



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - RIO CLARO

---



CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

---

FÁBIO LÚCIO ANTUNES GUEDES

FUNGOS MELANIZADOS ASSOCIADOS A  
FORMIGAS CORTADEIRAS (FORMICIDAE:  
TRIBO ATTINI)

Rio Claro,  
Estado de São Paulo – Brasil

Dezembro de 2010.



FUNGOS MELANIZADOS ASSOCIADOS A  
FORMIGAS CORTADEIRAS (FORMICIDAE:  
TRIBO ATTINI)

FÁBIO LÚCIO ANTUNES GUEDES

Orientadora: Profa. Dra. DERLENE ATTILI DE ANGELIS.

Co-orientador: Prof. Dr. FERNANDO CARLOS PAGNOCCA.

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

Rio Claro,  
Estado de São Paulo – Brasil

Dezembro de 2010.

595.796 Guedes, Fábio Lúcio Antunes  
G924f Fungos melanizados associados a formigas cortadeiras (Formicidae: Tribo Attini) / Fábio Lúcio Antunes Guedes. - Rio Claro : [s.n.], 2010  
85 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots., mapas

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Derlene Attili de Angelis  
Co-Orientador: Fernando Carlos Pagnocca

1. Formiga. 2. Microbiologia ambiental. 3. Saúva. 4. Fitopatogenos. 5. Fungos dematiaceos. 6. Fungos negros. I. Título.

Dedicado à família e amigos,

“Uma palavra de advertência a todos os que procuram uma explicação definitiva do mundo em termos de conhecimento: tome cuidado para não fazer do intelecto vosso Deus. Ele tem músculos poderosos, mas nenhuma personalidade.”

Albert Einstein

"A compaixão para com os animais é das mais nobres virtudes da natureza humana."

Charles Darwin

### Agradecimentos:

Agradeço a paciência de todos, a muitos por terem me aturado e aos poucos, e tão especiais, que foram capazes de me ajudar.

Às colegas de laboratório, começando por Aline Silva, com quem compartilhei sobretudo aventuras, dentro e fora do laboratório, e que Ilha Bela seja um lugar aprazível durante sua (invejável) estadia naquele lugar ; agradeço à Paula Sanchez (Big head) & Tati (Big Big Head) por me mostrarem superação e determinação, agradeço à Thaís Demarchi, Liu Yu Pin, Ife, Virgínia (!Que bien!), Dirce e Weilan. Desejo boa sorte à Lígia, grande amiga que conheço já há muito.

Reservo um parágrafo para agradecer a todos os colegas varões nesse laboratório: a Lucas, a André Rodrigues, uma das primeiras pessoas a me passar inspiração acadêmica e ao Prof. Pagnocca, que passa muita determinação e consciência dentro e fora de laboratório. Em especial agradeço ao grande Sílvio, pela sintonia que temos, pela proximidade de nossas cidades e pela operosidade quando o assunto é música/arte/guitarra ou apenas rock 'n' roll.

Agradeço em especial à minha equipe de trabalho, a Equipe Negra: à Ana Paula por inigualável ajuda e suporte, sempre juntos nesse ardiloso término de graduação e à Noemi, por especial presença junto de nossa equipe.

Agradeço com muitíssimo prazer à grande luz que Derlene foi para mim. É simplesmente inefável relatar o que tive de aprendizado com essa que me acolheu, o que já é uma loucura, mas que teve fé em mim. Agradeço igualmente à toda sua família, a Abel e aos pequenos Gabriel e Daniel.

Devo agradecer à bolsa FAPESP que me foi concedida de, de processo número 2009 / 10001 - 9. Agradeço também à concessão dada pelo CNPQ aos projetos de nosso laboratório, de processos número 129226/2009-2 e 302.615/2008-3; que todas essas concessões nos ajudam em muito o trabalho científico.

Fora do laboratório tenho de agradecer a todos meus amigos. Seria impossível escrever o nome de todos aqui, mas devo agradecer, sobretudo, aos meus amigos “verdes” Moyra e Sean, de quem sentirei saudades. À ala comunista, Harry, Babi e companhia, cujas afinidades são inúmeras. Esses círculos de amizades foram, certamente, o maior achado de minha vida. Agradeço, em especial, a alguns co-moradores, com quem convivi e aprendi

bastante: Beбето, Dill, Goiaba, Fii e Confirminha. Dos amigos de Minas sinto mais que saudade e espero vê-los durante a vida. Meus amigos são todos especiais para mim, Alexandre, Aline, Moita, Pel: melhores amigos ficam para sempre. Carinho especial dedico à Vânia, pessoa iluminada que me foi mestre em Tai Chi durante este último ano, à Sueli, com quem me encontrava e recebia tanto apoio e energia tão vitais e ao prof. Oswaldo Aulino, uma pessoa com a qual tive a sorte de encontrar e de me consultar sempre que precisei.

Obrigado às pessoas que conviveram comigo no dia-a-dia, “Makuta, “Alpha”, “Especialistas”, “Jackie Tequila”, “Formigueiro” e em especial a rep. “Auê” and agregados: é impossível relatar o vínculo que estabeleci com cada um que me fortaleceu para passar por essa fase de minha vida, obrigado a todas as pessoas que conheci nesse tempo aqui.

Devo agradecer à minha turma, CBN 2006, que constitui boa parte das melhores pessoas que conheci nesses anos. Lorenzo, Cogu, Sean, Pâmela, Manu, Che, Monizze, Van, Eli, Yamagami, Gisele, Cauz, Salms, Werchajzer, Babi e Pereira.

A todas as gerações de cães que tive a oportunidade de ver de perto nascerem e crescerem. Ver o nascimento de formas tão sinantrópicas de vida é um aprendizado e tanto. Agradeço, então a vinda de Pink, Bob, Mizampli, Leiskipóviapaladjézzi, Ramiciéras, Sareicimar, Sei, Só-sei-que-sei, Num-sei, Tô, Duvinicia, Baleia e Luluberê-béercovernaice (ou Berenice).

Quero deixar por escrito, aqui em todo lugar, agradecimentos a Jamille Berbare, essa artista que, mais do que ter me dado alegria, me ajudou a construir-me. Que eu seja sempre capaz de mandar e receber a boa energia que cultivei para com ela. E espero que ela tenha gostado de minha companhia nesses anos.

À toda minha família, a meus avós Júlia e Pedro (família Guedes) e aos já falecidos Marinho e Maria das Dores (família Antunes). Que meus tios e tias reconheçam o sobrinho biólogo, e que minhas primas sigam puxando saco de seu primo querido, sempre (RU!)

Agradeço à energia revitalizadora que de meus pais recebi todo esse tempo. Para com meus pais quero mais é vivê-los com zelo, retribuindo o carinho e a segurança que tiveram comigo, me vendo transformar nesse período em que fiquei fora de casa e agora nos vemos assim, adultos. É à partir deles que me construo, e anseio o crescimento. Espero proporcioná-los tudo em dobro e que assim seja.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	10
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1. Fungicultura das formigas Attini.....	14
2.2. Diversidade de fungos negros no meio ambiente.....	16
2.3. Ocorrência de fungos negros em formigas.....	17
3. OBJETIVOS.....	20
4. MATERIAL UTILIZADO.....	21
4.1. Meios de cultura:.....	21
4.1.1. Ágar aveia (OA 2%).....	21
4.1.2. Ágar batata dextrose (BDA 2%).....	21
4.1.3. Ágar extrato de malte (MEA).....	21
4.1.4. Ágar malte (MA 2%).....	22
4.1.5. Caldo de Malte 2%.....	22
4.1.6. Ágar Mycosel.....	22
4.2. Soluções e reagentes.....	23
4.2.1. Brometo de etídio.....	23
4.2.2. Corante lactofenol (azul de algodão).....	23
4.2.3. Gel de agarose 1%.....	23
4.2.4. Tampão para corrida de gel em agarose (Loading buffer).....	23
4.2.5. Solução de glicerol 30%.....	24
4.2.6. Solução salina 0,85%.....	24
4.2.7. Solução de lise celular.....	24
4.2.8. Solução de cicloheximida (actidiona).....	24
4.2.9. Solução de cloranfenicol.....	25
4.2.10. Solução de penicilina.....	25
4.2.11. Solução de estreptomicina.....	25
4.2.12. “Mix” ( PCR para micro - satélite).....	25
4.2.13. “Mix” ( PCR para amplificação).....	26
4.2.14. Solução de acetato de sódio.....	26
4.2.15. Solução dNTPS.....	26
4.2.17. Solução tampão Tris-EDTA (TE).....	27

4.2.18. Primers.....	27
5. METODOLOGIA.....	28
5.1. Locais de coleta das formigas .....	28
5.2. Isolamento dos fungos.....	30
5.2.1. Segregação e imersão .....	30
5.2.2. Flotação em óleo mineral.....	31
5.3. Identificação dos fungos.....	31
5.3.1. Identificação morfológica.....	31
5.3.1.1. Técnica de Micro – cultivo .....	32
5.3.2. Identificação molecular .....	33
5.3.2.1.Extração de DNA.....	33
5.3.2.2. Micro-satélite.....	33
5.3.2.3. Amplificação do DNA.....	33
5.3.2.4. Purificação do DNA .....	34
5.3.2.5. Seqüenciamento .....	35
5.4. Purificação e preservação das estirpes: .....	35
5.5. Preservação por ultra congelamento.....	35
5.6. Tratamento de resíduos .....	36
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	37
6.1.Fungos melanizados de maior representatividade.....	42
6.1.1. <i>Curvularia</i> .....	42
6.1.2. <i>Paraphaeosphaeria</i> .....	43
6.1.3. <i>Bipolaris</i> .....	44
6.1.4. <i>Cladosporium</i> .....	44
6.2. Fungos hialinos de maior representatividade .....	45
6.3. Banco de culturas .....	70
7. CONCLUSÕES .....	73
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	74
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

## RESUMO

As formigas cortadeiras são pragas agrícolas, pois cortam folhas verdes ativamente e utilizam fragmentos foliares para manter vivo o fungo simbiote (Agaricales: Lepiotaceae), que cultivam dentro da colônia. Estudos recentes observaram que, além do simbiote, outros fungos podem estar associados aos ninhos das formigas, como por exemplo, os que apresentam melanina na parede celular, conhecidos como dematiáceos. Historicamente, várias espécies de fungos negros encontram-se relacionados a doenças de plantas, muitas de importância econômica, por isso a alta relevância do estudo destes grupos. Esta investigação objetivou ampliar o conhecimento sobre a ocorrência destes fungos em formigas Attini.

Aplicou-se técnicas de cultivo seletivas a fim de se isolar fungos negros (dematiáceos) de ocorrência em ninhos de formigas *Atta laevigata* e *A. sexdens rubropilosa*, na premissa de compreender a capacidade dispersora das formigas para com os fungos negros.

No trabalho aqui apresentado foram identificados 66 estirpes pertencentes aos seguintes gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Oxyporus*, *Rhodotorula*, *Bipolaris*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Giberella*, *Paraphaeosphaeria*, e *Cladosporium*. Os gêneros *Bipolaris*, *Curvularia*, *Fusarium* e *Giberella* são típicos fungos oportunistas, causando infecções até mesmo em seres humanos, conforme dados na literatura. O gênero *Fusarium* é excepcional fitopatígeno, com ampla descrição e estudos com relação à sua bioquímica e genética.

O perfil dos isolados é de fito-associados (fito-patogênicos, endofíticos ou epifíticos), cumprindo uma das premissas deste trabalho em alertar sobre e caracterizar a capacidade dispersora das formigas. A compreensão de processos fito – patogênicos pode ser esclarecida à partir da caracterização de fungos oportunistas que se utilizam de insetos, em contato com o solo, para se dispersarem. A identificação de algumas estirpes com histórico patogênico eleva o nível de estudo, ganhando caráter de saúde pública.

Palavras – chave: fitopatógenos, fungos dematiáceos, simbiose, Attini

## ABSTRACT

Leafcutter ants are considered pests in agriculture for their impact in human crops, as they behave utilizing foliar fragments to raise their symbiont fungi (Agaricales: Lepiotaceae) inside their nest. Recent studies have noticed that other fungi may be associated to ants inside their nests, for instance, fungi with melanized wall, known by “dematiaceous”. Historically, many black fungi have been noticed as fitopathogens of many plant cultures with economic importance, highlighting dematiaceous ecological behavior importance in this study.

This investigation had the purpose of amplifying ecological knowledge of this fungi, isolating and identificating dematiaceous fungi found in *Attini* nests, having the intention of understanding plant pathogens dispersion by ants.

In this work, 66 isolates were characterized in the following genus: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Oxyporus*, *Rhodotorula*, *Bipolaris*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Giberella*, *Paraphaeosphaeria*, and *Cladosporium*. The genus *Bipolaris*, *Curvularia*, *Fusarium* and *Giberella* are known for their opportunistic behaviour, with some published human infections in literature. *Fusarium* is a notorious fitopathogen, with wide number of descriptions and studies involving pathogenicity development, biochemistry and genetics.

The isolates outline is of phyto – associated (phytopathogens, endophytic or epiphitic), fulfilling this work intention in alarming fungi capacity of dispersal by ants. The comprehension of phytopathogenical processes may be clarified based on the knowledge of oportunistics fungi that may utilize ants bodies for their own dispersal. The identification of isolates with capacity of infecting humans brings out public health issues.

**Keywords: phytopathogens, dematiaceous fungi, symbiosis, Attin**

## 1. INTRODUÇÃO.

Formigas dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* (ordem Hymenoptera, Família: Formicidae, Subfamília: Myrmicinae, Tribo Attini), são comumente conhecidas como “formigas-cortadeiras” por forragearem material vegetal fresco. Este substrato é utilizado no cultivo de um fungo simbiote (Agaricales: Lepiotaceae), o qual é levado pela rainha por ocasião da fundação de uma nova colônia, passando a constituir a principal fonte nutricional da mesma.

O gênero *Atta* é bastante derivado: apresenta alto grau de polimorfismo e possui inúmeras interações ecológicas a nível micro e macro-biológico, até hoje não muito bem entendidas (WEBER, 1972). Estudos têm sugerido a presença de novos simbioses envolvidos na manutenção da colônia, revelando a complexidade desta interação (RODRIGUES et al., 2008). Desde as primeiras observações feitas pelo naturalista Belt, em 1874, pioneiro na descoberta da simbiose entre formigas Attini e fungos, muitos esforços têm sido feitos a fim de se ampliar o conhecimento sobre a participação dos micro-organismos na sobrevivência dos ninhos.

Os fungos constituem um grupo muito diversificado tanto morfológica quanto ecologicamente. Podem ou não apresentar um pigmento denominado melanina na parede celular; na sua presença são chamados fungos melanizados, negros ou dematiaceos; na ausência são conhecidos como hialinos ou claros. Recentemente, fungos melanizados, foram encontrados nas colônias de formigas cortadeiras (LITTLE & CURRIE, 2007). Representantes da família Herpotrichiellaceae (filo Ascomycota, ordem Chaetothyriales), também conhecidos como “leveduras negras” foram isolados em ninhos de *Apterostigma* (LITTLE & CURRIE, 2007). Os autores sugeriram o gênero herpotriqueláceo *Phialophora* como adicional simbiote desta interação.

Estudos recentes envolvendo a fundação da colônia e a manutenção do fungo simbiote revelam a grandeza da interação entre as formigas cortadeiras e microbios (RODRIGUES et al., 2008). Os fungos cultivados pela maioria das Attini constituem basidiomicetos relacionados ao gênero *Leucoagaricus* (CHAPELA et al. 1994), porém sabe-se que o substrato onde cresce o fungo simbiote também favorece o desenvolvimento de outros micro-organismos, os quais podem apresentar características bioquímicas importantes para desempenhar uma função nas colônias (PAGNOCCA, 1997; RODRIGUES, 2004).

Por constituir um ambiente cuja biodiversidade microbiana é ainda pouco explorada, acredita-se na ocorrência de espécies fúngicas ainda não descritas, associadas às formigas cortadeiras, o que as tornam de grande interesse para estudos desta natureza. Para esclarecer a relação inseto–fungo e explorar a potencialidade de regulação populacional desses insetos, indesejáveis em regiões agrícolas, é importante investigar diferentes grupos de microorganismos que possam servir de subsídio para este objetivo. Neste contexto reside o fundamento desta pesquisa.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA.

### 2.1. Fungicultura das formigas Attini

As formigas são insetos sociais, filogeneticamente derivadas das vespas, das quais herdaram os grandes olhos compostos e as antenas sensitivas. Estima-se que tenham surgido durante o Cretáceo, há 100 milhões de anos e têm sido denominadas “sociais” por três razões principais: apresentam divisão de trabalho; existe sobreposição de gerações; há cooperatividade nos cuidados de proles mais novas (HÖLLDOBLER & WILSON, 1990).

Estudos utilizando o sequenciamento de quatro genes nucleares em Attini concluíram que a tribo apresenta duas clades distintas: Paleoattini, que forma um grupo basal monofilético (gêneros *Mycocephurus*, *Myrmicocrypta* e *Apterostima*) e Neoattini (SCHULTZ; BRADY, 2008). Na segunda clade, observam-se gêneros primitivos (*Mycetophylax*, *Mycetarotes*, *Cyphomyrmex* e *Mycetagroicus*), gêneros de transição (*Sericomyrmex* e *Trachomyrmex*), e um grupo mais derivado (gêneros *Atta* e *Acromyrmex*).

O grupo das Attini é mono-filético, contendo cerca de 230 espécies descritas até o momento, sendo exclusivas do Novo Mundo e de abundante distribuição Neotropical. Estendem-se desde a Argentina aos Estados Unidos, a 44° latitude sul e 40° de latitude norte (WHEELER, 1926). São consideradas pragas agrícolas e a denominação “formigas cortadeiras” refere-se aos gêneros *Acromyrmex* (quenquéns) e *Atta* (saúvas). Acredita-se que desenvolveram a habilidade de cultivar o fungo logo após a separação das Américas do continente africano, pela dinâmica das placas tectônicas. Todas as Attini são dependentes da manutenção do jardim de fungo, que é o principal fornecedor de alimento para a colônia (SCHULTZ, 2007).

A associação entre fungos e formigas é um evento muito curioso e único na natureza, uma relação de mútuo convívio e dependência, estimada em aproximadamente 50 milhões de anos. Existem várias hipóteses sobre a origem desta simbiose baseadas em dois modelos gerais: a “visão mirmicocêntrica”, onde a simbiose teria se dado por necessidade das formigas em se alimentarem dos fungos, e a micocêntrica, que defende uma necessidade de dispersão do fungo, o qual utiliza as formigas como vetores (MUELLER et al, 2001).

Segundo Chapela et al. (1994), a fungicultura das Attini pode ser dividida em cinco sistemas biologicamente distintos de acordo com o tipo de fungo cultivado e os substratos empregados para manutenção do mesmo: (i) “agricultoras primitivas”, praticado principalmente pelos gêneros menos derivados, onde o cultivo é pouco específico e com grande variedade de fungos cultivares da tribo Leucocoprineae ; (ii) “coral fungus agriculture”, praticada por espécies de *Apterostigma* que cultivam fungos da família Pterulaceae; (iii) “cultivadoras de leveduras”, praticada pelo “grupo rimosus” de formigas *Cyphomyrmex*, (iv) “agricultoras generalistas mais derivadas”, praticada por Attini intermediárias que não cortam folhas e (v) “agricultoras cortadoras de folhas”, praticada pelos gêneros mais derivados, *Atta* e *Acromyrmex*, cujo cultivar é específico. (SHULTZ, 2005).

As operárias selecionam as plantas a serem cortadas e cultivam o fungo simbiote sobre os fragmentos vegetais, dando origem ao jardim de fungo utilizado para a alimentação da prole (WEBER, 1972).

Em um “jardim de fungo” de formigas cortadeiras podemos verificar duas partes: a superior (esponja nova), caracterizada por ser mais nova, constituída de folhas relativamente frescas e de micélios do fungo recém-implantados; a inferior, (esponja velha), porção do jardim onde o fungo já está estabelecido há mais tempo e onde o material vegetal já foi bastante exaurido, PAGNOCCA et al. (1996).

O fungo simbiote das Attini derivadas produz uma estrutura denominada gongilídeo na extremidade de suas hifas. Esta estrutura é muito nutritiva, sendo coletada pelas operárias e oferecida às larvas como alimento (HINKLE, 1994). Estudos observaram que há duas espécies de fungos pertencentes ao gênero *Escovopsis* (Ascomycota: Hypocreales) (CURRIE et al. 1999; CURRIE 2001) capazes de parasitar o fungo simbiote e destruir a agricultura das formigas, Até o momento conhece-se: *Escovopsis weberi* (MUCHOVEJ & DELLA LUCIA, 1990) e *E. aspergilloides* (SEIFERT et al., 1995) e O fungo parasita é altamente pernicioso à sobrevivência do ninho e alguns mecanismos de defesa contra tal ameaça vêm sendo descobertos.

Um destes mecanismos refere-se à presença de uma bactéria filamentosa do gênero *Pseudonocardia*, a qual secreta metabólitos com propriedades antifúngicas que cooperam para a proteção da colônia contra o fungo parasita (CAFARO & CURRIE, 2005). Demonstrou-se que a bactéria ocorre sobre o exoesqueleto da formiga, em cavidades denominadas “fóveas”,

onde, segundo Currie e colaboradores (2006), existe uma secreção glandular das quais as bactérias se nutrem. Estudos posteriores indicaram que a interação formiga-*Pseudonocardia* teria co-evoluído junto ao fungo simbiote e ao parasita *Escovopsis* (CAFARO & CURRIE, 2005; CURRIE et al. 2006; CALDERA et al. 2009). A bactéria *Pseudonocardia*, isolada da cutícula de *Apterostigma dentigerum* mostrou comprovada inibição do parasita *Escovopsis*, proveniente da mesma colônia, sendo o composto identificado como “*dentigerumycin*” (OH et al. 2008)

## 2.2. Diversidade de fungos negros no meio ambiente

Dentre as características evolutivas apresentadas por este grupo de fungos, associa-se o caráter melanizado da parede celular à capacidade fito-associativa, proporcionando-lhes a habilidade de colonizar plantas. A melanina comprovadamente oferece proteção imunológica, por exemplo, para que fungos endofíticos não sejam detectados como antígenos pela planta hospedeira, ou para que fungos fitopatógenos não sejam identificados como tal (RIBEIRO et al, 2006).

A melanina também proporciona capacidade de resistência à radiação U.V., facilitando a fixação dos fungos epifíticos sobre o limbo foliar, constantemente exposto à incidência dos raios solares. Favorece ainda a capacidade fotoprotetora e atua como um fator de virulência (RIBEIRO et al., 2006). A questão da incidência de raios U.V. é forte no debate sobre a conquista do meio terrestre em latitudes muito altas, como solo Antártico, onde a incidência de raios U.V. possui níveis elevadíssimos (ONOFRI, 2003).

Tanto os endofíticos quanto os fitopatógenos formam um grupo polifilético, que ocorrem associados aos tecidos fotossintetizadores; a grande maioria das plantas atua como hospedeira destes fungos, do ártico ao trópico do planeta, em ecossistemas influenciados ou não pelo homem (ARNOLD, 2007). David Hawksworth discutiu em 1991 a diversidade e a importância do estudo de fungos endofíticos. Somam-se outros trabalhos de pioneiros como: Carrol, (1978); Fisher & Petrini (1992); Sieber (1989) e Welty (1975), os quais trouxeram grande contribuição para o estudo da sistemática, ecologia e biologia evolutiva de fungos e plantas, assim como para a pesquisa aplicada na área de controle biológico e bio-prospecção.

Os fungos negros formam um grupo polifilético de reconhecimento mundial mas de restrito conhecimento ecológico. Este grupo abrange membros de ascomicetos das ordens

Chaetothyriales e Dothideales e alguns representantes basidiomicetos. A ordem Chaetothyriales apresenta patógenos e oportunistas humanos causadores da cromoblastomicose e outras doenças em órgãos humanos, bem como estirpes sapróbias e de ambientes ricos em hidrocarbonetos (MARQUES et al., 2006; VICENTE, 2000; VICENTE et al., 2001).

A plasticidade morfológica das espécies desse grupo e a pouca diferenciação das estruturas conidiais, com possíveis variações de tamanho e formato na maioria das espécies, dificultam a classificação taxonômica mediante análise morfológica. Assim, métodos de biologia molecular precisam ser empregados para tal (ATTILI et al., 1998; DE HOOG, 1999; STERFLINGER e PRILLINGER, 2001 VICENTE, 2000).

Em resumo, considera-se indiscutível a importância do estudo de micro-organismos capazes de habitar as plantas principalmente do ponto de vista sócio-econômico, tendo em vista o poder de atuarem como parasitas e causar danos a plantações. O mesmo é válido para estudos que busquem recursos biológicos para auxiliar no controle de insetos-praga.

### 2.3. Ocorrência de fungos negros em formigas

Como mencionado anteriormente, a relação com micro-organismos é vital para as formigas da tribo *Attini*: a sobrevivência da colônia depende da manutenção do jardim de fungos. O inverso também é verdadeiro, pois não há relatos da existência do fungo simbiote sem a presença das formigas (CARREIRO et al., 1997).

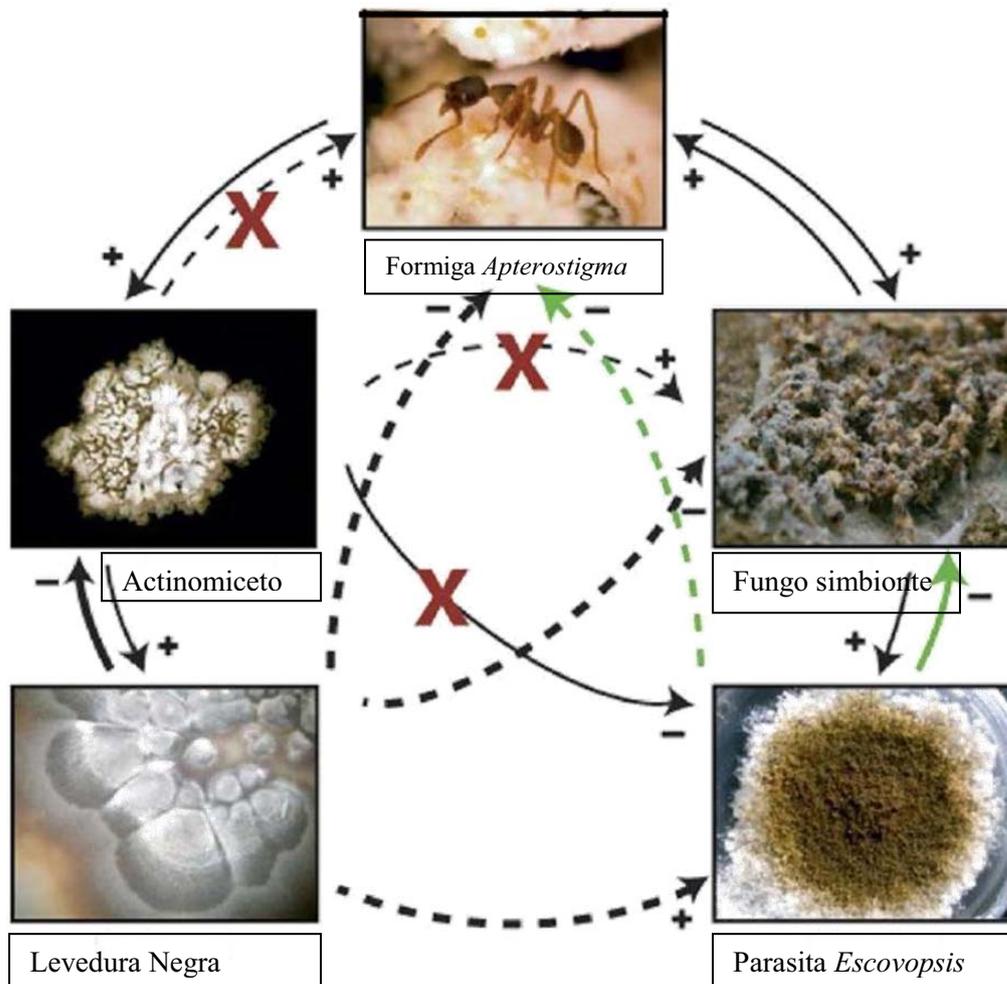
Há cerca de uma década, leveduras foram isoladas tanto de ninhos de laboratório de *A. sexdens rubropilosa*, como do depósito de lixo da colônia (PAGNOCCA et al. 1996; CARREIRO et al. 1997). Pagnocca e colaboradores (2008) isolaram leveduras dos pequenos fragmentos do jardim de fungo, carregado pelas içás durante a revoada (denominados pellets) nas espécies *A. laevigata* e *A. capiguara*. Observaram também a ocorrência de diferentes fungos em algumas partes do corpo das içás virgens, mostrando que, além do fungo simbiote, outros fungos podem ser dispersos durante a revoada.

Fisher e colaboradores (1996) determinaram que 70% da micota presente no formigueiro de *A. cephalotes* é formada pelo fungo simbiote, 20% por leveduras e 10% por outros micro-organismos. Nos trabalhos de Rodrigues e colaboradores (2005, 2008) foi

relatada a presença de fungos do solo (geofungos) nos jardins de *A. sexdens rubropilosa* e *Acromyrmex*.

A primeira menção oficial da presença de fungos melanizados da família Herpotrichiellaceae, conhecidos como leveduras negras, em ninhos de insetos sociais foi feita por Little & Currie em 2007. Entretanto, durante uma análise preliminar de uma amostra do jardim e do lixo de colônia de *A. sexdens* criada em laboratório, outras 3 espécies haviam sido isoladas: *Exophiala xenobiotica*, *Cladophialophora minourae* e *Coniosporium epidermidis* (ATTILI-ANGELIS – comunicação pessoal). Estudos complementares têm demonstrado uma ocorrência diversificada de espécies melanizadas em içás de *A. capiguara* e *A. laevigata*, a princípio não esperada. (Ana Duarte – comunicação pessoal). Além do interesse na interação ecológica deste grupo de fungos negros com as formigas, os mesmos também têm sido estudados quanto à capacidade degradadora de hidrocarbonetos. A literatura reporta que estes insetos apresentam hidrocarbonetos na constituição de suas cutículas que, dentre outras funções, lhes auxilia contra perda d'água (ENDLER et al., 2004) e permitem o reconhecimento entre indivíduos de uma mesma colônia (VANDER MEER et al., 2008).

Little & Currie (2008) realizaram bio-ensaios com leveduras negras e *Pseudonocardia* encontradas em ninhos de *Apterostigma* e constataram a influência negativa de leveduras negras sobre a bactéria produtora de antibióticos, *Pseudonocardia*. Na figura 1 observam-se as relações ecológicas atualmente aceitas.



**Figura 1:** Diagrama proposto por Little & Currie (2008) relacionando interações diretas e indiretas entre seres vivos dentro da colônia. As linhas contínuas representam efeito direto da fisiologia de uma espécie sobre a outra. As linhas pontilhadas representam efeitos indiretos, efeitos que são influenciados pela presença de uma espécie intermediária. Leveduras negras inibem efetivamente o crescimento da bactéria *Pseudonocardia*, o que leva a menor eficiência da inibição do fungo parasita *Escovopsis*. (indicado pelo “X” vermelho. Esse efeito indiretamente influencia negativamente as formigas e seu fungo simbiote, indicado pelos outros “X” vermelhos. Consequentemente, o parasita *Escovopsis* é influenciado positivamente, indicado pelas setas verdes.

### 3. OBJETIVOS.

- Isolar e caracterizar fungos melanizados a partir de soldados, operárias e do depósito de descarte de formigas Attini;
- Fomentar o acervo de fungos filamentosos e leveduras do Laboratório de Microbiologia do CEIS, sob responsabilidade do Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca;
- Fornecer ao banco de dados do acervo informações sobre as estirpes isoladas, levantando o potencial biotecnológico das mesmas, mencionado na literatura.

#### 4. MATERIAL UTILIZADO.

##### 4.1. Meios de cultura:

Todos os meios foram fundidos em micro-ondas após adição de água destilada e foram auto-clavados por 15 minutos a 120°C e 1 atm. Os reagentes seguem listados a seguir:

<u>4.1.1. Ágar aveia (OA 2%)</u>	gramas.L <sup>-1</sup>
Aveia em flocos	30,0
Ágar	13,0
Água destilada q.s.p.	1000mL

Os flocos de aveia foram fervidos em água por cerca de uma hora. Posteriormente, filtrados em gaze e o volume foi completado para 1 L.

<u>4.1.2. Ágar batata dextrose (BDA 2%)</u>	gramas.L <sup>-1</sup>
Ágar batata dextrose	39,0
Água destilada	1000 mL

<u>4.1.3. Ágar extrato de malte (MEA)</u>	gramas.L <sup>-1</sup>
Ágar Extrato de Malte	61,0
Água destilada	1000 mL

<u>4.1.4. Ágar malte (MA 2%)</u>	gramas.L <sup>-1</sup>
Extrato de Malte	20,0
Ágar	15,0
Água destilada	1000 mL

<u>4.1.5. Caldo de Malte 2%</u>	gramas.L <sup>-1</sup>
Extrato de Malte	20,0
Água destilada	1000 mL

<u>4.1.6. Ágar Mycosel</u>	gramas.L <sup>-1</sup>
Dextrose	20,0
Peptona	10,0
Ágar	20,0
Cicloheximida*	500 µL
Cloranfenicol*	200 µL
Estreptomicina*	200 µL
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Todos os antibióticos foram acrescentados posteriormente à autoclavagem, a não ser o cloranfenicol, que resiste a este processo.

\*A preparação das soluções dos antibióticos são encontradas dentro do item 4.2(Soluções e reagentes), de 4.2.8 a 4.2.11., a seguir.

## 4.2.Soluções e reagentes

### 4.2.1. Brometo de etídio

Brometo de etídio	10 mg
Tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 1x	10 mL

O brometo foi adicionado ao TBE 1x e misturados até homogeneização da solução.

### 4.2.2. Corante lactofenol (azul de algodão)

Ácido fênico fundido-fenol 1%	20 mL
Ácido láctico	20 mL
Glicerina 92%	40 mL
Azul de algodão	0,05 g

### 4.2.3. Gel de agarose 1%

	gramas.L <sup>-1</sup>
Agarose	1,0
TBE 1x	100,0 mL

### 4.2.4. Tampão para corrida de gel em agarose (Loading buffer)

Azul de bromofenol	0,025 g
Sacarose	4,0 g
Água ultra pura, qualidade Milliq <sup>®</sup>	10 mL

A solução foi homogeneizada e armazenada a 4 °C.

4.2.5. Solução de glicerol 30%

Glicerol	300 mL
Água destilada q.s.p.	700 mL

4.2.6. Solução salina 0,85% gramas.L<sup>-1</sup>

NaCl	8,5
Água destilada	1000 mL

A solução foi autoclavada por 15 minutos a 120°C e 1 atm.

4.2.7. Solução de lise celular

Tris	50 mM
Ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA)	50 mM
NaCl	250 mM
Dodecil sulfato de sódio (SDS)	0,3% (pH= 8,0)

A solução foi esterilizada com membrana de poros de 0,45 µm de diâmetro, e armazenada a temperatura ambiente.

4.2.8. Solução de cicloheximida (actidiona)

Actidiona*	1,0 g
Acetona q.s.p.	10 mL

\*A solução foi esterilizada com membrana de poros de 0,45 µm de diâmetro e mantida a -20 °C. Para a preparação do estoque a concentração foi de 100 mg.mL<sup>-1</sup>.

4.2.9. Solução de cloranfenicol

Cloranfenicol	1,0 g
Álcool 95°GL q.s.p.	10 mL

A solução foi esterilizada por filtração em membrana com poros de 0,45 µm de diâmetro e mantida a -20°C.

4.2.10. Solução de penicilina

Penicilina	1,0 g
Água destilada estéril q.s.p.	10 mL

A solução foi esterilizada por filtração em membrana com poros de 0,45 µm de diâmetro e mantida a -20°C. Para a preparação do estoque a concentração foi de 16.570 U/mL.

4.2.11. Solução de estreptomicina

Estreptomicina	1,0 g
Água destilada estéril Milliq®	10 mL

A solução foi esterilizada por filtração em membrana com poros de 0,45 µm de diâmetro e mantida a -20°C. Para a preparação do estoque a concentração foi de 100.000 µg/mL.

4.2.12. “Mix” ( PCR para micro - satélite)

dNTPs (1,25 mM cada)	4,0 µL
Buffer 10x (“tampão da Taq”)	2,5 µL
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,0 µL
Primer (GTG) <sub>5</sub> – (10 µM)	2,0 µL
Água ultrapura, qualidade Milliq® estéril	10,3 µL
Taq polimerase (5U/µL)	0,2 µL

O “mix” foi agitado em vórtex e centrifugado por cinco segundos. Posteriormente foi distribuído em alíquotas de 20 µL em microtubos de 0,2 mL previamente marcados.

#### 4.2.13. “Mix” ( PCR para amplificação)

Primer V9G	2,0 µL
Primer LS266	2,0 µL
Buffer 10x (“tampão da Taq”)	2,5 µL
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,0 µL
dNTPs (1,25 mM cada)	4,0 µL
Água ultrapura, qualidade Milliq <sup>®</sup> estéril	18,3 µL
Taq polimerase (5U/µL)	0,2 µL

O mix foi distribuído em alíquotas de 20 µL em tubos de 0,2 mL para entrarem em contato com material nuclear previamente extraído (DNA).

#### 4.2.14. Solução de acetato de sódio 3M , pH 4,6

Acetato de sódio (CH <sub>3</sub> COONa·3H <sub>2</sub> O) (Merck 6267)	20,4 g
Água ultra pura q.s.p.	50 mL

Dissolveu-se o acetato de sódio em 50 mL de água Milliq<sup>®</sup>, com ajuste do pH para 4,6 e armazenamento a -20°C.

#### 4.2.15. Solução dNTPS 1,25mM

Pipetar em microtubo de 1,5 mL, 10 µL de cada dNTP (100mM) do kit ilustra dNTP Set, 100 mM solutions - GE<sup>®</sup>. Adicionar 760 µL de água ultra pura, qualidade Milliq<sup>®</sup>. Misturar em vortex e centrifugar por alguns segundos. Aliquotar 50 µL dessa solução em microtubos de 0,5 mL.

4.2.16. Solução tampão Tris-borato-EDTA 10x (TBE, solução estoque)

Tris	108,0 g
Ácido bórico	55,0 g
EDTA	8,3 g
Água ultra pura, qualidade Milliq <sup>®</sup>	600 mL

Ajustar o pH da solução entre 8,2 - 8,3 (ajuste realizado com NaOH 1,0 M, quando necessário). Completar o volume para 1000 mL.

4.2.17. Solução tampão Tris-EDTA (TE)

Tris 1M	10 mL
EDTA 0,5M	2 mL

Ajustou-se para pH=8,0 e completou-se o volume para 1 L com água Milliq<sup>®</sup>. Autoclavado por 20 minutos a 120°C e 1atm.

4.2.18. Primers

-Para Amplificação das regiões ITS1 e ITS4

V9G (5'- TTAGgTCCCTgCCCTTgTA -3') (DE HOOG et al.,1998)

LS266 (5'-gCATTCCCAAACAACCTgACTC-3') (MAXCLAUS et al., 1995)

-Para Reação de Seqüenciamento:

ITS1 (5'-TCCgTAggTgAACCTgCgg-3') (WHITE et al., 1990)

ITS4 (5'-TCCTCCgCTTATTgATATgC-3') (WHITE et al., 1990)

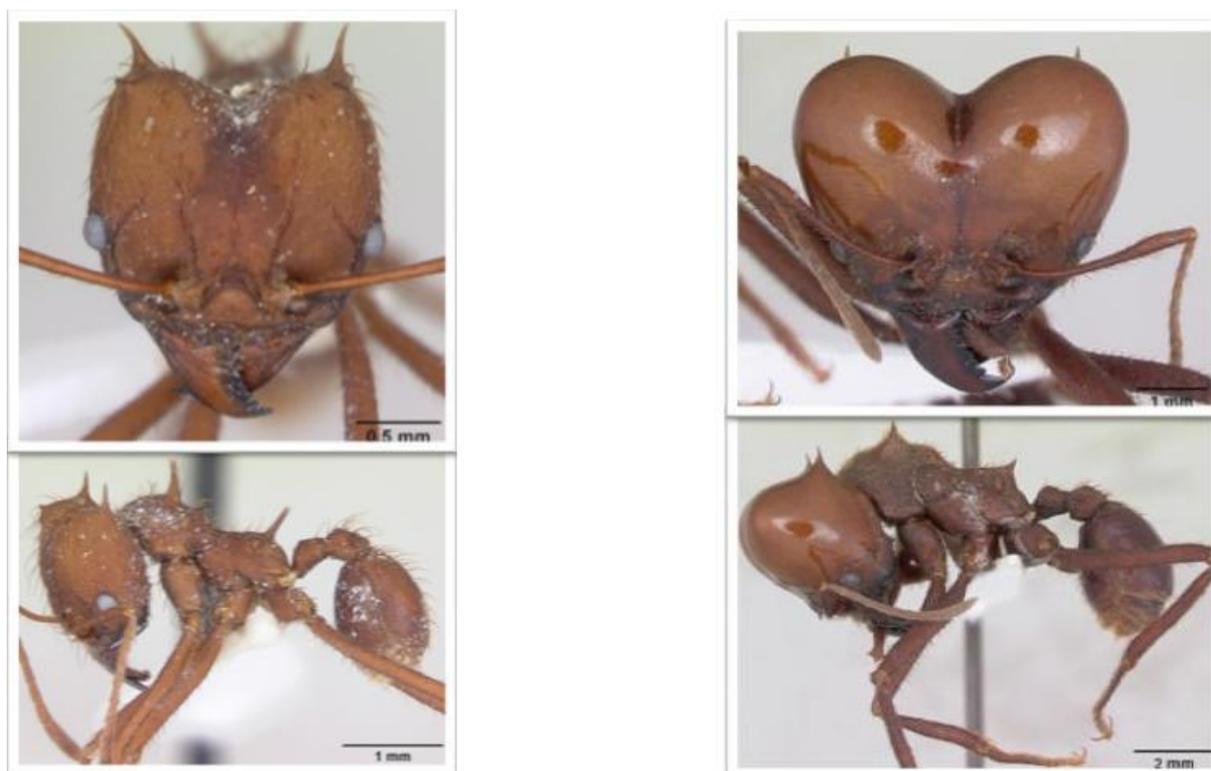
Os primers foram diluídos em tampão TE até a concentração de 10 pmol e armazenados a -20°C.

## 5. METODOLOGIA.

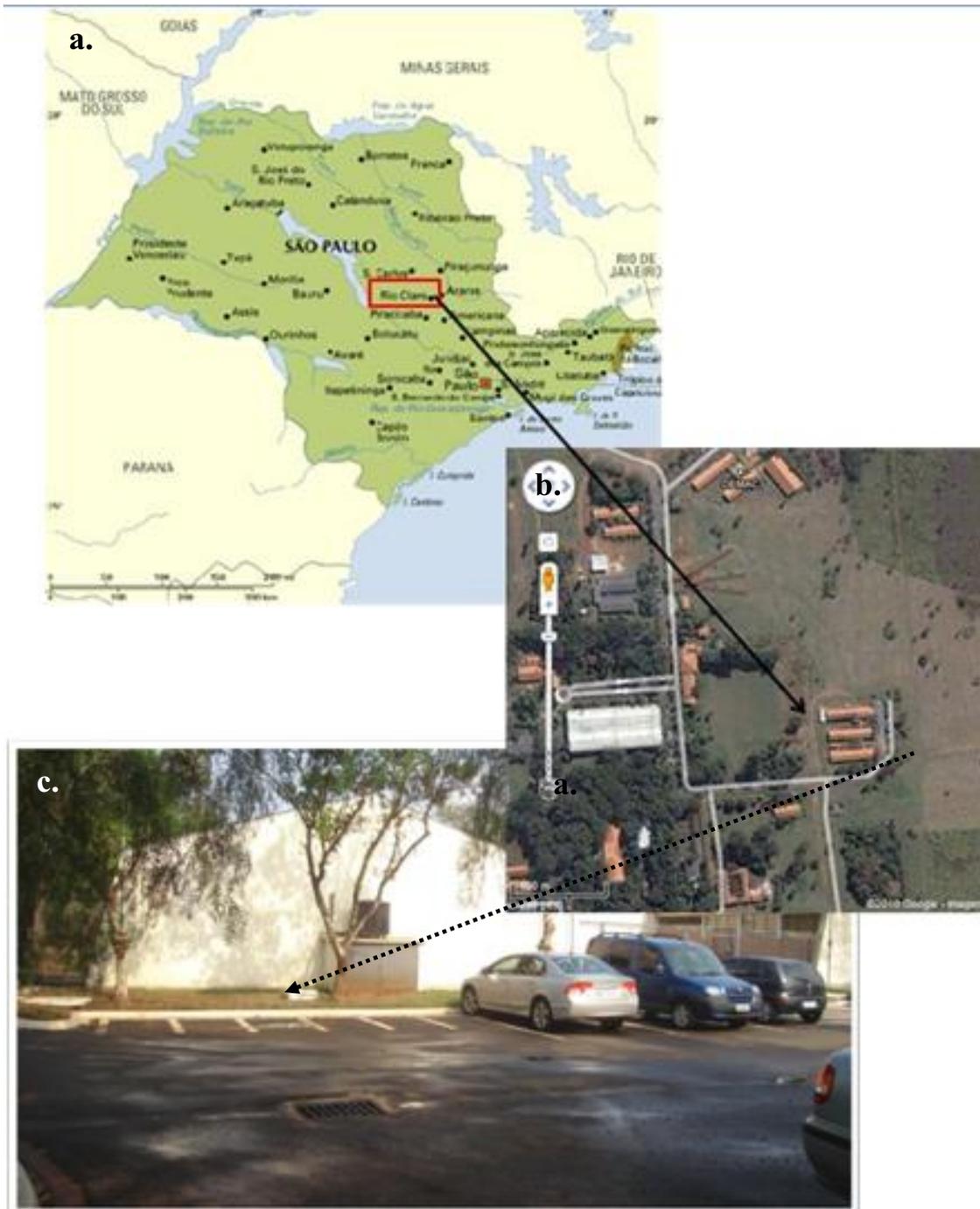
### 5.1. Locais de coleta das formigas

O primeiro local de coleta foi uma colônia de *Atta laevigata* localizado no Campus da UNESP Rio Claro (Fig. 3), próximo ao laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos de Insetos Sociais – CEIS, de onde foram obtidos indivíduos da colônia, operárias e soldados (Fig. 2).

O outro ninho, de *A. sexdens rubropilosa*, foi um ninho de lab mantido pela equipe do professor Dr. Odair Correa Bueno desde 1999 (Fig. 5) de onde foram retiradas 5g do material de descarte da colônia para os isolamentos.



**Figura 2:** Fotos de indivíduos de gênero *Atta*, utilizados para identificação e diferenciação dos ninhos. Identifica-se a espécie *Atta sexdens* (esq.), através do esmagamento da cabeça de seus indivíduos, exalando o característico cheiro de limão. Indivíduo soldado de *Atta laevigata* (dir), que possuem brilho da cabeça evidente, sendo conhecidos como “cabeça-de-vidro”. (Fonte: página antweb)

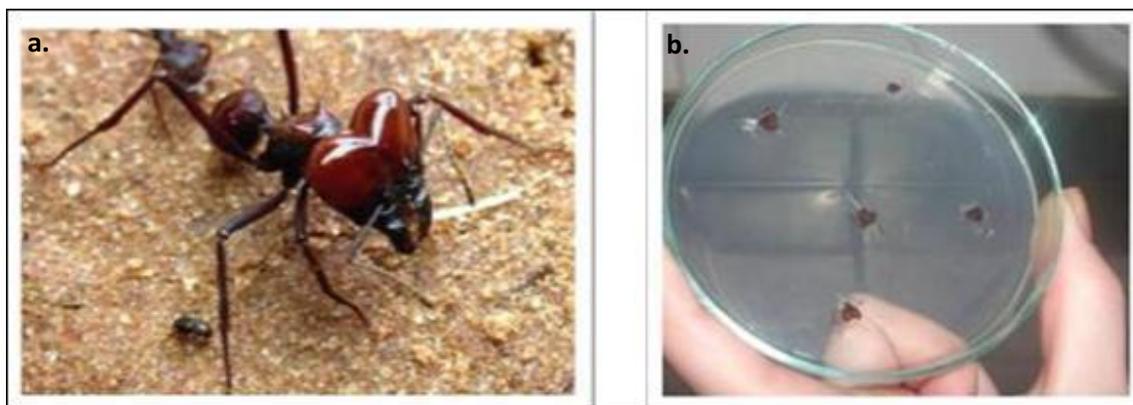


**Figura 3:** a. Localização de Rio Claro no Estado de São Paulo, Brasil; b. Foto aérea do CEIS, indicado pela seta ; c. Foto da lateral do CEIS onde foi realizada a coleta dos indivíduos de *Atta laevigata*, indicado pela seta pontilhada. (Autoria de Fábio Guedes).

## 5.2. Isolamento dos fungos

### 5.2.1. Segregação e imersão

Operárias e soldados de *A. laevigata* foram coletados assépticamente das trilhas e no laboratório foram colocados a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos, no sentido de prepará-los para o processo de isolamento. As cabeças foram retiradas e o mesossoma junto com o gáster foram raspados com bisturi. O material raspado e as cabeças foram depositados na superfície do meio Agar Mycosel, num total de 5 cabeças/placa e idêntico número de material resultante da raspagem. Ao todo doze placas foram inoculadas, seis para soldados e seis para operárias. Das seis placas, três receberam as cabeças ( $n=15$ ) e a outras três receberam o material raspado ( $n=15$ ), totalizando 60 sementeiras. A incubação feita a  $35^{\circ}\text{C}$  por aproximadamente três semanas

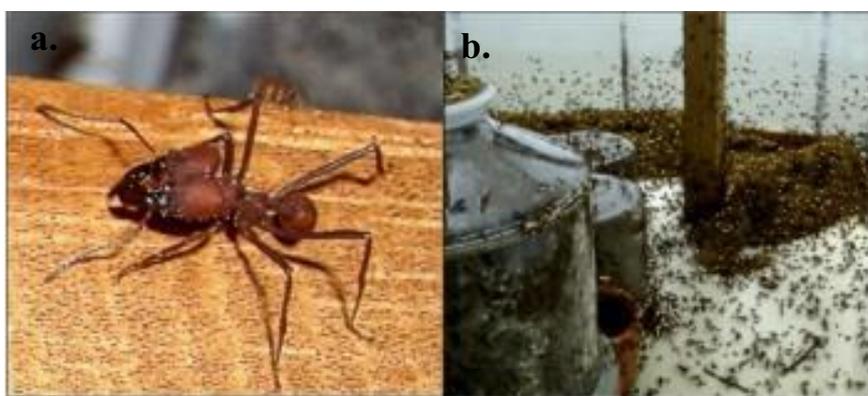


**Figura 4:** a. Detalhe de um soldado de *Atta laevigata*; b. inoculação de cabeças de soldados em Agar Mycosel

### 5.2.2. Flotação em óleo mineral:

Esta técnica somente foi utilizada para o material de descarte do ninho de laboratório de *Atta sexdens rubropilosa*. A técnica está descrita em Satow et al, 2008.

Nesse caso, foram amostrados 5g de material de descarte retiradas de um ninho de *Atta sexdens rubropilosa* criado em laboratório e mantido pela equipe do professor Dr. Odair Correa Bueno desde 1999, (Figura 5).



**Figura 5:** a. Detalhe de um indivíduo soldado de *Atta sexdens rubropilosa* de ninho de laboratório; b. Material de descarte produzido pela colônia e coletado para análise. (Autoria: Derlene Attili de Angelis).

Para o isolamento das colônias, as placas foram observadas sob estereomicroscópio durante três semanas. Procurou-se realizar uma triagem das colônias, baseando-se em características morfológicas como: coloração do micélio, superfície da colônia, tipo de margem, presença de pigmentos no meio sólido. No caso de morfologias semelhantes, optou-se por isolar ao menos três colônias como prevenção contra eventuais contaminações ou perda da capacidade de crescimento dos fungos.

### 5.3. Identificação dos fungos

#### 5.3.1. Identificação morfológica

A identificação das culturas foi feita mediante análise baseada na morfologia macro e microscópica das colônias, seguindo chaves de identificação filogenéticas clássicas (DOMSCH et al., 1993; HOOG et al., 2000). Após seleção prévia macroscópica das colônias, lâminas foram preparadas e coradas com lactofenol azul de algodão .

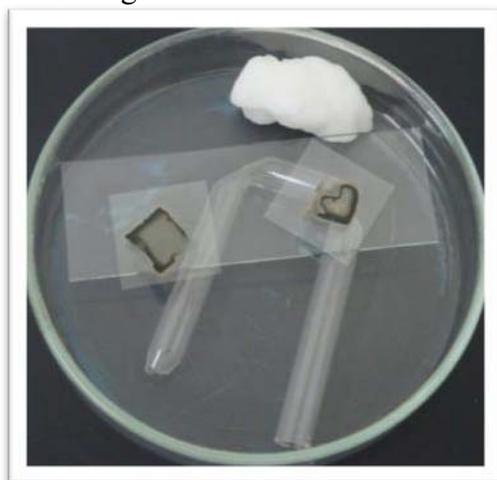
Para a caracterização macromorfológica dos fungos isolados utilizou-se três meios de cultivos diferentes: ágar malte (M.A. 2%) , ágar aveia (O.A.), para estimular a esporulação dos isolados e ágar batata (BDA) para evidenciar a característica da superfície da colônia, pois favorece o crescimento de micélio (ATTILI et al., 1993).

#### 5.3.1.1. Técnica de Micro – cultivo

O micro-cultivo é uma técnica de preparação de lâminas para a obtenção de melhores imagens de micro-organismos ao microscópio. O material utilizado foi o seguinte:

- Placa de petri
- Suporte para lâmina
- Papel filtro ou algodão
- Lâminas e lamínulas de microscopia
- Meio de cultura sólido
- Micro-espátula

Montagem: Dentro da placa de Petri colocou-se um pedaço de papel de filtro. O suporte é posto próximo do algodão, e sobre o suporte, uma lâmina para microscopia. Todo esse kit foi autoclavado por 15 minutos, a 120°C e 1 atm. Após a autoclavagem do kit, foi colocado um pequeno cubo de meio sólido, de área superficial  $\sim 0,5\text{mm}^2$ , sobre a lâmina, o suficiente para que fossem feitas quatro inoculações, uma sobre cada canto da superfície do cubo. Após a inoculação material foi coberto com uma lamínula posicionada na superfície e o papel filtro foi umedecido. Após alguns dias, a lamínula foi retirada cuidadosamente para observação microscópica do fungo.



**Figura 6:** Foto de câmara de micro-cultivo (Autoria de Ana Duarte ,comunicação pessoal).

### 5.3.2. Identificação molecular

#### 5.3.2.1.Extração de DNA

Para o processo de extração do DNA, micélio desenvolvido por cerca de 15 dias foi transferida para tubos Eppendorf de 1.500  $\mu\text{L}$  e ressuspensas em 500  $\mu\text{L}$  de tampão de lise TNES (50 mmol Tris  $\text{l}^{-1}$ ; 250 mmol de NaCl  $\text{l}^{-1}$ ; 50 mmol EDTA  $\text{l}^{-1}$ ; 0,3%, w/v, SDS; pH 8). Em seguida, o equivalente a 100  $\mu\text{L}$  de micro-esferas de vidro esterilizadas foram adicionadas. Depois de agitados em vórtex por 4 minutos, os tubos foram incubados por 1 hora a 65°C. Após duas repetições da ruptura das células e aquecimento em banho-maria, seguiu-se a centrifugação por 15 minutos a 13.000 rpm, e o sobrenadante foi, então, transferido para tubos Eppendorf de 2.000  $\mu\text{L}$ , previamente etiquetados. Esse material contendo DNA bruto foi armazenado a -20° C e, no momento da amplificação, diluído 1:750 (SAMPAIO et al., 2001).

#### 5.3.2.2. MSP-PCR (micro-satélite)

Para as leveduras, após o agrupamento morfológico, foi utilizada a técnica de micro-satélite para análise desses agrupamentos. Uma vez confirmada a similaridade das estirpes dentro do mesmo grupo morfológico, foram escolhidos representantes a serem seqüenciados. Especificamente em relação ao fungo filamentososo do gênero *Curvularia*, como havia suspeita de haver um grande número de isolados deste grupo a técnica de micro-satélite também foi aplicada a este grupo, a fim de se verificar se havia a ocorrência de uma só espécie em tantos isolados de mesmo gênero.

#### 5.3.2.3. Amplificação do DNA

Para a amplificação da região ITS do DNA ribossômico 26S, cada amostra de DNA foi entrou em contato com uma solução contendo: 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão de PCR; 16,5  $\mu\text{L}$  de água ultra pura estéril (Milli-Q); 1,0  $\mu\text{L}$  de “primer” V9G (10 pmol – 5’ TTA CGT CCC TGC CCT TTG TA- 3’ ); 1,0  $\mu\text{L}$  de “primer” LS266 (10 pmol – 5’ GCA TTC CCA AAC AAC TCG ACT C- 3’); 2,5  $\mu\text{L}$  dNTP mix (1 mM); 0,5  $\mu\text{L}$  Taq polimerase (1 U/ $\mu\text{L}$ ). Dessa solução, 20  $\mu\text{L}$  foi distribuído em tubos plásticos de 0,2 mL e, em seguida, 5  $\mu\text{L}$  de amostra de DNA foi

adicionado. A amplificação dos fragmentos de DNA foi realizada em termociclador programado para realizar 35 ciclos (2 minutos a 94 °C para a desnaturação inicial; desnaturação a 94 °C por 35 s; anelamento a 52 °C durante 30 s; síntese a 72 °C por 60 s e 7 minutos de extensão final). Os produtos foram aplicados em gel de agarose 1,0%, utilizando 4,0 µL de “Loading buffer” e 2,0 µL de cada amostra, acrescidos de 2,0 µL de tampão de corrida e submetidos a uma voltagem de 100 volts. O marcador de peso molecular “Ladder” de 100 pb e 1Kb foi utilizado. Produtos de aproximadamente 600 pares de bases foram obtidos, os quais foram purificados utilizando o kit de purificação de bandas de DNA (“GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit”, GE Healthcare), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante.

#### 5.3.2.4. Purificação do DNA

A purificação dos produtos do seqüenciamento foi iniciada adicionando-se 1,0 µL de solução de EDTA 125 mM. Em seguida, colocou-se 1,0 µL de solução de acetado de sódio 3M e 25 µL de etanol 100%. Esta solução foi homogeneizada de 5 – 10 vezes com a pipeta. Os tubos fechados foram deixados no escuro, em repouso, por 15' e então centrifugados por 25' a 15.000g. Removeu-se o líquido no fundo do tubo com cautela, pois ao fundo está depositado o DNA. Em seguida, 35 µL de etanol 70% foram adicionados e os tubos foram centrifugados por 10' a 15.000g. Novamente o líquido foi removido e os tubos foram deixados a secar em SPEED VAC por 10', sem aquecimento, e depois mantidas ao abrigo da luz por 1-2 horas ou overnight para evaporar todo etanol. As amostras foram então ressuspensas em 10 µL de Hi Di Formamida (Applied Biosystems), misturadas no vórtex por 15'' e centrifugadas por 5 segundos. Em seguida, foram colocadas no gelo e abrigadas da luz até serem aplicadas no seqüenciador.

#### 5.3.2.5. Seqüenciamento

O seqüenciamento por eletroforese capilar foi realizado no equipamento ABI 3500. Para tal, prepararam-se duas soluções contendo 2,5 µL Big Dye 3.1; 2,5 µL Save Money; água ultra-pura q.s.p. e 0,32 µL do primer ITS 1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3'), e no outro mix ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'). No fundo de cada tubo adicionou-se 1 µL do DNA amplificado e quantificado (10 - 20 ng). Um volume de 9,0 µL do mix foi transferido para cada tubo contendo o DNA. Em seguida, foram levados a um termociclador Bioer Gene Pro, programado para realizar 28 ciclos (2 minutos a 96 °C para a desnaturação inicial; desnaturação a 96 °C por 45 s; anelamento a 50 °C durante 30s; síntese a 60°C por 4 minutos e 4 minutos de extensão final). As seqüências obtidas foram editadas usando o *software* BioEdit v.7.0.5.3 (HALL, 1999).

#### 5.4. Purificação e preservação das estirpes:

A purificação de culturas contaminadas por bactérias foi feita mediante a técnica de esgotamento, no caso das leveduras. Para culturas filamentosas, a técnica mais utilizada foi a diluição dos conídios do fungo em solução salina 0,85% acrescida de antibióticos e subsequente espalhamento com alça de Drigalsky. As estirpes têm sido preservadas pelo método de repicagem contínua em tubo inclinado com ágar Malte 2%, em duplicata, mantidos em geladeira (6-8°C), no Laboratório de Microbiologia do CEIS - UNESP Campus de Rio Claro.

#### 5.5. Preservação por ultra congelamento

As estirpes isoladas foram preservadas em *ultrafreezer* mediante a técnica de criopreservação a -80°C. Dentro de microtubos de 2 mL e pérolas de vidro (3 mm diâmetro) foram esterilizados em autoclave, a 1 atm, a 120°C, durante 15 minutos. Em seguida foram etiquetados em duplicata. Em cada microtubo, foram adicionados 300 µL de caldo de malte 2%, estéril. Os fungos a serem estocados foram cultivados nos microtubos por 7 dias e então adicionados 300 µL de glicerol 30% e agitado vigorosamente em vortex por 10 segundos. Em seguida foram adicionadas as pérolas de vidro, até cobrir todo o volume líquido. Em seguida, os microtubos foram congelados por 2 horas a -20°C antes de serem transferidos para os

*ultrafreezers* a  $-80^{\circ}\text{C}$ . As duplicatas foram guardadas em caixas e *freezers* separados, para garantir uma cópia de segurança para cada estirpe.

### 5.6. Tratamento de resíduos

Os resíduos gerados pela rotina laboratorial deste estudo foram adequadamente tratados, como indicado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Relação entre resíduos sólidos produzidos, efeitos prejudiciais e forma de tratamento.

<b>Resíduo</b>	<b>Efeitos prejudiciais</b>	<b>Tratamento</b>
Materiais recicláveis (plástico, papel e embalagens)	Compõem “lixões” que poluem o meio ambiente e representam perigo às pessoas que praticam catação (MUÑOZ, 2002)	São coletados pelo Programa de Coleta Seletiva da UNESP Rio Claro para posterior processamento para a Empresa Primos (Apara de Papel)
Vidraria (Não – reciclável)	Possuem caráter cortante, apresentam riscos às pessoas que praticam a catação e seu tempo de decomposição supera 10 mil anos	Separados em tambores que, posteriormente são encaminhados para locais apropriados para reciclagem.
Resíduos infecciosos, como placas e tubos com micro-organismos cultivados em meio de cultura contendo ágar	Risco à saúde pública em decorrência à exposição a agentes patogênicos e poluição ambiental	Esterilização do material por calor úmido em autoclave durante 20 minutos a $120^{\circ}\text{C}$ .
Materiais contaminados com brometo de etídeo (luvas de nitrila, gel de agarose e vidraria)	Substância de alta toxicidade e mutagenicidade, causando danos à saúde humana e ao meio ambiente (MOREIRA, 2010)	Separados em sacos plástico azuis, devidamente etiquetados, encaminhados à Central de Resíduos da UNESP Rio Claro.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidas 77 estirpes, sendo 39 de micélio negro e 38 hialinos (Tabela 2). Dos 39 fungos melanizados a maioria (21 estirpes: 4 de operárias e 17 em soldados) foi obtida do material de raspagem do mesossoma-gaster e da cabeça (16 estirpes: 1 de operária e 15 em soldados). Duas estirpes de fungos melanizados foram isoladas do material de descarte de *A. sexdens rubropilosa*, no qual preponderaram os fungos hialinos (19 isolados) Quanto às castas, a ocorrência dos fungos negros foi maior em soldados de *A. laevigata* (32) do que em operárias (5). O revelou uma preponderância de

**Tabela 2:** Distribuição de isolados negros e hialinos no material amostrado.

Formiga	Substrato	Fungos isolados		
		Negros	Hialinos	
<i>Atta laevigata</i>	Operárias	Cabeça	1	3
	(15 indivíduos)	Mesosoma	4	2
	Soldados (15 indivíduos)	Cabeça	15	10
		Mesosoma	17	4
<i>Atta sexdens rubropilosa</i>	Material de descarte (5 gramas)		2	19
Sub-total			39	38
Total			77	

A maior ocorrência de isolados negros na cutícula dos soldados (cerca de 80%), em comparação com a porcentagem verificada nas operárias (15%) e no lixo (2%), foi inesperada. Comumente os estudos sobre a associação entre micro-organismos e formigas mencionam espécies fúngicas presentes em operárias, provavelmente em função do papel desta casta para o equilíbrio do ninho. As mesmas são consideradas muito importantes para a colônia, pois processam o substrato coletado que será incorporado no jardim de fungos e são hábeis em utilizar diversos mecanismos físicos e químicos para remover micro-organismos antagônicos ao fungo mutualista, do qual dependem (CURRIE; STUART, 2001). Os soldados, por sua vez, defendem a colônia de possíveis predadores, são diferenciados por terem partes do corpo

maiores (principalmente cabeça e mandíbulas) e podem auxiliar as operárias de formas variadas.

Buscando-se uma explicação para a preponderância de fungos negros em soldados, verificou-se que a literatura sobre a associação entre os mesmos ainda é escassa. Os poucos estudos encontrados revelaram que existem fungos capazes de causar virulência e morte em soldados, o que pode ser explorado com o objetivo de enfraquecer a defesa da colônia e controlar as formigas cortadeiras. Pesquisas revelaram que indivíduos de determinada casta podem ser mais suscetíveis que os de outra, e também que determinada espécie de fungo pode ser mais patogênica para soldados do que para operárias (LOREIRO, MONTEIRO, 2005). Trabalhando com estirpes de *Metarhizium anisopliae*, Castilho e colaboradores (2010) concluíram que o isolado ENA04 apresentou maior virulência para *Atta bisphaerica*, apesar de ter sido encontrado infectando soldados de *A. sexdens rubropilosa*. Foi interessante observar que uma espécie de formiga pode estar associada a um fungo que é mais virulento a outra espécie, o que pode ser usado pelo inseto como uma vantagem adaptativa para garantir maior competitividade.

Os fungos negros encontrados na cutícula dos soldados amostrados foram: *Alternaria arborescens*; *Curvularia clavata*; *C. lunata*; *C. trifolii*; *Bipolaris sorokiniana*; *B. eleusines*; *B. zae*, *Paraphaeosphaeria michotii*; e *Cladosporium cladosporioides*, enquanto nas operárias apenas *C. lunata* e alguns fungos negros não esporulantes (FNNE) ocorreram. A maioria das espécies identificadas tem sido reportada como fitopatogênica, com exceção de *C. cladosporioides*, cuja utilização no controle biológico da mosca branca da mandioca já foi estudada (FARIAS; SANTOS-FILHO, 1992). Ressalta-se que dentro do objetivo proposto de levantar o potencial biotecnológico das estirpes aqui isoladas, e contribuir com informações relevantes para a base de dados do acervo do Dr. Fernando C. Pagnocca, este estudo sugere que a virulência dos fungos negros encontrados, em especial as estirpes de *Cladosporium*, sejam futuramente testadas nas duas espécies de insetos investigadas.

Em termos de levantamento taxonômico, 65% dos isolados foram identificados baseando-se em características morfológicas; 21% das estirpes foram sequenciadas e 14% se mantêm estéreis. Os gêneros identificados e suas distribuições quanto ao substrato de isolamento encontram-se na Tabela 3. As informações sobre a porcentagem de cobertura e identidade molecular constam da Tabela 4.

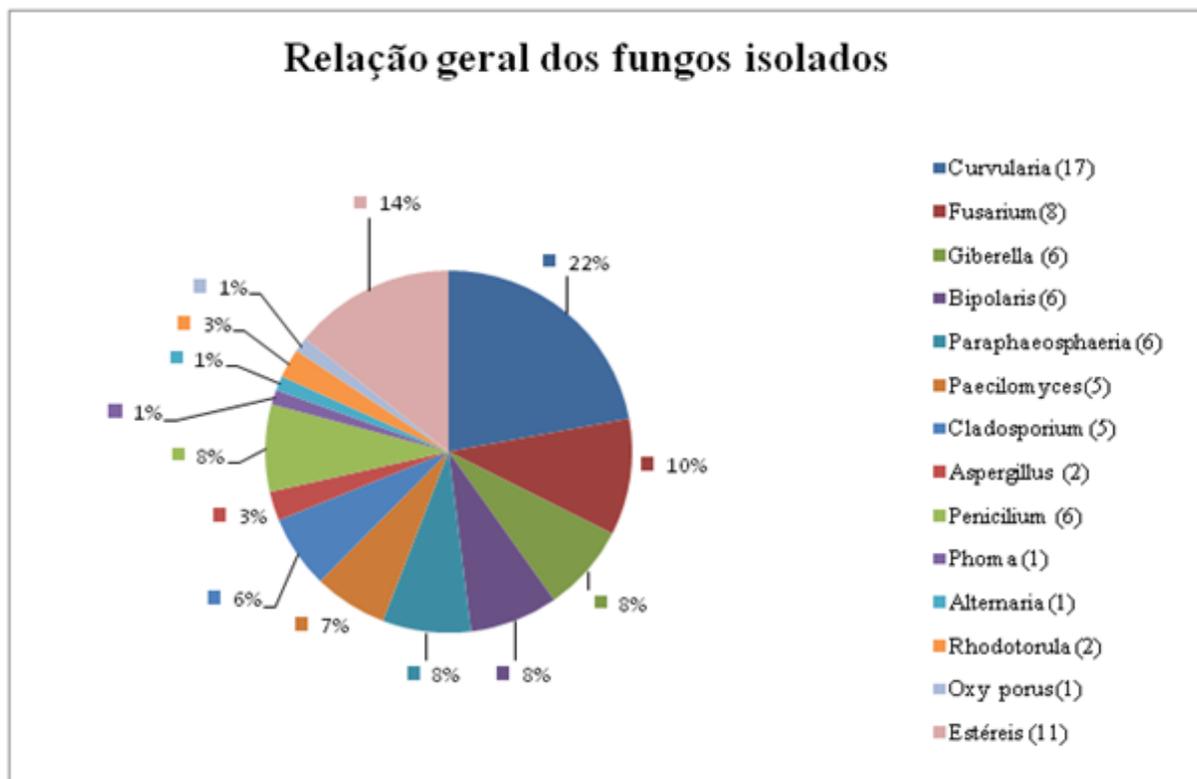
**Tabela 3:** Gêneros encontrados e os respectivos substratos de isolamento.

Gêneros identificados	Cabeça (n=15)	Mesosoma + gaster (n=15)	Material de descarte (5 gramas)	Sub-total
<i>Curvularia</i>	9	7	1	17
<i>Paraphaeosphaeria</i>	1	5	0	6
<i>Cladosporium</i>	0	4	1	5
<i>Bipolaris</i>	2	4	0	6
<i>Alternaria</i>	0	1	0	1
<i>Phoma</i>	1	0	0	1
Estéreis	2	1	0	3
<b>Sub-Total</b>	<b>15</b>	<b>22</b>	<b>2</b>	<b>39</b>
<i>Giberella</i> (teleomórfico)	5	2	1	8
<i>Fusarium</i> (anamórfico)	1	1	4	6
<i>Paecilomyces</i>	2	1	2	5
<i>Aspergillus</i>	2	0	0	2
<i>Penicillium</i>	2	0	4	6
<i>Rhodotorula</i> -like	1	1	0	2
<i>Oxyporus</i>	0	0	1	1
Estéreis	1	0	7	8
<b>Sub-total</b>	<b>14</b>	<b>5</b>	<b>19</b>	<b>38</b>
			<b>Total geral</b>	<b>77</b>

**Tabela 4.** Relação de estirpes sequenciadas e informações do *blast*.

<b>Cód.</b>	<b>Identificação</b>	<b>Max score</b>	<b>Query coverage</b>	<b>Max ident</b>	<b>N° de acesso no BLAST</b>
<b><u>01</u></b>	<i>Giberella moniliformis</i>	1208	100%	100%	AM901682.1
<b><u>26</u></b>	<i>Fusarium oxysporum</i>	1131	100%	100%	AM901682.1
<b><u>07</u></b>	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	1131	96%	98%	DQ337382.1
<b><u>17</u></b>	<i>Bipolaris eleusines</i>	1151	94%	97%	DQ337382.1
<b><u>18</u></b>	<i>Bipolaris zeae</i>	878	97%	98%	<u>EF452447.1</u>
<b><u>30</u></b>	<i>Curvularia trifolii</i>	918	99%	99%	GQ328851.1
<b><u>16</u></b>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1134	98%	98%	GQ458030.1
<b><u>27</u></b>	<i>Paraphaeosphaeria michotii</i>	1162	100%	97%	AF250817.1
<b><u>28</u></b>	<i>Paraphaeosphaeria</i> sp. (uncultured ascomycete)	1214	99%	99%	EU490092.1
<b><u>38</u></b>	<i>Paraphaeosphaeria</i> sp. (uncultured ascomycete)	1284	99%	96%	EU490092.1
<b><u>08</u></b>	<i>Phoma</i> sp.	939	95%	95%	DQ474117.1
<b><u>36</u></b>	<i>Alternaria arborescens</i>	1306	100%	99%	AY154706.1
<b><u>250</u></b>	<i>Oxyporus latemarginatus</i>	1018	96%	98%	FN252852.1

Na figura 7 encontra-se a porcentagem de ocorrência dos táxons isolados neste trabalho.



**Figura 7:** Gêneros encontrados em ninhos de *Atta* estudados. Em parênteses, o número absoluto de isolados.

Os resultados mostraram um baixo número de fungos negros no material de descarte (2), comparado ao de fungos hialinos (19). Na organização da colônia, sabe-se que uma das funções das operárias é a de manter limpa a cutícula das demais formigas, mediante um conhecido comportamento de grooming<sup>1</sup>, o que não acontece com o material de descarte. Sugere-se que este fato tenha favorecido a maior ocorrência de gêneros hialinos comuns, altamente esporulantes e cosmopolitas como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Paecilomyces*. Entretanto, a utilização de um meio de cultura seletivo como Ágar Mycosel também favoreceu o aparecimento de fungos como *Paraphaeosphaeria michotii*, *Bipolaris eleusines*, *B. sorokiniana* e *Oxyporus latemarginatus* (Agaricomycetes, Poliporaceae) que

<sup>1</sup> Grooming ou lambedura, em português: comportamento típico de seres sociais, que se ajudam mutuamente dentro de uma população a manterem-se limpos, pelos mais infinitos motivos.

possuem poucos relatos na literatura. Em formigas, são mencionados pela primeira vez, segundo fontes consultadas (<http://www.cybertruffle.org.uk>.; <http://www.indexfungorum.org/>; <http://www.jbrj.gov.br>).

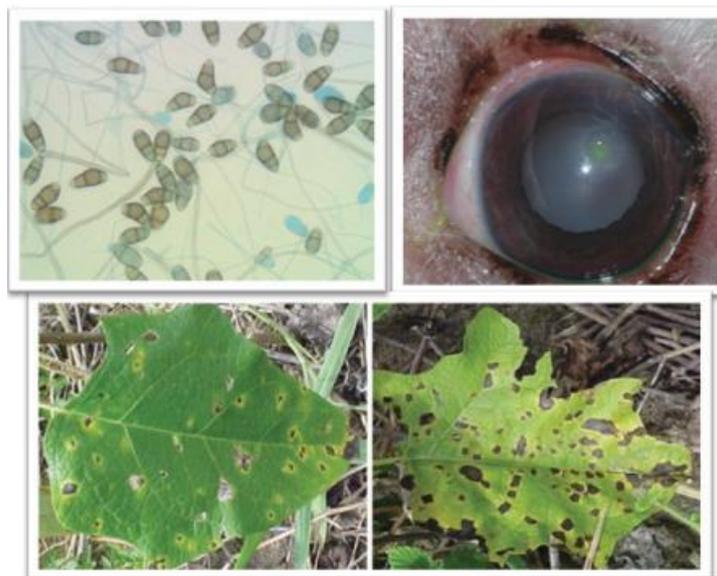
Durante a análise comparativa das sequencias obtidas dos isolados com outras bases de dados virtual do NCBI, observou-se que no gênero *Paraphaeosphaeria* as maiores similaridades resultavam em ascomiceto não cultivável. Sabe-se que diversas espécies fúngicas ainda apresentam características taxonômicas não completamente estabelecidas. Muitas espécies novas tem sido descritas, em virtude da exploração mais intensa de novos substratos de isolamento e de técnicas diversificadas de prospecção microbiana.

### 6.1.Fungos melanizados de maior representatividade

#### 6.1.1.*Curvularia*

Fungo negro mais frequente em todo o isolamento, com 22% de ocorrência. É um gênero típico de solo, e se desenvolve bem quando cultivado em meio de cultura, produzindo conídios de morfologia típica, o que facilita sua identificação. (ver fichas nas páginas 49 e 50). Os casos de fitopatogenicidade descritos para *Curvularia* são caracterizados por infecções negras, pontuais, ocorrendo em qualquer parte da planta, mas visivelmente nas folhas e de baixa a alta mortalidade. Roberts e Tredway (2008), descreveram pela primeira vez na América a ocorrência de doença foliar causada por várias espécies de *Curvularia*, muito conhecida no Japão, onde recebe o nome de “dog footprint”. Assunção (2006) realizou estudo em que isolados identificados como *Curvularia lunata* (Fig. 8) foram capazes de infectar a planta Jurubeba (*Solanum paniculatum*), considerada praga agrícola.

O gênero possui histórico patogênico (BAYLET, 1959), quando foi descrito um caso de micetoma em humanos, no Senegal. Ocorrem infecções locais, doenças alérgicas, pneumonia, abscessos cerebrais e infecções (DE HOOG et al., 2000). Rinaldi e colaboradores (1987), publicaram cinco casos de infecção em humanos por estirpes do gênero *Curvularia*. *C. lunata* e *C. trifolii* (encontradas neste estudo) possuem registros recentes alertando para a patogenicidade de cada uma destas espécies (REVANKAR, 2007). Casos fatais de feohifomicose foram descritos por pesquisadores identificando *C. lunata* como o agente da doença (CARTER, BOUDREAUX, 2004).



**Figura 8** *Curvularia lunata*. Acima, à esquerda, conídios. Acima, à direita, foto de queratomicose em olhos cão (BEM-SHLOMO, 2010). Abaixo, manchas foliares em Jurubeba (*Solanum paniculatum*) (ASSUNÇÃO, 2006).

#### 6.1.2. Paraphaeosphaeria

O gênero é pouco conhecido e possui baixo número de artigos e estudos na literatura. É um ascomiceto comumente mencionado como endofítico, sem descrição de sua ecologia. A maior parte dos trabalhos disponível na literatura se ocupa em discutir sua filogenia, com recentes mudanças quanto à classificação taxonômica. O gênero foi estabelecido por Eriksson (1967) acomodando várias espécies de ascomicetos *Leptosphaeria*, que se diferenciam pelas ornamentações das ascas. Hedjaroude (1969) adicionou uma espécie e Crivelli (1983) ampliou o conceito estabelecido por Eriksson, adicionando duas espécies que posteriormente fariam parte de *Cheatopelea* (CAMARA, 2002). Kohlmeyer (1995, 1999) descreveu duas novas espécies e atualmente reconhecem-se 22 espécies dentro do gênero (CAMARA, 2002).

### 6.1.3. *Bipolaris*

O gênero *Bipolaris* possui representantes cosmopolitas e relatados como fitopatogênicos (DOMSCH, et al. 1993). Neste trabalho, 6 isolados foram identificados, porém a identificação de espécie é complexa e controversa devido à diversidade de formas próximas a *Curvularia* e *Drechslera*. Juntos, estes gêneros formam um grande complexo de fungos fito-associados cuja taxonomia carece de maiores estudos. Todos possuem caráter reconhecidamente oportunista. As espécies dos gêneros *Drechslera* e *Bipolaris* são conhecidos entre os agricultores de todo o mundo. Alguns grupos de plantas, como palmeiras, cactos, leguminosas, gramíneas, plantas produtoras de látex, trigo, milho, arroz e café, são afetados por estas espécies (CALIGIORNE et al., 1999).

O fungo *Bipolaris sorokiniana*, agente causal da helmintosporiose da cevada (*Hordeum vulgare*), sobrevive como micélio em sementes infectadas e como sapróbios nos restos de seus hospedeiros. Sementes de cevada (*Hordeum vulgare*) encontram-se frequentemente infectadas por fungos patogênicos como *B. sorokiniana*, *Drechslera teres* e *Fusarium graminearum*, agentes causais de doenças que limitam a produtividade dessa cultura no sul do Brasil, especialmente nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná (BARBA, 2002).

### 6.1.4. *Cladosporium*

Infecções cladospóricas já foram detectadas em tecido cerebral, em lesões nos brônquios de humanos imunocompetentes e também causando granulomas cerebrais (HALIGUR, 2010). A espécie isolada, *C. cladosporioides*, é mencionada por Chew e colaboradores (2009), sendo descrito um caso de queratomicose (ataque fúngico ao tecido ocular).

Farias e colaboradores (1992) realizaram isolamento de *Cladosporium* a partir de larvas de mosca-branca (*Aleurothrixus aepim*) e sugeriram o controle biológico utilizando-se este fungo. Vários fungos entomopatogênicos, como por exemplo *Paecilomyces*, que também foi isolado em nosso trabalho, têm-se mostrado importantes no controle de pragas (FARIA; WRAIGHT, 2001).

## 6.2. Fungos hialinos de maior representatividade

O gênero *Fusarium* foi o fungo hialino mais encontrado neste trabalho, com 8 isolados. *Giberella* constitui sua forma teleomórfica. O grupo é reconhecidamente fitopatogênico.

O isolado FAH - 026 foi identificado como *F. oxysporum*, descrito na literatura como fitopatógeno de *Allium cepa*, *Baccharis* sp. e *Phaseolus vulgaris*. Não obstante, variações sub-específicas de *F. oxysporum* são infectantes de inúmeras espécies de plantas, inclusive de café e citros (DI PIETRO, 2003 ; O'DONNELL, 2007). Estudos recentes realizaram testes com *F. oxysporum* e *F. solani*, revelando que estes fungos possuem genes hospedeiro-específicos, que podem ser silenciados ou ativados com rapidez, existindo uma transferência horizontal da habilidade patogênica.

Os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Paecilomyces*, são semelhantes quanto à forma de dispersão de seus conídios que, produzidos em alta quantidade, são efetivamente transportados pelo vento. São comuns no ambiente e ao esporularem podem causar inúmeras complicações respiratórias a seres humanos, com ou sem gravidade patológica. Neste trabalho foram frequentemente isolados a partir do material de descarte da colônia. Talvez por sua alta habilidade competitiva, se sobressaiam em locais onde as formigas não pratiquem a assepsia.

A espécie *Oxyporus latermagnatus* também foi isolada do material de descarte (LEE, 2008) apresentou trabalho em que esta espécie foi capaz de produzir, *in vivo* e *in vitro*, composto que inibe o crescimento de fungos fitopatogênicos como *Alternaria alternata* e *Fusarium oxysporum* (dentre outros), propondo a realização de bio-fumigação visando controle de doenças em plantas.

Finalmente, na tabela 5 encontram-se informações sobre a importância dos táxons encontrados neste trabalho, obtidas na literatura consultada, e na sequência encontram-se as fichas informativas, referentes à foto-documentação dos fungos. As mesmas seguiram o modelo modificado de Cruz (2010).

**Tabela 5.** Aplicação biotecnológica e importância dos táxons isolados.

<b>Táxon</b>	<b>Observação</b>	<b>Referência</b>
<i>Alternaria alternata</i>	Fitopatogenia, alergênicos humanos, oportunista.	PATI et al., 2008
<i>Bipolaris</i> sp	Fitopatogenia, cosmopolitas, causam sinusites, oportunistas	CABRERA et al., 2010 ; SIVANESAN, 1987 ; TSUDA, 1987.
<i>Cladosporium</i> sp	Importância médica; controle biológico da mosca branca da mandioca - <i>Besimia argentifolii</i> ).	SUTTON, 1998; KRUSCHEWSKY et al., 2006; FARIAS, 1992
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Utilização em testes de resistência de materiais têxteis e tintas, causa doenças pulmonares e cutâneas.	ONIONS et al, 1981; DE HOOG et al, 2000
<i>Curvularia clavata</i>	Oportunista, interesse médico	DE HOOG, 2000.
<i>Curvularia lunata</i>	Doenças no globo ocular em animais, zoopatogênica, ataca córnea em humanos.	GERDING et al., 1988; LARONE, 2002.
<i>Paraphaeosphaeria michotii</i>	Fitopatogenia, cosmopolitas, oportunistas	CABRERA et al., 2010 ; SIVANESAN, 1987 ; TSUDA, 1987.
<i>Fusarium oxysporum</i>	Fitopatógeno; Fitopatogenia de amplo espectro, oportunista, notificações quanto a patogenia em hospitais (imuno – deficientes).	DOMSCH et al., 1993. BOUTATI et al., 1997; REP & KISTLER, 2010.
<i>Paecilomyces</i> sp.	Interesse médico; biodeteriogênico.	DE HOOG et al., 2000. SAMSON et al., 2004.
<i>Penicillium</i> sp.	Produção de micotoxinas e contaminação de frutos cítricos	NORBERG; SERRA- FREIRE, 1993
<i>Oxyporus latermaginatus</i>	Fitopatogenia, metabólitos potentes contra competidores.	LEE et al., 2008 ;



## Fungos Negros

### *Curvularia clavata*. Boedijn (1933)

- 1) **Código:** FAH - 002
- 2) **Data do isolamento:** Dez/2009
- 3) **Substrato:** Raspagem de cutícula de soldado de *Atta Laevigata*
- 4) **Foto-caracterização:**



Colônia de *Curvularia sp.*, com 10 dias de crescimento, em M.A. 2%, a 25°C.



Conídios de *Curvularia sp.* (A: 400x)

### 5) **Medições:**

- Conídios: 20 – 29  $\mu\text{m}$  de comprimento x 8 – 16  $\mu\text{m}$  de largura

### 6) **Observações:**

- Formação de micélio aéreo, semelhantes a “arvoretas” negras.
- Gênero *Curvularia* possui caráter oportunista.
- Referência para identificação segundo:
  - Ellis M. B. Dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, 1971.
  - Ellis M. B. More dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Myc. Inst., Kew, 1976.



### *Curvularia* sp. Boedijn (1933)

1) **Código:** FAH - 03 , FAH – 04, FAH – 44, FAH – 50, FAH – 51, FAH – 54, FAH - 253

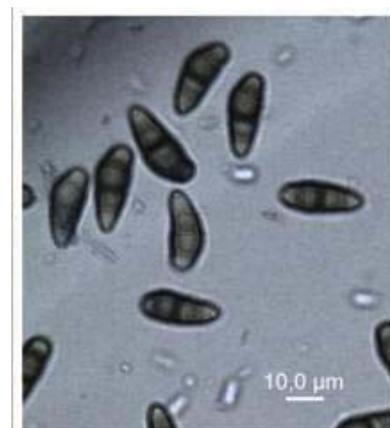
2) **Data do isolamento:** Dez/2009

3) **Substrato:** Raspagem de cutícula e cabeça de soldado de *Atta Laevigata* e material de descarte de *Atta sexdens rubropilosa*.

4) **Foto-caracterização:**



Colônia de *Curvularia* sp., com 10 dias de crescimento, em M.A. 2%, a 25°C.



Conídios de *Curvularia* sp.

5) **Medições:**

- Conídios: 20 – 25 µm de comprimento x 12 – 13 µm de largura

-Fiálides 25 – 30 µm de comprimento

6) **Observações:**

- O seqüenciamento da estirpe FAH – 44, da região ITS mostrou um coverage = 100% e Max. Identity = 99% em relação à espécie mais próxima. Código de acesso no BLAST = GQ184733.1.

Consensus FAH 44:

```
ATCATTACACAATAAACATATGAAGGCTGCACCGCCAACAGGCGGCAAGGCTGGAGTATTTTATTA
CCCTTGTCTTTTGCACACTTGTGTTTCCTGGGCGGGTTCGCCCCCTCCAGGACCACATGATAAAC
CTTTTTATGCAGTTGCAATCAGCGTCAGTACAACAAATGTAAATCATTTACAACCTTTCAACAACGG
ATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAATT
CAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTCTGA
GSGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTTTTTTGTCTTTGGTTTTGTCCAAAGACT
CGCCTTAAAAMGATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGCAGCGCAGCACATTTTTGMGCTTGCAATC
AGCAAAAGAGGACGGCACTCCATCAAGACTGTATATCACTTTTGACCTCGGATCAGG
```

- Referência para identificação segundo:

Ellis M. B. Dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, 1971.

Ellis M. B. More dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Myc. Inst., Kew, 1976.



### *Bipolaris sorokiniana*

- 1) **Código:** FAH - 007
- 2) **Data do isolamento:** Dez/2009
- 3) **Substrato:** Raspagem de cutícula de soldado de *Atta laevigata*
- 4) **Foto-caracterização:**



Colônia de *Bipolaris sorokiniana*., com 10 dias de crescimento, em M.A. 2%, a 25°C.

#### 6) **Observações:**

-Análise molecular da região ITS mostrou um coverage = 100% e Max. Identity = 97% em relação à espécie mais próxima. Código de acesso no BLAST = [EF452447.1](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?seq_1=EF452447.1).

Consensus FAH 07:

```
ATCATTACACAACAAAATATGAAGGTCTGGCTTCGCGGCCGGCTGAAGTATTTTTTTTCAC
CCATGTCTTTTGC GCACTTGTTGTTTCCTGGGCGGGTTCGCCCGCCACCAGGACCAAACCA
TAAACCTTTTTTTTATGTAGTTGCAATCAGCGTCAGTAAAAACAATGTAATTATTACAAC
TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTGTACCTTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGG
CGTTTTTGTCTCTCGTTCTCGGGAGACTCGCCTTAAAACGATTGGCAGCCGGCCTACTGGT
TTCGGAGCGCAGCACATATTTTTGCGCTTTGTATCAGGAGAAAAGGACGGTAATCCATCA
AG
```

-Colônia estéril.

-Referência consultada:

DOMSCH, K. H. et al. Compendium of soil fungi. London: Academic Press. v. 1. 120p., 1980.

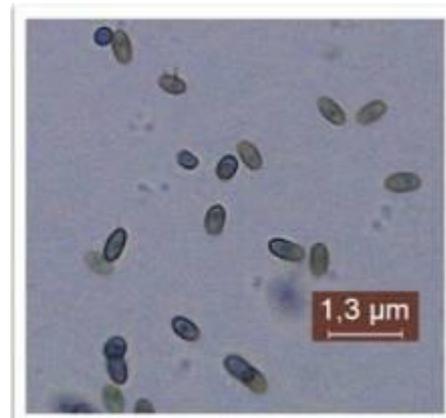


***Phoma* sp.**

- 1) **Código:** FAH – 008
- 2) **Data do isolamento:** Dez/2009
- 3) **Substrato:** Cabeça de soldado de *Atta laevigata*
- 4) **Foto - caracterização:**



Colônia de *Phoma* sp., com 10 dias de crescimento, em M.A. 2%, a 25°C.



Conídeos de *Phoma* sp. ceto isolado

**5) Observações:**

- Presença de picnídios

- Análise molecular da região ITS mostrou um coverage = 92% e Max. Identity = 95% em relação à espécie mais próxima. Código de acesso no BLAST = DQ474117.1.

Consensus FAH 008:

```
TGCGGAAGGATCATTACCTAGAGTTGTAGGCTTTGCCTGCTATCTCTTACCCATGT
CTTTTGAGCACCTTCGTTTCCTTCCGCCCGCCGACTGGACAATTTAAACCATTTGC
AGTTGCAATCAGCGTCTGAAAAAACTTAATAGTTACAACCTTTCAACAACGGATCT
CTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAAGTGTGAATTGCAGAATTCAG
TGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCGGGCGGGCCCTTGGTATTCCATG
GTGCGATAAGTGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCTTCAAGCTTTGCTTGG
TGTTGGGTGTTTGTCTCGCCTCTGCGCGTAGACTCGCCTCAAACAATTGGCAGCC
GGCGTATTGATTTTCGGAGCGCAGTACATCTCGCACTCTGCCTTCACCACGACGGC
GTCCACAAGTACATTTTACACTCTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGA
ACTTAAGCATATCAATAA
```

-Referência consultada:

DOMSCH, K. H. et al. Compendium of soil fungi. London: Academic Press. v. 1. 120p., 1980.



***Cladosporium* sp.**

1) **Código:** FAH – 009 , FAH – 046 , FAH – 047, FAH - 249

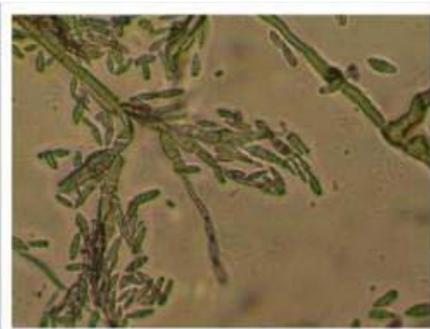
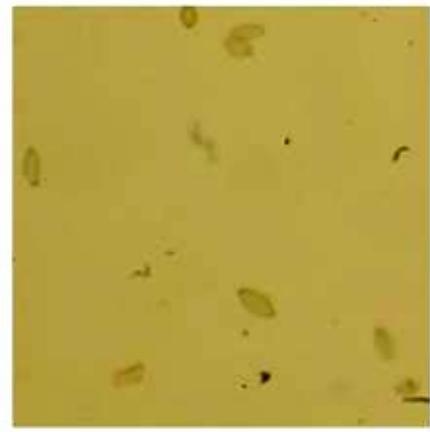
2) **Data do isolamento:** Dez/2009

3) **Substrato:** Raspagem de cutícula de soldado de *Atta Laevigata* e material de descarte de *Atta sexdens rubropilosa*

4) **Foto-caracterização:**



Colônia de *Cladosporium* sp., com 10 dias de crescimento, em M.A. 2%, a 25°C.



Conídios de *Cladosporium* sp. (A: 400x)

5) **Medições:**

- Conídios: 3 - 5  $\mu\text{m}$  de comprimento x 2 - 3  $\mu\text{m}$  de largura

6) **Observações:**

-Referência para identificação microscópica:

Crous, P. W. et al. The genus *Cladosporium* and similar dematiaceous hyphomycetes. *Studies in Mycology*, Utrecht, v. 58, 2007.



*Curvularia lunata* Boedijn (1933)

- 1) **Código:** FAH – 10 , FAH – 25 , FAH - 45
- 2) **Data do isolamento:** Dez/2009
- 3) **Substrato:** Raspagem de cutícula e cabeça de soldado de *Atta laevigata*.
- 4) **Foto-caracterização:**



Colônia de *Curvularia lunata*, com 10 dias de crescimento, em M.A. 2%, a 25°C.



Conídios de *Curvularia lunata* (A: 400x)

5) **Medições:**

- Conídios: 15 – 20  $\mu\text{m}$  de comprimento x 8 –10  $\mu\text{m}$  de largura

6) **Observações:**

- Espécie possui muitos trabalhos alertando para sua patogenicidade.
- Referência para identificação segundo:
  - Ellis M. B. Dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, 1971.
  - Ellis M. B. More dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Myc. Inst., Kew, 1976.



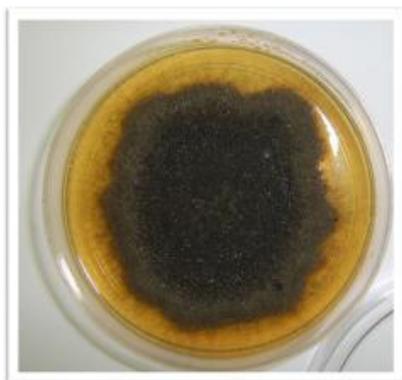
*Curvularia trifolii* Boedijn (1933)

1) **Código:** FAH – 013, FAH – 21, FAH - 24 , FAH - 30FAH – 40, FAH – 41

2) **Data do isolamento:** Dez/2009

3) **Substrato:** Raspagem de cutícula e cabeça de soldado de *Atta lavigata*

4) **Foto - caracterização:**



Colônia de *Curvularia trifolii*, com 10 dias de crescimento, em M.A. 2%, a 25°C.



Conídios de *Curvularia trifolii* (A = 400x)

5) **Medições:**

- Conídios: 20 – 22,µm de comprimento x 1,0 – 2,0µm de largura

6) **Observações:**

-O seqüenciamento da região ITS mostrou um coverage = 99% e Max. Identity = 98% em relação à espécie mais próxima (código de acesso [GQ241277.1](#))

Consensus FAH – 13:

```
ATCATTACACAATAACATATGAAGGCTGTACGCGGCTGTGCTCTCGGGCGCAGTGCTGCTGAGGCT
GGATTATTTATTTACCCTTGCTTTTTGCGCACTTGTTGTTTCCTGGGCGGGTTTCGCCCGCCAGGA
CCACACCATAAACCTTTTTTATGCAGTTGCAATCAGCGTCAGTACAACAAATGTAAATCATTTACA
ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTG
TGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAG
GGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGGCGTCTGTCTTTTGGC
TCTTTGCCAAAGACTCGCCTTAAACGATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGCAGCGCAGCACAT
TTTTGCGCTTGCAATCAGCAAAAGAGGACGGCACTCCATCAAGACTCCTTCTCACGTTGACCTCGG
```

- Referência para identificação segundo:

Ellis M. B. Dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, 1971.

Ellis M. B. More dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Myc. Inst., Kew, 1976.



*Bipolaris* sp.

1) **Código:** FAH – 14, FAH – 15, FAH - 37

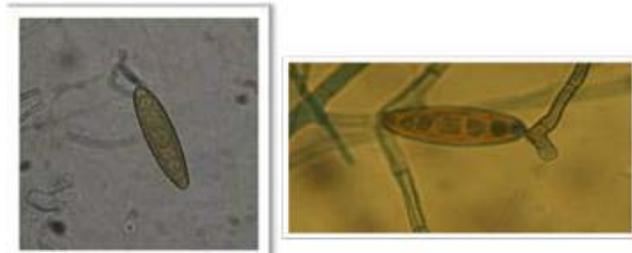
2) **Data do isolamento:** Dez/2009

3) **Substrato:** Raspagem de cutícula e cabeça de soldado de *Atta laevigata*

4) **Foto - caracterização:**



Colônia de *Bipolaris* sp. com 10 dias de crescimento, em M.A. 2%, a 25°C.



Conídios de *Bipolaris* sp.

5) **Medições:** 30 - 40  $\mu\text{m}$  de comprimento x 10 - 15  $\mu\text{m}$  de largura

6) **Observações:**

-Gênero *Bipolaris* e gên. *Drechslera* são formas anamórficas do gên. *Cochliobolus* (teleomorfo).

-Baixa capacidade esporulante (esporula sazonalmente)

-Gênero *Bipolaris* e gên. *Drechslera* são formas anamórficas do gên. *Cochliobolus* (teleomorfo).

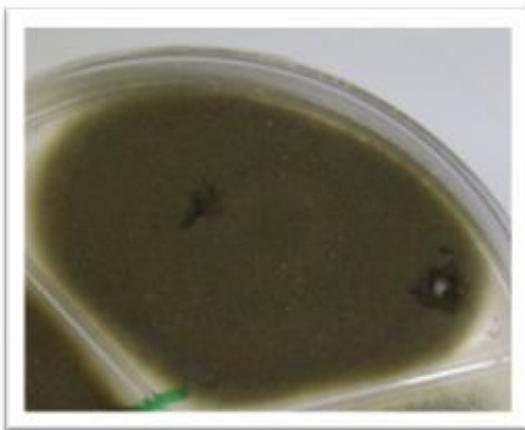
- Referência consultada:

DOMSCH, K. H. et al. Compendium of soil fungi. London: Academic Press. v. 1. 120p., 1980.

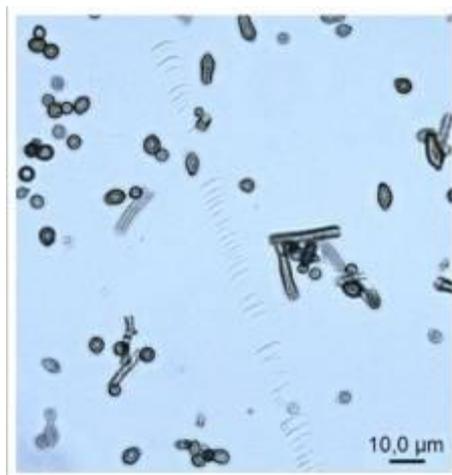


*Cladosporium cladosporioides*

- 1) **Código:** FAH - 016
- 2) **Data do isolamento:** Dez/2009
- 3) **Origem:** Raspagem de cutícula de soldado de *Atta laevigata*
- 4) **Foto - caracterização:**



Colônia de *C. cladosporioides*, com 10 dias de crescimento, em M.A. 2%, a 25°C.



Conídios de *C. cladosporioides*.

**5) Observações:**

-Espécie causadora de incomuns casos de patogenia.

- A análise da região ITS revelou um “Max ident” = 97% e “Coverage” = 98%. Cód de acesso no BLAST - GQ458030.1

Consensus FAH 16:

```
ATTGGTTTCCTTCCTGATTCCGAGGTCAACCTTAGAAATGGGGTTGCCTTTACGGCGTAGCCTCCCGAACACCT
GAGAGGTGGTTTCCACAACGCTTAGGGGACAGAAGACCCAGCGGAAGAAGAGGAGGCACGCGGCGGACCGC
GATGCCCAATACCAAGCGAGGCTTGAGTGGTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGG
GGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCG
TTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTAAAAGTTTTAATTTATTAATTAAGTTTACTCAGACTGC
AAAGTTACGCAAGAGTTTGAAGTGTCCACCCGGAGCCCCGCCCCGAAGGCAGGGTTCGCCCCGGAGGCAACAG
AGTCGGACAACAAAGGGTTATGAACATCCCGGTGGTTAGACCGGGGTCACTTGTAATGATCCCTCCGCAGGTT
CACCTACGGAGACCTTGTTACGACTTTTACTTCTCTAAATGACCGGGTTTGACCAACTTTCCGGCCCTGGGTG
GTCGTTGCCGACCTCCCTGGGCCAGTCCGAAGGCCTCACCGAGCCATTCAATCGGTAGTAGCGACGGGCGGTG
TGTACA
```

-Referência para identificação microscópica:

Crous, P. W. et al. The genus *Cladosporium* and similar dematiaceous hyphomycetes. *Studies in Mycology* v. 58, Utrecht, 2007.



### *Bipolaris eleusines*

- 1) **Código:** FAH - 17
- 2) **Data do isolamento:** Dez/2009
- 3) **Substrato:** Cabeça de soldado de *Atta Laevigata*
- 4) **Foto-caracterização:**



Colônia de *Bipolaris eleusines*, com 10 dias de crescimento, em M.A. 2%, a 25°C.

### 5) **Observações:**

- Gênero *Bipolaris* e gên. *Drechslera* são formas anamórficas do gên. *Cochliobolus* (teleomorfo).

-A análise da região ITS revelou um “Max ident” = 97% e “Coverage” = 94%. Cód de acesso no BLAST - DQ337382.1

Consensus FAH – 017:

```
TTTACGTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTCAGTGAGGCGTT
CGGACTGGCTCGGGGAGGTTGGCAACGACCACCCCAAGCCGGAAAGTTCGTCAAACCTCGGTCATTT
AGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAACAA
AATATGAAGGTCTGGCTTCGCGGCCGGCTGAAGTATTTTTTTTACCCATGTCTTTTGCGCACTTGT
TGTTTCCTGGGCGGGTTCGCCCCGCCACCAGGACCAAACCATAAACCTTTTTTTTATGTAGTTGCAAT
CAGCGTCAGTAAAAACAATGTAATTATTACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGA
TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG
AACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCTTCAAGC
TTTGCTTGGTGTGGGCGTTTTTGTCTCTCGTTCTCGGGAGACTCGCCTTAAAACGATTGGCAAACC
GGCCTACTGGTTTTCGGAGCGCAGCACATTTTTTGTCTTTGTTTCAGGAGAAAAGGACGGTAATC
CATCAAGAGCTACATTTTTTTTAACTTTTGACCTCGGATCAGGTTGGAAACCCCG
```

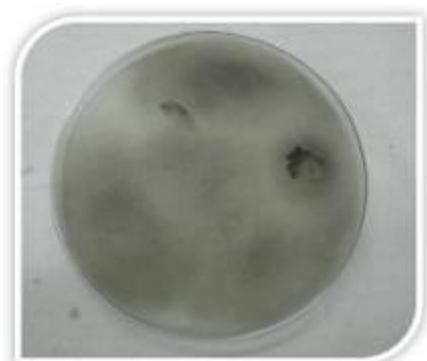
-Referência consultada:

DOMSCH, K. H. et al. Compendium of soil fungi. London: Academic Press. v. 1. 120p., 1980.



### *Bipolaris zeae*

- 1) **Código:** FAH - 018
- 2) **Data do isolamento:** Dez/2009
- 3) **Origem:** Raspagem de cutícula de soldado de *Atta laevigata*
- 4) **Foto - caracterização:**



Colônia de *Bipolaris zeae* sp., com 10 dias de crescimento, em M.A. 2%, a 25°C.



Conídios de *Bipolaris zeae*.

### 5) **Medições:**

- Conídios: 20 – 30 µm de comprimento x 13 - 20 µm de largura

### 6) **Observações:**

-A análise da região ITS revelou um “Max ident” = 98% e “Coverage” = 96%. Cód de acesso no BLAST - DQ123600.1.

Consensus FAH – 018

```
ATCATTACACAACAAAATATGAAGGTCTGGCTTCGCGGCCGGCTGAAGTATTTTTTTTCAC
CCATGTCTTTTTCGCACTTGTTGTTTCTGGGCGGGTTCGCCC GCCACCAGGACCAAACCA
TAAACCTTTTTTTTATGTAGTTGCAATCAGCGTCAGTAAAAACAATGTAATTATTACAAC
TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCTTCAAGCTTTGCTTGGTGTTGGG
CGTTTTTGTCTCTCGTTCTCGGGAGACTCGCCTTAAAACGATTGGCAGCCGGCCTACTGGT
TTCGGAGCGCAGCACATATTTTTGCGCTTTGTATCAGGAGAAAAGGACGGTAATCCATCA
AGACTACATTTTTTTTAACTTTGACCTCGGATCAGGTACGGTCCCAT
```

-Referência consultada:

DOMSCH, K. H. et al. Compendium of soil fungi. London: Academic Press. v. 1. 120p., 1980.



*Paraphaeosphaeria michotii* Erikss (1967)

- 1) **Código:** FAH – 027 , FAH - 035
- 2) **Data do isolamento:** Dez/2009
- 3) **Substrato:** Raspagem de cutícula de soldado de *Atta laevigata*
- 4) **Foto - caracterização:**



Colônia de *Paraphaeosphaeria michotii*, com 10 dias de crescimento, em M.A. 2%, a 25°C.

**5) Observações:**

-Colônia estéril.

- Análise da região ITS mostrou um “coverage” = 100% e “Max. Identity” = 97% em relação à espécie mais próxima. Código de acesso no BLAST: AF250817.1.

Consensus FAH – 27:

```
ATCATTATCCATACCAAACCAGGTGCGGTCGCGGCCCTCCGGGCAACCGGGTGGTTTCGC
GCCGCATTCCCTGCACCCTTTTTTTACGAGCACCTTTGTTCTCCTTCGGCGGGGCAACCTGC
CGCTGGAACCTTATAAAACCTTTTTTTGCATCTAGCATTACCTGTTCTGATACAAACAATCG
TTACAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC
GATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGC
CCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATCTACACCCTCAAGCTCTGCTTG
GTGTTGGGCGTCTGTCCCGCCTCTGCGCGTGGACTCGCCCCAAATTCATTGGCAGCGGTCT
TTGCCTCCTCTCGCGCAGCACAATTGCGTCTGCGAGGGGGCGTGGCCCGCGTCCACGAAG
CAACATTACCGTCTTTGACCTTCGGATCAGG
```

-Referência consultada:

DOMSCH, K. H. et al. Compendium of soil fungi. London: Academic Press. v. 1. 120p., 1980.



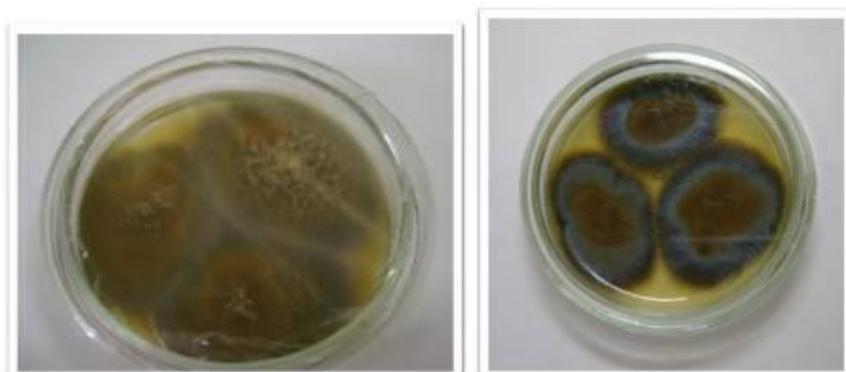
*Paraphaeosphaeria* sp. (uncultured ascomycete) Erikss (1967)

1) **Código:** FAH – 028, FAH - 38 , FAH – 39, FAH - 49

2) **Data do isolamento:** Dez/2009

3) **Substrato:** Cabeça de soldado de *Atta laevigata*

4) **Foto - caracterização:**



Colônias de *Paraphaeosphaeria* sp., com 10 dias de crescimento, em M.A. 2%, a 25°C.

5) **Observações:**

-Colônia estéril.

- Análise de região ITS da estirpe FAH - 038 revelou “Max ident”: 97% ; “coverage”: 98% , para com espécie identificada. Cód. de acesso no BLAST = EU490092.1

Consensus FAH – 038:

```
GGTGCGGTCGCGGCCTCCGGCAACCGGGTGGTTTTCGCGCCGCATTCTGCACCCTTTTTTACKAGCACCTTT
GTTCTCCTTCGCGGGGCAACCTGCCGCTGGAACCTATAAAACCTTTTTTGCATCTAGCATTACCTGTTCTGAT
ACAAACAATCGTTACAACCTTCAACAATGGATCTCTGGCTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGA
TAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCATG
GGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATCTACACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGCGTCTGTCCCCTCTGCGCG
TGGACTCGCCCCAAATTCATTGGCAGCGGTCTTTGCCTCCTCTCGCGCAGCACAAATGCGTCTGCGAGGGGGCG
TGGCCCCGCTCCACGAAGCAACATTACCGTCTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCA
TATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAA
ATTTGAAATCTGGCTCTCTTTGGGGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTTGGCATTGGCGGCGGTCTAA
GTTCTTGGAACAGGACATCACAGAGGGTGAGAATCCCGTACGTGGTTCGCTGCCCTTGCCGTGTAAGCTCCT
TTCGA
```

-Referência consultada:

DOMSCH, K. H. et al. Compendium of soil fungi. London: Academic Press. v. 1. 120p., 1980.

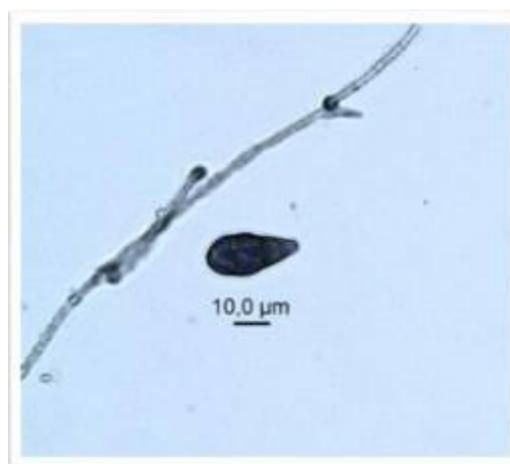


### *Alternaria arborescens*

- 1) **Código:** FAH - 036
- 2) **Data do isolamento:** Dez/2009
- 3) **Substrato:** Raspagem de cutícula de soldado de *Atta Laevigata*
- 4) **Foto-caracterização:**



Colônia de *A. arborescens*, com 10 dias de crescimento, em M.A. 2%, a 25°C.



Conídio de *Alternaria arborescens*.

### 5) Observações:

- Análise de região ITS revelou “Max ident.” = 99% ; Coverage: 100% com espécie identificada. Cód. de acesso no BLAST = AY154706.1.

Consensus FAH – 036

```
CCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTACACCCTTGTCTTTGCGTACTTCTTGTTTCCTTGGTG
GGTTCGCCACCACTAGGACAAACATAAACCTTTTGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTA
TAATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT
AAGTAGTGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTA
TTCAAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTG
TCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTTCGGAGCGCAG
CACAAGTCGCACTCTCTATYAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTCAACTTTTGACCTCG
GATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGG
ATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCC
GAGTTGTAATTTGCAGAGGGCGCTTTGGCTTTGGCAGCGGTCCAAGTTCCTTGGAACAGGACGTCA
CAGAGGGTGAGAATCCCGTACGTGGT
```

-Referência consultada:

DOMSCH, K. H. et al. Compendium of soil fungi. London: Academic Press. v. 1. 120p., 1980.



**Fungos hialinos:**  
***Giberella moniliformis***

1) Código: FAH – 001

2) Data do isolamento: Dez/2009

3) Substrato: Raspagem de cutícula de soldado de *Atta laevigata*

4) Foto - caracterização:



Colônia de *G. moniliformis*, com 10 dias de crescimento, em PDA, a 25°C.



Micro – conídios de *G. moniliformis*.

5) Medições:

- Micro-conídios: 1-2 µm de comprimento x 1-2 µm de largura

6) Observações:

-O seqüenciamento da região ITS mostrou um coverage = 100% e Max. Identity = 100% em relação à espécie mais próxima (código de acesso GU982311.1)

Consensus FAH - 001

```
ATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCAATTGTTGCCTCGGC GGATCAGC
CCGCTCCCGGTAACGACGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTCT
GAGTAAAACCATAAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAA
CGCAGCAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC
ATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCAGCTT
GGTGTGGGACTCGCGAGTCAAATCGCGTTCCCCAAATTGATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATA
GCGTAGTAGTAAAACCCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAA
TGTTGACCTCGGATCACGAGATCCCCTA
```

-Ausência de macro-conídios, produção apenas de micro-conídios, de formato semi-globoso.

-Gên. *Giberella* é teleomorfo de gên. *Fusarium*.

-Literatura consultada como referência para identificação:

Nelson et al: *Fusarium species an illustrated manual for identification*, 1983.



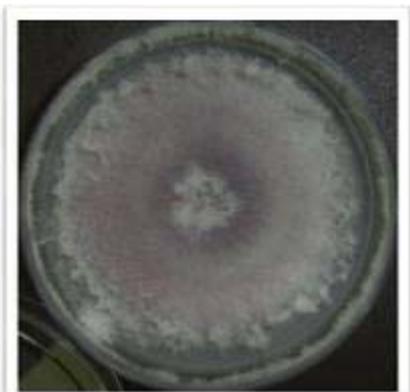
***Fusarium sp.*** (Fries, E. M., 1832)

1) **Código:** FAH – 05, FAH – 06, FAH – 22, FAH – 052 , FAH – 53, FAH – 56, FAH - 259

2) **Data do isolamento:** Dez/2009

3) **Substrato:** Raspagem de cutícula e cabeça de soldado de *Atta laevigata* e lixo de *A. sexdens rubropilosa*.

4) **Foto - caracterização:**



Colônia de *Fusarium sp.*, com 10 dias de crescimento, em P.D.A. 2%, a 25°C.



Conídios de *Fusarium sp.*

5) **Medições:**

- micro - conídios: 1 – 4  $\mu\text{m}$  de comprimento x 1,5 – 5,0  $\mu\text{m}$  de largura

-Macroconídios: 20 - 30  $\mu\text{m}$  de comprimento x 2,4 – 2,5  $\mu\text{m}$  de largura

6) **Observações:**

-Micélio aéreo branco

-Coloração lilás/roxa no centro

-Literatura consultada como referência para identificação:

- Nelson et al: *Fusarium species an illustrated manual for identification*, 1983.



### *Giberella* sp.

1) **Código:** FAH – 011, FAH – 239, FAH – 242, FAH – 248, FAH – 260,

2) **Data do isolamento:** Dez/2009

3) **Origem:** Cabeça de soldado de *Atta laevigata* e material de descarte de *Atta sexdens rubropilosa*.

4) **Foto - caracterização:**



Colônia de *Giberella* sp., crescido de 10 dias, em M.A. 2%, a 25°C.



Micro – conídios de *Giberella* sp.

5) **Medições:**

- Micro - conídios: 5,6 – 8,4 µm de comprimento x 2,5 – 2,8 µm de largura

6) **Observações:**

- Colônia de aparência macroscópica gelatinosa.
- Baixa taxa de crescimento.
- Produção de micélio aéreo na porção central da colônia.
- Presença única de micro – conídios.
- Gên. *Giberella* é teleomorfo de gên. *Fusarium*.
- Literatura consultada como referência para identificação:

Nelson et al: *Fusarium* species an illustrated manual for identification, 1983.

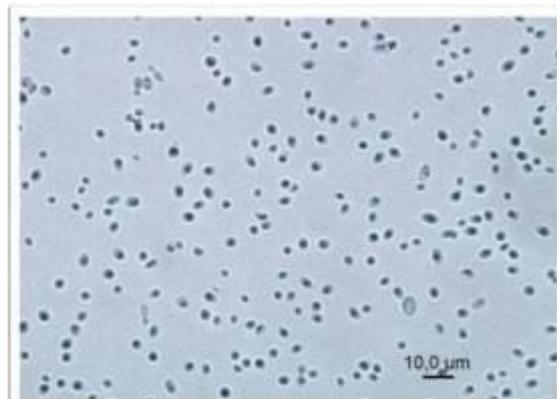


*Rhodotorula sp.*

- 1) **Código:** FAH – 12, FAH - 32
- 2) **Data do isolamento:** Dez/2009
- 3) **Origem:** Raspagem de cutícula e cabeça de soldado de *Atta laevigata*
- 4) **Foto - caracterização:**



Colônia de *Rhodotorula sp.* , com 10 dias de crescimento, em P.D.A. a 25°C.



Células de leveduras de *Rhodotorula sp.*

**5) Observações:**

- Leveduras de cor “salmão”.

-Referência consultada:

-BARNETT, J.A. et al YARROW, D. Yeasts: characteristics and identification. 3. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. 1152p.



***Paecilomyces* sp.**

1) **Código:** FAH – 023 , FAH – 29 , FAH – 48, FAH – 241, FAH - 254

2) **Data do isolamento:** Dez/2009

3) **Origem:** Corpo de soldados e operárias de *Atta laevigata* e material de descarte de *Atta sexdens rubropilosa*.

4) **Foto - caracterização:**



Colônia de *Paecilomyces* sp., com 10 dias de crescimento, em P.D.A. a 25°C.



Micro - conídios de *Paecilomyces* sp.

5) **Medições dos conídios:** 5 μm de comprimento x 4 - 5 μm de largura

**6) Observações:**

-Colônia de coloração rósea.

-Colônia altamente esporulante

-Referência para identificação:

Pitt, J. I.A Laboratory guide to common *Penicillium* species. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Div. of Food Research, 1985.



### *Fusarium oxysporum*

- 1) **Código:** FAH - 026
- 2) **Data do isolamento:** Dez/2009
- 3) **Substrato:** Raspagem de cutícula de soldado de *Atta laevigata*
- 4) **Foto - caracterização:**



Colônia de *F. oxysporum*, com 10 dias de crescimento, em P.D.A. 2%, a 25°C.

#### 5) Observações:

-Espécie de *Fusarium* estudada para casos de fito – patogenicidade.

- A análise da região ITS mostrou um “coverage” = 100% e “Max. Identity” = 100% em relação à espécie mais próxima. Código de acesso no BLAST GU982311. 1.

Consensus FAH – 026:

```
ATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCAATTGTTGCCTCGGCGG
ATCAGCCCGCTCCCGGTAACCGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTA
TATGTAACCTTCTGAGTAAACCATAAATAAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGT
TCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAG
TGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTT
CGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCAGCTTGGTGTGGGACTCGCGAGTCAAATCGCGT
TCCCCAAATTGATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCCCTCGTTA
CTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATTCA
```

-Literatura consultada como referência para identificação:

Nelson et al: *Fusarium species an illustrated manual for indentification*, 1983.



*Penicillium sp.*

1) **Código:** FAH – 034 , FAH – 42 , FAH – 238, FAH – 243, FAH – 247, FAH - 256

2) **Data do isolamento:** Dez/2009

3) **Substrato:** Cabeça de soldado de *Atta laevigata*

4) **Foto - caracterização:**



Colônias de *Penicillium sp.* com 10 dias de crescimento, em P.D.A. 2%, a 25°C.

5) **Medições:**

- Conídios: 2 - 4  $\mu\text{m}$  de comprimento x 2 - 4  $\mu\text{m}$  de largura

6) **Observações:**

-Referência para identificação:

Pitt, J. I.A Laboratory guide to common *Penicillium* species. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Div. of Food Research, 1985.

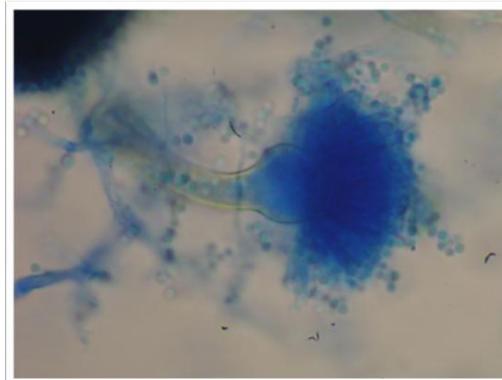


*Aspergillus sp.*

- 1) **Código:** FAH – 043 , FAH - 57
- 2) **Data do isolamento:** Dez/2009
- 3) **Substrato:** Cabeça de soldado de *Atta laevigata*
- 4) **Foto - caracterização:**



Colônia de *Aspergillus sp.* com 10 dias de crescimento, em M.A. 2%, a 25°C.



Conídios de *Aspergillus sp.* (A:400x)

**5) Medições:**

- Conídios: 2 - 4  $\mu\text{m}$  de comprimento x 2 - 4  $\mu\text{m}$  de largura

**6) Observações:**

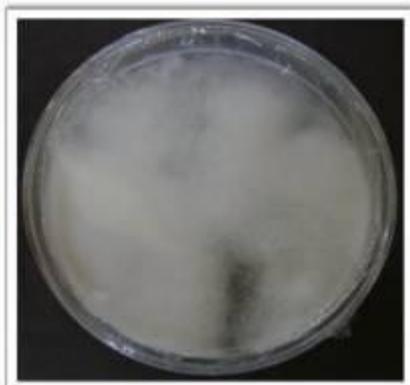
- Referência para identificação:

Pitt, J. I.A Laboratory guide to common *Penicillium* species. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Div. of Food Research, 1985.



*Oxyporus latemarginatus*

- 1) **Código:** FAH - 250
- 2) **Data do isolamento:** Dez/2009
- 3) **Substrato:** Material de descarte (lixo) de *Atta sexdens rubropilosa*
- 4) **Foto - caracterização:**



Colônia de *O. latemarginatus* com 10 dias de crescimento, em P.D.A. 2%, a 25°C.

**5) Observações:**

-Análise da região ITS mostrou um coverage = 97% e Max. Identity = 98% em relação à espécie mais próxima. Código de acesso FN252852. 1.

Consensus FAH – 150

```

ATCATTATCGAGTTTTGAACGGGTTGTAGCTGGTCTTTAACGAGACATGTGCACGC
CTGGCTCATCCACTCTCAACCTCTGTGCACTTTATGTAAGAAACGGTGTAAGTCAGCTATC
TAATAGTTGGTAATAAGCCTTTCTTATGTTTACTACAAACGCTTCAGTTATAGAATGTTTA
CTGTGTATAACACAATTATATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATG
AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAAT
CTTTGAACGCACCTTGCACCTTGGTATTCCGAGGAGTATGCCTGTTTGGAGTCTCATGGA
ATTCTCAACCCCTAAATTTTGAATGAAGTTTAGTGGGCTTGGACTTGGAGGTTGTGTCGG
CTTCTAGTCGACTCCTCTGAAATGCATTAGCGTGAATCTTACGGATCGCCTTCAGTGTGAT
AATTATCTGCGCTGTGGTGTGAAGTATTTATTAGTTCATGCTTATAGTCGCTCTTACCG
AGACAATTTATGACAATCTGAGCYCMAATCAGGWGAWCATCCCACGCTCC

```

### 6.3. Banco de culturas

As culturas isoladas foram todas armazenadas a -80°C. Todas as informações decorrentes do processo de isolamento e cultivo dos micro-organismos serão adicionadas às fichas que farão parte do banco de culturas do Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca.

**Tabela 6:** Relação de armazenamento das culturas

Estirpe nº	Substrato	Identificação	-80
0001	A	<i>Giberella moniliformis</i>	●
0002	A	<i>Curvularia clavata</i>	●
0003	B	<i>Curvularia</i> sp.	●
0004	B	<i>Curvularia</i> sp.	●
0005	B	<i>Fusarium</i> sp.	●
0006	B	<i>Fusarium</i> sp.	●
0007	A	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	●
0008	B	<i>Phoma</i> sp.	●
0009	A	<i>Cladosporium</i>	●
0010	B	<i>Curvularia lunata</i>	●
0011	B	<i>Giberella</i> sp.	●
0012	B	<i>Rhodotorula</i> -like	●
0013	A	<i>Curvularia trifolii</i>	●
0014	B	<i>Bipolaris</i> sp.	●
0015	B	<i>Bipolaris</i> sp.	●
0016	A	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	●
0017	A	<i>Bipolaris eleusines</i>	●
0018	A	<i>Bipolaris zeae</i>	●
0019	A	FNEE	●
0020	B	FNEE	●
0021	B	<i>Curvularia trifolii</i>	●
0022	A	<i>Fusarium</i> sp.	●
0023	B	<i>Paecilomyces</i> sp.	●
0024	B	<i>Curvularia trifolii</i>	●
0025	A	<i>Curvularia lunata</i>	●
0026	A	<i>Fusarium oxysporum</i>	●
0027	A	<i>Paraphaeosphaeria michotii</i>	●
0028	B	<i>Paraphaeosphaeria</i> sp.	●
0029	A	<i>Paecilomyces</i> sp.	●
0030	B	<i>Curvularia trifolii</i>	●
0031	C	FNEE	●

0032	C	<i>Rhodotorula</i> -like.	•
0033	B	FNEC	•
0034	B	<i>Penicillium</i> sp.	•
0035	A	<i>Paraphaeospheria michotii</i>	•
0036	A	<i>Alternaria arborescens</i>	•
0037	A	<i>Bipolaris</i> sp.	•
0038	A	<i>Paraphaeosphaeria</i> sp.	•
0039	A	<i>Paraphaeosphaeria</i> sp.	•
0040	A	<i>Curvularia trifolii</i>	•
0041	A	<i>Curvularia trifolii</i>	•
0042	B	<i>Penicillium</i>	•
0043	B	<i>Aspergillus</i>	•
0044	B	<i>Curvularia</i> sp.	•
0045	D	<i>Curvularia lunata</i>	•
0046	A	<i>Cladosporium</i>	•
0047	A	<i>Cladosporium</i>	•
0048	D	<i>Paecilomyces</i> sp.	•
0049	A	<i>Paraphaeosphaeria</i>	•
0050	A	<i>Curvularia</i>	•
0051	B	<i>Curvularia</i>	•
0052	B	<i>Fusarium</i>	•
0053	D	<i>Fusarium</i>	•
0054	C	<i>Curvularia</i>	•
0056	B	<i>Fusarium</i>	•
0057	D	<i>Aspergillus</i>	•
238	Descarte	<i>Penicillium</i>	•
239	Descarte	<i>Giberella</i>	•
0241	Descarte	<i>Paecilomyces</i>	•
0242	Descarte	<i>Giberella</i>	•
0243	Descarte	<i>Penicilium</i>	•
0245	Descarte	FNEC	•
0246	Descarte	FNEC	•
0247	Descarte	<i>Penicillium</i>	•
0248	Descarte	<i>Giberella</i>	•
0249	Descarte	<i>Cladosporium</i>	•
0250	Descarte	<i>Oxyporus latemarginatus</i>	•
0251	Descarte	FNEC	•
0252	Descarte	<i>lev amarela - levedura</i>	•
0253	Descarte	<i>Curvularia</i> sp	•
0254	Descarte	<i>Paecilomyces</i>	•
0255	Descarte	FNEC	•

0256	Descarte	<i>Penicilium</i>	●
0257	Descarte	FNEC	●
0258	Descarte	FNEC	●
0259	Descarte	<i>Fusarium</i>	●
0260	Descarte	<i>Giberella</i>	●

**Legenda:** Os substratos foram abreviados para A: Torax de Soldado, B: Cabeça de soldado, C: Torax de operária, D: Cabeça de operária e Descarte: material de descarte (lixo). FNEC: fungo não esporulante claro, FNEE: fungo não esporulante escuro.

## 7. CONCLUSÕES

- Fungos endofíticos (*Paraphaeosphaeria*) e fitopatógenos como *Curvularia*, *Fusarium*, *Bipolaris*, *Alternaria*, comumente presentes no ambiente, também ocorrem no corpo de operárias e soldados de colônias de formigas cortadeiras, sugerindo que podem ser dispersos pelas mesmas;
  
- Os táxons *Paraphaeosphaeria michotii*, *Bipolaris eleusines*, *B. sorokiniana* e *Oxyporus latemarginatus* foram encontrados em ninhos de formigas pela primeira vez, mostrando que a diversidade de fungos associados a estes insetos ainda carece de estudos;
  
- Fungos mencionados na literatura com potencial para aplicação biotecnológica como *Oxyporus latemarginatus*, *Fusarium* e *Paecilomyces* ocorrem em ninhos de formigas cortadeiras das espécies *A. sexdens rubropilosa* e *A. laevigata*, indicando que as mesmas constituem substratos de pesquisa interessante, e incentivando a continuidade do trabalho;
  
- A identificação molecular de estirpes dos gêneros *Bipolaris* e *Paraphaeosphaeria*, trouxe baixas relações de identidade com a base de dados do BLAST, sugerindo que podem se tratar de espécies ainda não descritas, e portanto precisam ser melhor investigadas.

## **8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.**

Ao longo do trabalho observou-se que a técnica utilizada para extração de DNA empregada em nosso laboratório é satisfatória principalmente para leveduras e outros fungos hialinos, porém para fungos melanizados optou-se por introduzir mais um passo de aquecimento a 65°C e agitação em vortex, para garantir a quebra eficiente da parede celular, mais rígida neste grupo de fungos.

A utilização de ferramentas moleculares tem sido considerada, no meio científico, determinante para a identificação de isolados microbianos, porém, nesta investigação, a taxonomia clássica nunca foi deixada de lado, e sim, utilizada conjuntamente às análises moleculares.

Este projeto serviu para mostrar o quanto os insetos estudados constituem um material rico para investigações sobre a interação ecológica entre formigas e fungos, e o quanto ainda há para se descobrir.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, British Mycological Society. Pub. Elsevier, v. 21, p. 51 – 66, 2007.

ARNOLD A.E.; ENGELBRECHT B. M. J. Fungal endophytes double minimum leaf conductance in seedlings of a tropical tree. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v. 23, p. 369–372, 2007.

ASSUNÇÃO, I. P. et al. Ocorrência de *Curvularia lunata* em Jurubeba no estado de Alagoas. **Summa phytopathology**, Botucatu, v. 32, n. 4, Set. 2006

ATTILI, D. S.; PINTO, I. M. de A.; GRANDI, R. A. P. **Técnicas para detecção, caracterização e identificação de fungos filamentosos**. Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, Campinas, SP. 1993.

ATTILI-ANGELIS, D.; DE HOOG, G. S.; PIZZIRANI-KLEINER, A. RDNA-RFLP and ITS1 sequencing of species of the genus *Fonsecaea*, agents of chromoblastomycosis. **Journal of medical and veterinary mycology**, Oxford, v. 36, p. 219 – 225, 1998.

BARBA, J. T.; REIS, E., FORCELINI, C. A. **Comparação de métodos para detecção de *Bipolaris sorokiniana* em sementes de cevada**. Fitopatol. bras. (online), , vol.27, n.4, pp. 389-394. ISSN 0100-4158, 2002.

BAYLET, J., CAMAIN, R.; SEGRETAINE, G. Identification of the agents of maduromycoses of Senegal and Mauritania. Description of a new species. **Bulletin de la Société de pathologie exotique et de ses filiales**, v. 52, p. 448-477, 1959. (Em francês).

BEN-SHLOMO, G. ; PLUMMER, C. ; BARRIE, K. ; BROOKS, D. *Curvularia* keratomycosis in a dog. **Veterinary Ophthalmology**, v. 13, n. 2, p. 126–130, 2010.

BING, L. A. ; LEWIS, L.C. Suppression of *Ostrinia nubilalis* (Huebner) (Lepidoptera: Pyralidae) by endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. **Environmental Entomology**, v. 20, p. 1207–1211, 1991.

BOUTATI, E. I. e ANAÏSSE, J. *Fusarium*, a significant emerging pathogen in patients with hematologic malignancy: ten years’ experience at a cancer center and implications for management. **The blood**, Houston, TX, v. 90, p. 999–1008, 1997.

CABRERA, M. G. ; CÚNDOM, M. A. ; A. A. ; GUTIÉRREZ, S. A. Ocorrência de *Bipolaris sorokiniana* em plantas de soja em Argentina. **Summa Phytopathology**, Botucatu, v. 36, n. 2, p. 172-174, 2010

CASTILHO A.M.C.; FRAGA, M.E.; AGUIAR-MENEZES, E.L.; ROSA, C.A.R. Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* patogênicos a soldados de *Atta*

*bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa* em condições de laboratório. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 6, online, 2010.

CAFARO, M. J.; CURRIE, C. R. Phylogenetic analysis of mutualistic filamentous bacteria associated with fungus-growing ants. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 51, n. 6, p. 441–446, 2005.

CALDERA, E. J.; POULSEN, M.; SUEN, G.; CURRIE, C. R. Insect Symbioses: A case study of past, present and future fungus-growing ant research. **Environmental Entomology**, v. 38, n.1, p. 78-92, 2009.

CANNON, P. F.; KIRK, P. M. **Fungal families of the world**. Wallingford, UK: CABI International, 2007.

CALIGIORNE, R. B.; RESENDE, M. A.; MELILLO, P. H. C.; PELUSO, C. P.; CARMO, F. H. S.; AZEVEDO, V. In vitro susceptibility of chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis agents to antifungal drugs. **Medical Mycology**, v. 37. 1999. Disponível em <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-280X.1999.00245.x/full>>. Acesso em 4 Out. 2010.

CAMARA, M.P.S.; PALM, M.E.; BERKUM, P.V.; STEWART, E.L. Systematics of *Paraphaeosphaeria*: a molecular and morphological approach. **Mycological Research**, United Kingdom, v.105: 41-56, 2001.

CARREIRO, S. C. **Pesquisa de fator *killer* e análise de degradação de polissacarídeos vegetais por leveduras associadas aos ninhos de *Atta sexdens***. 2000. 153 f. Tese (Doutorado em Microbiologia aplicada), Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2000.

CARROLL, G.C. ; CARROLL, F.E.. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, Canada, v. 56 3032–3043, 1978.

CARTER, E., AND BOUDREAUX, C. Fatal cerebral Phaeohyphomycosis due to *Curvularia lunata* in an immunocompromised patient. **Journal of Clinical Microbiol.**, v. 42, p. 5419-5423, 2004. Disponível em <<http://jcm.asm.org/cgi/content/abstract/42/11/5419>>. Acesso em 5 Out. 2010.

CHAPELA, I.H.; REHNER, S.A.; SCHULTZ, T.R.; MUELLER, U.G. Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. **Science**, Washington, v.266, n.5191, p.1691-94, 1994.

CHEW, F. L. ; SUBRAYAN, V. ; CHONG, P. P. ; GOH, M. C. ; NG, K. P. Cladosporium cladosporioides Keratomycosis: A Case Report. **Japanese Journal of Ophthalmology**, **CIDADE** v. 53, p. 648–668, 2009.

CURRIE, C. R. ; SCOTT, J. A. ; SUMMERBELL, R. C. ; MALLOCH, D. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, London, v. 398, n. 6729, p. 701-704, 1999.

CURRIE, C. R. A community of ants, fungi and bacteria: A multilateral approach to studying symbiosis. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 55, s/n, p. 357-380, 2001.

CURRIE, C. R.; STUART, A. E. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. **Proceeding of the Royal Society of London. Serie B, Biological Sciences**, London, v.268, n. 1471, p. 1033-1039, 2001.

CURRIE, C. R.; POULSE, M.; MENDENHALL, J.; BOOMSMA, J.J.; BILLEN, J. Coevolved crypts and exocrine glands support mutualistic bacteria in fungus-growing ants. **Science**, Washington, v. 331, p. 81-83, 2006.

DE HOOG, G.S. Ecology and evolution of Black yeast and their relatives: Preface. In: **Studies in Mycology**. Baarn, , n. 43, p. 3-4. May 1999.

DE HOOG, G. S. ; GUARRO, J.; GENÉ, J. ; FIGUERAS, M. J. **Atlas of Clinical Fungi**. 2nd ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures; Reus: Universitat Rovira i Virgili, p. 374 – 379, 2000.

DE HOOG, G. S.; ATTILI-ANGELIS, D. ; RODRIGUES, A. ; PAGNOCCA, F.C. **Chaetothyriales associated with leafcutter ants: opportunistic species**. In: The 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology, 2009, Tóquio. ISHAM 2009 - Tokyo Abstracts, 2009. p. 345.

DE HOOG, G.S. et al. **Atlas of Clinical Fungi**. 2 ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000. 720p.

DI PIETRO, A. ; MADRID M. P. ; Z. CARACUEL ; DELGADO-JARANA J. ; RONCERO M. I. G. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of avascular wilt pathogen. **Molecular Plant Pathology**, Cordoba, v.4, p. 315–325, 2003.

DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press. v. 1, p. 120, 1993.

FARIA, M.; WRAIGHT, S.P. Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi. **Crop Protection**, Brasil, v.20, p.767-778, 2001.

FARIAS, A.R.N.; SANTOS-FILHO, H.P. Controle de *Aleurothrixus aepim* com os fungos *Botrytis* SP. e *Cladosporium* SP. na cultura da mandioca. In: **III SICONBIOL. Simpósio de Controle Biológico**. Águas de Lindóia. 1992.

FISHER, P.J. ; PETRINI, O. Fungal saprobes and pathogens as endophytes of rice (*Oryza sativa* L.). **New Phytologist** v.120, p. 137–143, 1992. Disponível em <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8137.1992.tb01066.x/references>>. Acesso em 4 Out. 2010.

FISHER, P.J.; STRADLING, D.J.; SUTTON, B.C.; PETRINI, L.E. Microfungi in the fungus gardens of the leaf-cutting and *Atta cephalotes*: a preliminary study. **Mycological Research**, Cambridge, v. 100, n. 5, p. 541-546, 1996.

FURR, A. K. **CRC handbook of laboratory safety**. Boca Raton, 4th ed, CRC Press, 1995.

GERDING, P. A., MCLAUGHLIN, S. A., TROOP, M. W. Pathogenic bacteria and fungi associated with external ocular diseases in dogs: 131 cases (1981-1986). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 193, p. 242–244, 1988.

GOND, S.K.; VERMA, V.C.; KUMAR, A.; KUMAR, V.; KHARWAR, R.N. Study of endophytic fungal community from different parts of *Aegle marmelos* Correa (Rutaceae) from Varanasi (India). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Norwell, v.23, n.10, p.1371-1375, 2007.

HALIGUR, M. ; OZMEN, O. ; DORRESTEIN, G.M. **Fatal Systemic Cladosporiosis in a Merino Sheep Flock Mycopathologia**. Disponível em <<http://www.springerlink.com/content/3379r34742k46832/fulltext.html>>. Acesso em 4 Out. 2010.

HALL, TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, U.K., v.41, p.95-98, 1999.

HAEDER, S.; WIRTH, R.; HERZ, H.; SPITELLER, D. **Candidicin-producing *Streptomyces* support leaf-cutting ants to protect their fungus garden against the pathogenic fungus *Escovopsis***. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 106, n. 12, 4742-4746, 2009.

HAWKSWORTH, D.L. Biodiversity in microorganisms and its role in ecosystem function. *In*: SOLBRIG, O.T.; EMDEN, H.M. van; OORDT, P.G.W.J. van (Eds.). **Biodiversity and global change**. Paris: IUBS, 1992. HAWKSWORTH, D.L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**, Cambridge, v.95, n.6, p.641-655, 1991.

HINKLE, G., WETTERER, J. K., SCHULTZ, T. R., SOGIN, M. L. Phylogeny of the attine fungi based on analysis of small subunit ribosomal RNA gene sequences. **Science**, Washington, v. 226, n. 5191, p. 1695-1697, 1994.

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

- HOOG, G. S. ; GUARRO, J.; GENÉ, J. ; FIGUERAS, M. J. **Atlas of Clinical Fungi**. 2nd ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures; Reus: Universitat Rovira i Virgili, p. 374 – 379, 2000.
- KOHLMEYER, J., VOLKMANN-KOHLMEYER, B. & ERIKSSON, O. E. **Fungi on *Juncus roemerianus*. New marine and terrestrial ascomycetes**. Mycological Research 100: 393-404, 1995.
- KOHLMEYER, J., VOLKMANN-KOHLMEYER, B. & ERIKSSON, O. E. **Fungi on *Juncus roemerianus*. 12. Two new species of *Mycosphaerella* and *Paraphaeosphaeria* (*Ascomycotina*)**. Botanica Marina 42: 505-511, 1999.
- LARONE, D.H. **Medically Important Fungi: A Guide to Identification**. Elsevier Science, Washington, DC, 4. ed, 2002.
- LEE, S. O. ; KIM, H. Y. ; CHOI, G. J. ; LEE, H. B. ; JANG, K. S. ; CHOI, Y. H. ; KIM, J. C. Mycofumigation with *Oxyporus latemarginatus* EF069 for control of postharvest apple decay and *Rhizoctonia* root rot on moth orchid. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 4. ISSN 1364-5072, 2008.
- LITTLE, A. E. F. ; CURRIE, C. R. Symbiotic complexity: discovery of a fifth symbiont in the attine ant-microbe symbiosis. **Biology Letters**, London, v. 3, n. 5, p. 501-504, 2007.
- LITTLE, A. E. F. ; CURRIE, C. R. Black Yeast Symbionts Compromise the efficiency of antibiotic defenses in fungus-growing ants. **Ecological Society of America**, v. 89, n. 5, p. 1216-1222, 2008.
- LOUREIRO, E.S.; MONTEIRO, A.C. Patogenicidade de isolados de três fungos entomopatogênicos a soldados de *Atta sexdens sexdens* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: formicidae). **Rev. Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 4, p. 553-561, 2005.
- LUNN, G.; SANSONE, E. B. **Destruction of Hazardous Chemicals in the Laboratory**. New York; John Wiley & Sons, p. 501, 1994.
- MA, LI-JUN et al. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. **Nature** n. 464, p. 367-373 , doi:10.1038/nature 08850, 2010.
- MADIGAN, M. T. et al. *Microbiologia de Brock* . 12 ed , Prentice Hall, São Paulo, 2010.
- MAGLIANI, W. et al. Yeast killer systems. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.10, n.3, p. 369-400, 1997.
- MARQUES, S.G. et al. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from the shell of the babassu coconut (*Orbignya phalerata* Martius) in the Amazon region of Maranhão Brazil. **Japanese Journal of Medical Mycology, [S.I.]**, v. 47, p. 305-311, 2006.

MCGINNIS, M. R., ; M. G. RINALDI ; WINN, R. E. Emerging agents of phaeohyphomycosis: pathogenic species of *Bipolaris* and *Exserohilum*. **J. Clin. Microbiol.** v. 24, p. 250-259, 1986.

MOREIRA, L.L. **Avaliação ecotoxicológica preliminar de efluentes contendo brometo de etídeo.** 2010. 34f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.

MUCHOVEJ, J. J.; DELLA LUCIA, T. M. C. *Escovopsis*, a new genus from leaf-cutting ant nests to replace *Phialocladus* nomem invalidum. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 37, p. 191-195, 1990.

MUELLER, U. G.; DASH, D.; RABELING, C.; RODRIGUES, A. Coevolution between attine ants and actinomycete bacteria: a reevaluation. **Evolution**, Lawrence, v. 62, n. 11, p. 2894-2912, 2008.

MUÑOZ, S.I.S. **Impacto ambiental na área do aterro sanitário e incinerador de resíduos sólidos de Ribeirão Preto, SP:** Avaliação dos níveis de metais pesados. 2002. 158f. Tese (Doutorado em Enfermagem em Saúde Pública) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

O'DONNELL, K. et al. Phylogenetic Diversity and Microsphere Array-Based Genotyping of Human Pathogenic *Fusaria*, Including Isolates from the Multistate Contact Lens-Associated U.S. Keratitis Outbreaks of 2005 and 2006. **Journal of clinical microbiology**. p. 2235–2248 Vol. 45, No. 7 0095-1137/07/\$08.00\_0. doi:10.1128/JCM.00533-07, 2007.

OH, D-C; SCOTT, J. J.; POULSEN, M.; CURRIE, C. R.; CLARDY, J. Discovery of new secondary metabolites mediating insect-microorganism symbioses. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 74, n. 9, p. 906–906, 2008.

ONOFRI, S. ; SELBMANN L. ; ZUCCONI, L. ; PAGANO, S. Antarctic microfungi as models for exobiology. **Planetary and Space Science** v. 52 ;p. 229 – 237. Disponível em <doi:10.1016/j.pss.2003.08.019>, 2004. Acessado 04 Out. 2010.

PAGNOCCA, F. C. **Microbiota Associada Aos Ninhos de Formigas Cortadeiras.** In: VI International Pest ant Symposium & XIII Encontro de Mirmecologia, 1997, Ilhéus, Universidade Estadual de Santa Cruz, v. 1. p. 24-26, 1997.

PAGNOCCA, F.C.; RODRIGUES, A.; BACCI JR., M. **Micro-organismos associados às formigas cortadeiras.** In: DELLA-LUCIA, T.M.C. Formigas cortadeiras. Viçosa: UFV Viçosa, 2010. No prelo.

PAGNOCCA, F. C.; RODRIGUES, A.; NAGAMOTO, N. S.; BACCI JR.; M. Yeasts and filamentous fungi carried by gynes of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 94, n. 4, p. 517-526, 2008.

PAGNOCCA, F.C.; CARREIRO, S.C.; BUENO, O.C.; HEBLING, M.J.; DA SILVA, O.A. Microbiological changes in the nests of leaf-cutting ants fed on sesame leaves. **Journal of Applied Entomology**, U.S.A., v.120, p.317-320, 1996.

PATI, P.K. ; SHARMA, M. ; SALAR, R. K. ; SHARMA, A. ; GUPTA, A. P. ; SINGH, B. Studies on leaf spot disease of *Withania somnifera* and its impact on secondary metabolites. **Indian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 432-437, 2008.

PINTO L. S. R. C. ; AZEVEDO J. L. , PEREIRA J. O. ; VIERIRA M. L. C., LABATE C.A. Symptomless infection of banana and maize by endophytic fungi impairs photosynthetic efficiency. **New Phytologist**, v. 147, p. 609–615, 2000.

REVANKAR, S.G. Dematiaceous fungi. **Mycoses**, München, v. 50, n. 2, p. 91-101, 2007.

ROBERTS, J. A. e TREDWAY, L. P. First Report of *Curvularia* Blight of Zoysiagrass Caused by *Curvularia lunata* in the United States. **The American Phytopathological Society**, v. 92, n. 1, 2008.

RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI, M. Jr.; HEBLING, M. J. A.; BUENO, O. C.; PENNING, L. H. Variability of non-mutualistic fungi associated with *Atta sexdens rubropilosa* nests. **Folia Microbiologica**, Praga, v. 50, n. 5, p. 421-425, 2005.

RODRIGUES, A.; BACCI, M. Jr.; MUELLER, U. G.; ORTIZ, A.; PAGNOCCA, F. C. Microfungal weeds in the leafcutter ant symbiosis. **Microbial ecology** v. 56, p. 614-604, 2008.

RIBEIRO, E.L.; SOARES, A.J.; FERREIRA, W.M.; CARDOSO, C.G.; NAVES, P.L.F.; DIAS, S.M.S. Cromoblastomicose: Doença presente na realidade populacional brasileira. **RBAC**, v.38, n.3, p.189-192, 2006.

RINALDI, M. G., PHILLIPS, P., SCHWARTZ, J. G., WINN, R. E., HOLT, G. R., SHAGETS, F. W., ELROD, J., NISHIOKA, G., AND AUFDEMORTE, T. B. **Human Curvularia infections**: Report of Five cases and review of the literature. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 6, p. 27-39, 1987.

SAMPAIO, J. P.; GADANHO, M.; SANTOS, S.; DUARTE, F. L.; PAIS, C.; FONSECA, A.; FELL, J. W. Polyphasic taxonomy of basidiomycetous yeasts genus *Rhodosporidium*: *Rhodosporidium kratochvilovae* and related anamorphic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 51, p. 687-697, 2001.

SATOW, M. M.; ATTILI-ANGELIS, D.; de HOOG, G.S. ; ANGELIS, D.F.; VICENTE, V.A. Selective factors involved in oil flotation isolation of black yeasts from the environment. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 61, p. 157–163, 2008.

SEIFERT, K. A.; SAMSON, R. A.; CHAPELA, I. H. *Escovopsis aspergilloides*, a rediscovered hyphomycete from leaf-cutting ant nests. **Mycologia**, Bronx, v. 87, n. 3, p. 407-413, 1995.

SCHULTZ T. R., MUELLER U. G., CURRIE C. R. , REHNER S. A. Reciprocal illumination: A comparison of agriculture in humans and ants. **Ecological and Evolutionary Advances in Insect-Fungal Associations**, ed. Vega F, Blackwell M . Oxford University Press, New York, p. 149–190, 2005.

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

SIEBER, T.N. **Endophytic fungi in twigs of healthy and diseased Norway spruce and white fir**. Mycological Research, v. 92, p. 322–326, 1989.

SIVANESAN, A. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. **Mycology Pap.** ,v. 158, p. 261, 1987.

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

SPURR Jr H.W ; WELTY R.E. Characterization of endophytic fungi in healthy leaves of *Nicotiana* spp. **Phytopathology** v. 65, p. 417–422, 1975

STACK, R. W. ; SINGLETON, L. L. ; MIHAIL, J. D. ; RUSH, C. M. **Bipolaris: Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi.**. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, p. 94-99, 1992.

STERFLINGER, K.; PRILLINGER, H. Molecular taxonomy and biodiversity of rock fungal communities in a urban environment (Vienna, Austria). **Antonie van Leeuwenhoek, [S.I.]**,. v. 80, p. 275-286, 2001.

TSUDA, M. e UEYAMA, A. Some plant pathogenic fungi and their teleomorphs. **Pleomorphic Fungi: The Diversity and Its Taxonomic Implications**. ed. Sugiyama, J., Elsevier Sci. Publ., Amsterdam, p. 181–199, 1987.

VANDER MEER, R.K. ; CHOI, M.Y. ; ANDERSON, J. Fire Ant Cuticular Hydrocarbons. A research tool and nestmate recognition cues? **Meeting Abstract.International Society of Chemical Ecology**. Paper No. 139, 2008. Disponível em: [http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq\\_no\\_115=227935](http://www.ars.usda.gov/research/publications/publications.htm?seq_no_115=227935). Acesso em 04 Out. 2010.

VALJAVEC-GRATIAN, M. and BRIAN J. STEFFENSON. **Genetics of Virulence in *Cochliobolus sativus* and Resistance in Barley**. The American Phytopathological Society, p. 1140 – 1143, 1997.

VICENTE, V.A. **Isolamento e caracterização de fungos da cromoblastomicose**. 2000. 181f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz deQueirós”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

VICENTE, V.A.; ANGELIS, D.A.; QUEIROZ-TELLES FILHO, F. Isolamento de

fungos herpotriqueláceos do ambiente. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 47-51, jan./mar. 2001.

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

WALSH, T. J., C. GONZALEZ, E. ROILIDES, B. U. MUELLER, N. ALI, L. L. LEWIS, T. O. WHITCOMB, D. J. MARSHALL, AND P. A. PIZZO. Fungemia in children infected with the human immunodeficiency virus: New epidemiologic patterns, emerging pathogens, and improved outcome with antifungal therapy. **Clinical Infectious Diseases**, The University of Chicago Press, v. 20, p. 900-906, 1995.

WEBER, N.A. **The gardening ants. The Attines**. Philadelphia: American Philosophical Society, v. 146, p. 1972.

WHEELER, W. M. **Ants: their structure, development and behavior**. Columbia University Press, USA, pg. 663, 1926.