p. 193–201, 2008.

O'BRIEN, H. E.; PARRENT, J. L.; JACKSON, J. A.; MONCALVO, J.; VILGALYS, R. Fungal Community Analysis by Large-Scale Sequencing of Environmental Samples. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 9, p. 5544–5550, 2005.

OLIVEIRA, J. S., SOUZA, S. E.; OLIVEIRA, L. L.; CARVALHO, D. A.; MOREIRA, D. M. O. Distribuição do fungo *Cladosporium cladosporioides* em regiões produtoras de café na Bahia. *Bahia Agrícola*, v. 6, p. 72 – 75, 2004.

PAGNOCCA, F. C., LEGASPE, M. F. C., RODRIGUES, A., RUIVO, C. C. C., NAGAMOTO, N. S.; BACCI JR. M.; FORTI, L. C. Yeasts isolated from a fungus-growing ant nest, including the description of *Trichosporon chiarellii* sp. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.60, p. 1454-1459, 2010.

PAGNOCCA, F. C.; MASIULIONIS, V. E.; RODRIGUES, A. Specialized Fungal Parasites and Opportunistic Fungi in Gardens of Attine Ants. *Psyche: A Journal of Entomology*, v. 2012, p. 1-9, 2012.

PAN, J. J.; BAUMBARTEN, A. M.; MAY, G. Effects of host plant environment and *Ustilago maydis* infection on the fungal endophyte community of maize. *New Phytologist*, v. 178, p. 147-156, 2008.

PÉREZ, C. A.; WINGFIELD, M. J.; ALTIER, N. A.; BLANCHETTE, R. A. Mycosphaerellaceae and Teratosphaeriaceae associated with Eucalyptus leaf diseases and stem cankers in Uruguay. *Forest Pathology*, v. 39, p. 349–360, 2009.

PÉREZ, C. A et al. Species of Mycosphaerellaceae and Teratosphaeriaceae on native Myrtaceae in Uruguay: evidence of fungal host jumps. *Fungal Biology*, v. 117, n. 2, p. 94-102, 2013.

PITKARANTA, M.; MEKLIN, T.; HYVARINEN, A.; PAULIN, L.; AUVINEN, P.; NEVALAINEN, A.; RINTALA, H. Analysis of fungal flora in indoor dust by ribosomal DNA sequence analysis, quantitative PCR, and culture. *Applied Environmental Microbiology*, v. 74, n. 1, p. 233-244, 2008.

PORRAS-ALFARO, A. et al. Diversity and distribution of soil fungal communities in a semiarid grassland. *Mycologia*, v. 103, n. 1, p. 10-21, 2011.

PRADOS-ROSALES, R. C.; SERENA, C.; DELGADO-JARANA, J.; GUARRO, J.; DI PIETRO, A. Distinct signalling pathways coordinately contribute to virulence of *Fusarium oxysporum* on mammalian hosts. *Microbes Infectology*. v. 8, p. 2825-2831, 2006.

PROSDOCIMI, F. *Racionalizando a utilização do algoritmo PHRED para a análise de seqüências de DNA*. 2006. 122 f. Tese (Doutorado em Bioinformática) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

QIAO, L. H. *Anti-HIV-1 activity screening of endophytic fungi isolated from Aquilaria sinensis*. The Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine: Ministry of Education, Institute of Medicinal Plant Development, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KC215137>>. Acesso em: 17 maio. 2013.

RENKER, C. et al. Oribatid mites as potential vectors for soil microfungi: study of mite-associated fungal species. *Microbial Ecology*, v. 50, n. 4, p. 518-28, nov. 2005.

RIBEIRO, M. M. R.; AMARAL, K. D.; SEIDE, V. E.; SOUZA, B. M. R.; DELLA LUCIA, T. M. C.; KASUYA, M. C. M.; SOUZA, D. J. Diversity of Fungi Associated with *Atta bisphaerica* (Hymenoptera: Formicidae): The Activity of *Aspergillus ochraceus* and *Beauveria bassiana*. *Psyche: A Journal of Entomology*, p. 1-6, 2012.

RIESEN, T.; SIEBER, T. *Endophytic fungi in winter wheat (Triticum aestivum L.)*. Zürich: Swiss Federal Institute of Technology, 1985.

RODRIGUES, A.; BACCI M.; MUELLER, U. G.; ORTIZ, A. PAGNOCCA, F. C. Microfungal “Weeds” in the Leafcutter Ant Symbiosis. *Microbiology Ecology*, v. 56, p. 604–614, 2008.

RODRIGUES, A.; CABLE, R.N.; MUELLER, U. G.; BACCI, M.; PAGNOCCA, F. C. Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungal garden pathogens of leaf-cutting ants. *Antonie van Leeuwenhoek* , v. 96, p. 331-342, 2009.

RODRIGUES, A.; MUELLER, U. G.; ISHAK, H. D.; BACCI, M.; PAGNOCCA, F. C. Ecology of microfungal communities in gardens of fungus-growing ants (Hymenoptera:Formicidae): a year-long survey of three species of attine ants in Central Texas. *FEMS Microbiology Letters* v. 78, p. 244-255, 2011.

RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F.C.; BACCI, M., HEBLING, M.J.A., BUENO, O.C., PFENNING, L.H. Variability of Non-Mutualistic Filamentous Fungi Associated with *Atta sexdens rubropilosa* Nests. *Folia Microbiologica*. v. 50, n5, p. 421–425, 2005.

ROSA, L. H.; TABANCA, N.; TECHEN, N.; PAN, Z.; WEDGE, D. E.; MORAES, R. M.; CAN, J. Antifungal activity of extracts from endophytic fungi associated with *Smallanthus* maintained in vitro as autotrophic cultures and as pot plants in the greenhouse. *Microbiology*, v. 58, p. 1202-1211, 2012.

SANO, A.; NAKATSU, S.; YARITA, K; TAKAYAMA, A. *Trichosporon sp. isolated from a salamander (Hynobius nebulosus)*. Ayako Sano Department of Animal Sciences: Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus, 2008.
Disponível em:
<[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/198278114?report=genbank&log\\$=nucleotide&blast_rank=1&RID=TU7FJ0CE015](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/198278114?report=genbank&log$=nucleotide&blast_rank=1&RID=TU7FJ0CE015)>. Acesso em: 22 maio, 2013.

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*, v. 239, p. 319–23, 2004.

SAPARRAT, M. C.; GUILLÉN, F.; ARAMBARRI, A. M.; MARTÍNEZ, A. T.; MARTÍNEZ, M. J. Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *Coriolopsis rigida*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, p. 1534-1540, 2002.

SCHLOSS et al. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, n. 23, p. 7537-7541, 2009.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a Computer Program for Defining Operational Taxonomic Units and Estimating Species

Richness. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 3, p. 1501–1506, 2005.

SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L.; RYABIN, T.; HALL, J. R.; SCHOCH, C. L.; SEIFERT, K. A.; HUHNDOERF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J. L.; LEVESQUE, C. A.; CHEN, W.; FUNGAL BARCODING CONSORTIUM. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, n. 16, p. 6241-6246, 2012.

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, p. 337-370, 1995.

SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, n. 14, p. 5435-5440, 8, 2008.

SCORZETTI, G.; FELL, J.W.; FONSECA, A.; STATZELL-TALLMAN, A. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeast Research*, v. 2, n. 4, p. 495-517, 2002.

SHRESTHA, P. et al. Systematic search for cultivatable fungi that best deconstruct cell walls of *Miscanthus* and sugarcane in the field. *Applied and environmental microbiology*, v. 77, n. 15, p. 5490-5504, 2011.

SILVA-ROJAS, H.V.; CORTES-CUETO, A.L.; MOLINA-GAYOSS, E. *Identification of culturable fungi associated with declining sugarcane plants based on genealogical analyses*. Proyecto Sagarpa-Conacyt: Colegio de Postgraduados, Mexico, 2012. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/378750667?report=genbank&log\\$=nucleotide&blast_rank=6&RID=TU2VY90H014](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/378750667?report=genbank&log$=nucleotide&blast_rank=6&RID=TU2VY90H014)>. Acesso em: 25 mar. 2013.

SUDHAKARAN, V. K.; SHEWALE, J. G. Exopolysaccharide production by *Nigrospora oryzae* var. *glucanicum*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 10, p. 547-551, 1988.

SYDOW, H. Mycotheca Germanica Fasc. XLII-XLV (no. 2051–2250). *Annales Mycologici*, v. 22, n. 306, p. 257–268, 1924.

TANG, L.; ZHAO, H.; GAO, Z. *The Species Diversity Analysis on Fusarium of Field Soil in Western Henan Province*. Life Science Department: Luoyang Normal University, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/HQ176439.1>>. Acesso em 25 mar. 2013.

TROVÃO, J. et al. Can arthropods act as vectors of fungal dispersion in heritage collections? A case study on the archive of the University of Coimbra, Portugal. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 79, p. 49-55, 2013.

- URBEZ TORRES, J.R.; PELAEZ R. H.; SANTIAGO C. Y.; MARTIN, C.; MORENO, C.; GUBLER, W.D. Occurrence of *Botryosphaeria obtusa*, *B. dothidea*, and *B. parva* Associated with Grapevine Trunk Diseases in Castilla y León Region, Spain. *Plant Disease*, v. 90, n. 6, p. 835, 2006.
- U'REN, J.M.; DALLING, J.W.; GALLERY, R.E.; MADDISON, D.R.; DAVIS, E.C.; GIBSON, C.M.; ARNOLD, A.E. Diversity and evolutionary origins of fungi associated with seeds of a neotropical pioneer tree: a case study for analysing fungal environmental samples. *Mycological Research*, v. 113, n. 4, p. 432-449, 2009.
- VAN BAELE, S. A.; ESTRADA, C.; REHNER, S.A.; SANTOS, J. F.; WCISLO, W. T. Leaf endophyte load influences fungal garden development in leaf-cutting ants. *Bio Med Central Ecology*, v. 12, p. 23, 2012.
- VAN BAELE, S. A.; FERNÁNDEZ-MARÍN, H.; VALENCIA, M. C.; ROJAS, E. I.; WCISLO, W. T.; HERRE, E. A. Two fungal symbioses collide: endophytic fungi are not welcome in leaf-cutting ant gardens. *Proceedings of the The Royal Society - Biological sciences*, v. 276, n. 1666, p. 2419-26, 2009.
- VIEIRA-NETO, E.; MACIEL, A.; KASPER, D.; SOUZA, R. 2006. Jardins suspensos da Amazônia Central: história natural e um teste de hipótese sobre interações entre formigas e epífitas. In: Livro do curso de campo "Ecologia da Floresta Amazônica" (J.L. Camargo & G. Machado, eds.). PDBFF/INPA, Manaus.
- VLASÁK, J.; KOUT, J.; VLASÁK, J.; RYVARDEN, L. New records of polypores from southern Florida. *Mycotaxon*, v. 118, p. 159-176, 2011.
- WALDROP, M.P.; ZAK, D.R.; BLACKWOOD, C.B.; CURTIS, C.D.; TILMAN, D. Resource availability controls fungal diversity across a plant diversity gradient. *Ecological Letters*, v.9, n. 10, p.1127-1135, 2006.
- WANG, N.; GAO, J.; LU, B.H. *Study on etiology of raspberry stem blight*. College of Plant Protection: Jilin Agricultural University, 2013. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/491103939?report=genbank&log\\$=nucleotide&from=1&to=1&rank=1&RID=TTP3WEPU014](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/491103939?report=genbank&log$=nucleotide&from=1&to=1&rank=1&RID=TTP3WEPU014)> Acesso em 25 mar. 2013.
- WARD, D. M.; WELLER, R.; BATESON, M. M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*, v. 345, p. 63-65, 1990.
- WILSON, E. O. . Caste and division of labor in leaf-cutter ants. I. The overall pattern in *A. sexdens*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, v. 7, p. 143-156, 1980.

WIRTH, R.; HERZ, H.; RYEL, R. J., BEYSCHLAG, W.; HÖLLDOBLER, B. Herbivory of Leaf-Cutting Ants: A Case Study on *Atta colombica* in the Tropical Rainforest of Panama. Netherlands: Springer; 2003.

WU, J.Y. Da Yeh University: Dacun, Changhua, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JQ039943>>. Acesso em: 25 mar. 2013.

WU, L. et al. Geographic and tissue influences on endophytic fungal communities of *Taxus chinensis* var. *mairei* in China. *Current microbiology*, v. 66, n. 1, p. 40-8, 2013.

YANG, J.; RUEGGER, P.M.; MCKENRY, M.V. J.; BECKER, J.O.; BORNEMAN, J. Correlations between Root-Associated Microorganisms and Peach Replant Disease Symptoms in a California Soil. *PLOS ONE*, v. 7, n. 10, p.e 46420, 2012.

ZANDER, R. H. Paraphyly and the species concept, a reply to Ebach & al. *Taxon*, v. 56, n. 3, 2007.

ZHOU, L.; LI, J.; ZHAO, J. Morphology and Molecular Characters of the Endophytic Fungi from the Rhizomes of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. Department of Plant Pathology, College of Agronomy and Biotechnology: China, Agricultural University, 2007. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/146217061?report=genbank&log\\$=nucleotide&from=1&to=146217061&blast_rank=20&RID=TTVJWNV9015](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/146217061?report=genbank&log$=nucleotide&from=1&to=146217061&blast_rank=20&RID=TTVJWNV9015)> Acesso em: 25 mar. 2013.