
ECOLOGIA

ANA PAULA MIRANDA DUARTE

**FUNGOS FITOPATÓGENOS ASSOCIADOS ÀS FORMIGAS
CORTADEIRAS (FORMICIDAE: TRIBO ATTINI)**

A large, abstract geometric pattern in the bottom half of the page, consisting of overlapping light blue and white triangular and polygonal shapes, resembling a stylized globe or a complex network.

Rio Claro
2010

ANA PAULA MIRANDA DUARTE

FUNGOS FITOPATÓGENOS ASSOCIADOS ÀS FORMIGAS
CORTADEIRAS (FORMICIDAE: TRIBO ATTINI)

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” -
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau
de Ecólogo.

Rio Claro
2010

595.796 Duarte, Ana Paula Miranda
D812f Fungos fitopatógenos associados às formigas cortadeiras
(Formicidae:Tribo Attini) / Ana Paula Miranda Duarte. - Rio
Claro : [s.n.], 2010
85 f. : il., figs., gráfs., tabs., mapas

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

1. Formiga. 2. Içás. 3. Ecologia de fungos. 4. Diversidade
de fungos. I. Título.

À minha mãe, avó e tia
Cláudia, Genira e Mariangela
Pelo apoio, carinho e incentivo

Dedico

Agradecimentos

Agradeço meus pais, primeiramente, pelo início de minha vida, por terem deixado muitas coisas de lado por mim. Também pela atenção, educação, apoio e carinho que recebi todos esses anos, especialmente de minha mãe, Cláudia.

Agradeço minha avó-mãe Genira e tia Mariangela, pelos ensinamentos, apoio, incentivo, amor e acolhida, sem os quais esse sonho não se tornaria realidade.

Ao meu irmão, Junior, pela amizade e companheirismo, que me fazem muita falta.

A minha avó Dica, pela ajuda e disposição.

Agradeço minha orientadora e amiga, Profa. Derlene, que cuidou de mim como uma mãe me socorrendo sempre que preciso e me aconselhando. Obrigada pela chance e por ter acreditado no meu potencial.

Ao Prof. Fernando pela 2ª chance que me foi dada, por ter me aceitado em seu laboratório e pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

Agradeço o Prof. Odair por ter me aceitado como orientada no Projeto da FAPESP.

Pela ajuda no laboratório e amizade, agradeço: Prof. Vanderlei, Fábio e Noemi (Equipe Negra), Aline, Paula (minha salvadora), Virgínia, Ife, Tati, Taís, Liu, Castanha, Silvio, Dirce, André, Rodrigo, Sandra e Mara. Agradeço também as secretárias do CEIS, Necis e Lu.

As minhas amigas Bia, Larissa, Joana e Viviane pelos momentos alegres e tristes e por estarem sempre ao meu lado nas horas difíceis. Sentirei uma imensa saudade do Grupo 1.

Ao Danilo, que, apesar do pouco tempo de amizade, esteve sempre disposto a me ajudar.

Ao meu namorado, Ricardo, por todo o amor, carinho, compreensão e atenção que dão sentido à minha vida. Agradeço também sua família, que me acolheu e me auxiliou de todas as formas possíveis.

A todos que não foram citados mas que fizeram parte de minha vida e desta importante etapa.

E agradeço a FAPESP pelo apoio financeiro.



às vezes eu acho que o sinal mais
evidente de que existe vida
inteligente em algum lugar do
universo, é o de que ninguém até
agora tentou entrar em conta-
to conosco.

Resumo

As formigas do gênero *Atta*, popularmente denominadas saúvas, pertencem à tribo *Attini* (ordem Hymenoptera, Família: Formicidae, Subfamília: Myrmicinae) e são comumente conhecidas por “formigas-cortadeiras” por possuírem o hábito de cortar diversas espécies vegetais, utilizadas como substrato para o cultivo do fungo simbionte (Agaricales: Lepiotaceae).

Estudos recentes observaram que, além deste, outros fungos podem ocorrer nos ninhos em um estado dormente ou participar da dinâmica do funcionamento desta simbiose. Pesquisas voltadas ao levantamento da biodiversidade de fungos em ninhos de diferentes espécies de *Atta* encontraram importantes representantes fitopatógenos. No Brasil, estudos sobre manejo integrado de pragas, desenvolvidos pela Embrapa Meio Ambiente, ressaltam a necessidade de maiores investimentos em projetos envolvendo a transmissão de fitopatógenos por insetos, no intuito de reduzir gastos com seu controle e minimizar o impacto ambiental.

O presente trabalho objetivou ampliar o conhecimento sobre a ecologia destes fungos, isolando e identificando espécies associadas às formigas da tribo *Attini*, no intuito de entender a amplitude da dispersão de patógenos e fitopatógenos por estas formigas. Para isso, iças foram coletadas de formigueiros de *Atta laevigata* e *Atta capiguara* localizados no campus da Unesp de Botucatu. Para o isolamento dos fungos foi utilizada a técnica de flotação em óleo mineral. A identificação dos isolados foi feita baseando-se em características microscópicas e moleculares, através do sequenciamento do DNA ribossomal.

Gêneros de maior abundância isolados até o momento foram: *Cladosporium*, *Exophiala*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Phialophora* e *Teratosphaeria*. Representantes dos gêneros *Exophiala*, *Phialophora* e *Cladosporium* podem ser patógenos humanos, enquanto *Teratosphaeria* e *Penicillium* são relacionados a doenças em *Eucalyptus* e frutos cítricos, respectivamente. Os resultados indicam que essas formigas podem albergar importantes espécies fúngicas além das já conhecidas e estudos adicionais são necessários para avaliar a possibilidade das mesmas atuarem na dispersão destes micro-organismos, o que poderia ter importância tanto na fitopatologia como na saúde humana.

Palavras-chave: iças; ecologia de fungos; diversidade de fungos

Abstract

The ants of genus *Atta* belong to the Attine tribe (order Hymenoptera, family Formicidae, subfamily Myrmicinae) and are commonly known as leaf-cutting ants for having the habit of cutting several vegetable species used as substrate for growing mutualistic fungus (Agaricales: Lepiotaceae).

Recent studies showed that, in addition to that, other fungi may occur in the nests in a dormant state or participate in the functioning dynamic of this symbiosis. Researches related to surveys of fungus biodiversity in nests of different *Atta* species have found important phytopathogenic representatives. In Brazil, studies about integrated management of plagues, developed by Embrapa Meio Ambiente (Embrapa Environment), point out the need of higher investments in projects that involve the phytopathogenic transmission by insects in order to reduce costs to control them or minimize environmental impact. The purpose of this study was to broaden the knowledge about the ecology of these fungi, isolating and identifying species associated with Attine tribe ants, thus understanding the scope of pathogenic and phytopathogenic species spread by these ants. For that reason, gynes were collected from *Atta laevigata* and *Atta capiguara* anthills located at Unesp Botucatu (São Paulo, Brazil) campus. In order to isolate the fungus, the mineral oil floating technique was used. The identification of the isolated fungi was done based on microscopic and molecular characteristics using DNA ribosomal sequencing. The most highly abundant genera found so far were: *Cladosporium*, *Exophiala*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Phialophora* and *Teratosphaeria*. Representatives of the genera *Exophiala*, *Phialophora* and *Cladosporium* may be human pathogens, whereas *Teratosphaeria* and *Penicillium* are related to diseases in *Eucalyptus* and citric fruits, respectively. The results show that these ants may host important fungal species besides the ones already known and the fact that additional studies are necessary to evaluate the possibility of the ants spreading these microorganisms, which would be important both for phytopathology and human health.

Keywords: gynes; fungal ecology; fungal biodiversity

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1. Importância do levantamento da microbiota.....	11
2.2. As formigas Attini.....	13
2.2.1. Relação com micro-organismos	15
2.2.2. Forrageamento	17
2.2.3. Importância do controle das formigas Attini	18
2.3. Os fungos	19
2.3.1. Fungos fitopatógenos	21
3. CONTEXTO DO PROJETO.....	23
4. OBJETIVOS	24
5. MATERIAL E MÉTODOS	25
5.1. Meios de cultura	25
5.1.1. Ágar Sabouraud com Cicloheximida e Cloranfenicol (“Mycosel”)	25
5.1.2. Ágar batata dextrose (BDA) (Acumedia Manufactures®)	25
5.1.3. Ágar Czapek extrato de levedura (CYA)	25
5.1.4. Ágar extrato de malte (MEA) (Acumedia Manufactures®)	25
5.1.5. Ágar malte 2% (MA 2%) (Acumedia Manufactures®)	26
5.1.6. Caldo de malte 2% (Acumedia Manufactures®)	26
5.2. Reagentes e soluções.....	26
5.2.1. Solução salina 0,85%	26
5.2.2. Solução de cloranfenicol	26
5.2.3. Solução de estreptomicina.....	26
5.2.4. Solução de penicilina	26
5.2.5. Solução de cicloheximida	27
5.2.6. Czapek concentrado	27
5.2.7. Solução de glicerol 30%	27
5.2.8. Solução de lise	27
5.2.9. Tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 10x (solução estoque)	28
5.2.10. Tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 1x	28

5.2.11. Tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 0,5x	28
5.2.12. Tris-EDTA (TE) (para 1 L de tampão)	28
5.2.13. Gel de agarose 1%	28
5.2.14. Gel de agarose 1,4%.....	29
5.2.15. Marcador de massa molecular.....	29
5.2.16. <i>Primers</i>	29
5.2.17. Tampão de amostra para corridas em gel de agarose – “Loading Buffer”	29
5.2.18. Solução EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) 0,5 M pH 8,0	29
5.2.19. Acetato de sódio 3 M, pH 4,6	30
5.2.20. dNTPS (concentração final: 1,25 mM)	30
5.2.21. 10X Buffer	30
5.2.22. MgCl ₂ (concentração final: 50 mM)	30
5.2.23. Taq polimerase (5U/ µL).....	30
5.2.24. Brometo de etídio	30
5.2.25. Corante lactofenol azul de algodão (COLLINS, 1969)	30
5.3. Local de coleta	31
5.4. Isolamento dos fungos	33
5.5. Identificação e caracterização dos fungos.....	34
5.5.1. Extração de DNA	35
5.5.2. Eletroforese	35
5.5.3. Microsatélites (MSP-PCR).....	36
5.5.4. Amplificação do DNA	37
5.5.5. Purificação do DNA bruto	37
5.5.6. Reação de seqüenciamento	38
5.6. Preservação dos fungos.....	38
5.7. Documentação dos fungos	39
5.8. Descarte de resíduos	39
6. RESULTADOS	41
7. DISCUSSÃO	60
8. CONCLUSÕES	64
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
10. REFERÊNCIAS	66

1. INTRODUÇÃO

A biodiversidade do Brasil é pouco conhecida e explorada, apesar do país abrigar cerca de 20% das espécies do planeta e ser considerado como aquele que apresenta a maior diversidade biológica do mundo (KRIEGER et al., 2009; LACAVA; AZEVEDO, 2008). Em relação a microbiota, sabe-se que há nos diferentes ambientes e ecossistemas brasileiros um grande número de espécies ainda não descritas. Micro-organismos possuem importância ímpar entre os seres vivos, pois estabelecem diversos tipos de interações com plantas, animais e outros, muitas delas pouco compreendidas até o momento. Como exemplo, podemos citar as interações entre fungos e insetos sociais.

A tribo Attini (ordem Hymenoptera, Família: Formicidae, Subfamília: Myrmicinae) compreende aproximadamente mais de 230 espécies de formigas, divididas em 13 gêneros (SCHULTZ; BRADY, 2008). As formigas do gênero *Atta* conhecidas popularmente como saúvas ou “formigas cortadeiras”, possuem o hábito de cortar elevadas quantidades de matéria vegetal (MARICONI, 1970), utilizadas para o cultivo de um fungo mutualista que serve de alimento para as formas larvais e adultas (WEBER, 1972). O micélio, junto com o material vegetal, resulta numa estrutura conhecida como “jardim de fungos”.

Estudos recentes envolvendo a fundação da colônia e a manutenção do fungo simbiote têm revelado complexidade de interação entre as colônias de formigas cortadeiras e a simbiose microbiana (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), ou mesmo fora delas.

Pesquisas voltadas ao levantamento da biodiversidade de microfungos em ninhos de diferentes espécies de *Atta* encontraram importantes representantes fitopatógenos (FISHER et al., 1996; RODRIGUES et al., 2008; ATTILI-ANGELIS, comunicação pessoal).

Os fungos fitopatógenos apresentam uma série de características que favorecem seu papel na natureza. Dentre elas, destaca-se a presença de polímeros pigmentados na parede micelial, conhecidos por melaninas, as quais os protegem do estresse ambiental garantindo sua sobrevivência (HENSON et al., 1999). Além disso, inúmeras são as estratégias de dispersão destes fungos, dentre elas a utilização de vetores como, por exemplo, os insetos.

O controle das formigas cortadeiras tornou-se fundamental em muitos agroecossistemas, estimando-se um consumo nacional de aproximadamente 12.000 toneladas/ano de iscas tóxicas, forma mais comumente utilizada para minimizar efeitos negativos destes insetos. As iscas apresentam componentes como inseticidas, que ocasionam danos ao meio ambiente (BOARETTO; FORTI, 1997).

Estudos a respeito da microbiota relacionada às formigas cortadeiras podem trazer informações sobre os inimigos naturais dessas pragas, o que poderia ser utilizado para o desenvolvimento de técnicas alternativas de controle (RODRIGUES, 2004), reduzindo os prejuízos econômicos em plantações, a poluição ambiental devido aos resíduos produzidos e problemas relacionados à saúde humana.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Importância do levantamento da microbiota

Os micro-organismos vêm evoluindo a aproximadamente 4 bilhões de anos, e há 2 bilhões de anos atrás eram a única forma de vida na Terra (WARD, 1998). A necessidade de adaptação a distintos ambientes e o decorrer de sua história evolutiva fizeram com que os micro-organismos acumulassem grande diversidade genética, maior que organismos eucariontes superiores (WARD, 1998; HUNTER-CEVERA, 1998).

A diversidade química e molecular dos micro-organismos na natureza é impressionante (HUNTER-CEVERA, 1998). Fungos e bactérias são essenciais para a estabilidade dos ecossistemas, atuando em diferentes níveis tróficos, em interações bióticas e abióticas, alterando os constituintes atmosféricos gasosos, sendo também responsáveis pela ciclagem dos compostos químicos, incluindo a degradação de poluentes ambientais (TIEDJE, 1994). Alguns autores sugerem que a principal função dos micro-organismos nos ecossistemas seja fornecer mecanismos de recuperação a mudanças climáticas e ambientais (DI CASTRI; YOUNES, 1990; HAWKSWORTH, 1992).

Apesar de sua grande importância na manutenção da biosfera, estima-se que menos de 10% dos micro-organismos existentes no planeta tenham sido caracterizados (STALEY, 1998). Menos de 5% das espécies existentes de fungos no nosso planeta foram descritas, pois das estimadas 1,5 milhões de espécies (considerada tímida, por alguns taxonomistas), pouco mais de 70.000 encontram-se preservadas em coleções de culturas no mundo todo (THOMPSON et al., 2005).

Os estudos com micro-organismos tiveram início em 1673, com van Leeuwenhoek, mas ganharam impulso somente em 1857, com os estudos de Louis Pasteur. Avanços significativos, no entanto, ocorreram a partir da segunda metade do século 19 (TORTORA et al., 2000). Mesmo assim, em função do paradigma científico que exigia que os organismos fossem estudados *in vitro* (BULL et al., 2000), até pouco tempo atrás, a detecção e identificação da microbiota em amostras ambientais eram realizadas basicamente através de cultivo em meios de cultura (TORSVIK; ØVREÅS, 2002).

Na medicina, os fungos receberam especial atenção desde a descoberta da penicilina sintetizada a partir de metabólitos do fungo *Penicillium notatum* pelo microbiologista escocês Alexander Fleming em 1928 (PELCZAR, 1997). Esteróides e hormônios para crescimento vegetal são também oriundos de metabólitos desses organismos (SILVA; COELHO, 2006).

O estudo da micota brasileira teve início no século XIX, com a iniciativa de botânicos estrangeiros, principalmente europeus, que coletaram muitos basidiomicetos e alguns representantes de outros grupos como hifomicetos e celomicetos (BERKELEY; COOKE, 1877; FIDALGO, 1962, 1968). A partir do início deste século, porém, intensificaram-se os estudos voltados aos fungos de interesse na agricultura, denominados fitopatógenos (BERGAMIN FILHO; KIMATI, 1995).

Vários fatores contribuíram para o estudo tardio da diversidade dos micro-organismos. Pode-se mencionar seu tamanho microscópico; a existência de espécies não cultiváveis em meios artificiais (PACE, 1986); as necessidades especiais de crescimento de alguns grupos; a grande influência dos fatores ambientais, e em muitos casos, a dependência de hospedeiros e/ou substratos específicos para sua sobrevivência e multiplicação (TORSVIK; ØVREÅS, 2002).

As dificuldades encontradas para as classificações dos micro-organismos (HAWKSWORTH, 1991, 1992), as limitações dos próprios pesquisadores e a falta de apoio dos órgãos governamentais (SINGH, 2006), também contribuíram para a formação deficiente de recursos humanos voltados aos estudos de levantamento e identificação da microbiota. A cada ano que passa a situação torna-se mais crítica, pois além de tudo isso os habitats naturais que deveriam abrigar os micro-organismos “não descritos” tem desaparecido rapidamente devido à ação do homem. Como exemplo, menciona-se a destruição de 17 milhões de hectares por ano de florestas tropicais (WWF, 2006).

Apesar das características morfológicas fornecerem a base principal para a atual sistemática de fungos, os marcadores fenotípicos úteis para a taxonomia podem ser escassos em diversas espécies (PEROTTO et al., 1997). Assim, para resolver e melhorar a classificação destes fungos, métodos moleculares têm sido largamente utilizados (THOMPSON et al., 2005).

As metodologias de biologia molecular aplicadas ao estudo do meio ambiente têm contribuído significativamente para um grande avanço do conhecimento sobre a diversidade microbiana (O'DONNELL; GÖRES, 1999; RANJARD et al., 2000). É importante ressaltar que grande parte dos avanços da biotecnologia moderna e agricultura são derivados das descobertas recentes nas áreas de genética, fisiologia e metabolismo de micro-organismos (MANFIO et al., 1998).

A biodiversidade brasileira representa um importante valor econômico-estratégico a ser explorado em várias atividades (CALIXTO, 2003). Os benefícios científicos esperados de

um maior conhecimento sobre a diversidade microbiana são extensos (COWELL, 1997; HUNTER-CEVERA, 1998).

Sabe-se que a melhor compreensão das funções exercidas pelas comunidades microbianas nos ambientes e o conhecimento das suas interações com outros componentes da biodiversidade são de extrema importância (OLIVEIRA et al., 2006). A compreensão do papel dos micro-organismos no meio ambiente fornece subsídios para o desenvolvimento de aplicações biotecnológicas, além de ser fundamental no estabelecimento de políticas de biossegurança, de projetos em agricultura sustentável e de programas de desenvolvimento industrial (CANHOS, 1994).

O sucesso dos processos biotecnológicos está diretamente relacionado com a diversidade microbiana e das moléculas que eles produzem como resultado do metabolismo primário e secundário. Conseqüentemente, o aumento da oferta de compostos químicos para os diferentes setores industriais depende da exploração destes recursos genéticos, sendo muitos os benefícios científicos esperados como resultado desta exploração (OLIVEIRA et al., 2006). Até 2005, a participação de produtos microbianos no mercado global era de 50 a 100 bilhões de dólares anuais (THOMPSON et al., 2005).

A utilização dos recursos microbianos pode ser destacada em diversas atividades de importância sócio-econômica: produção de antibióticos (BACHIEGA et al., 2005), de alimentos (FURLANI; GODOY, 2007), processamento de alimentos (BURITI, 2005), bebidas alcoólicas (ALMEIDA, 2005b), tratamento e/ou remediação de resíduos (SOUZA et al., 2005), e, na agricultura, na fertilização de solos (SILVA FILHO; VIDOR, 2000) e controle biológico de pragas e doenças (KUPPER et al., 2003). Outros benefícios incluem o prognóstico e prevenção de doenças emergentes em seres humanos, animais e plantas e a otimização da capacidade microbiana para a despoluição das águas (OLIVEIRA et al., 2006).

2.2. As formigas Attini

As formigas são especialmente notáveis entre os insetos por sua dominância ecológica como predadoras, catadoras, e indiretamente herbívoras (WILSON; HÖLLDOBLER, 2005). Com mais de 12.000 espécies descritas e muitas outras aguardando designação, as formigas são as mais ricas em espécies de todos os insetos sociais (BOLTON et al. apud WARD, 2007). Ocupam praticamente todos os habitats terrestres importantes, com exceção de tundra e florestas úmidas frias (WARD, 2007). Segundo Fittkau e Klinge (1973), na Amazônia brasileira a biomassa de formigas é aproximadamente quatro vezes maior que a de todos os

vertebrados terrestres juntos (mamíferos, aves, répteis e anfíbios). A notável variedade de comportamentos sociais, habitats de forrageamento e associações com outros organismos, geraram interesse público e científico (WARD, 2007).

As formigas Attini vivem em simbiose obrigatória com fungos basidiomicetos (MUELLER et al., 1998). Essa relação mutualística se originou há aproximadamente 50 milhões de anos (SCHULTZ; BRADY, 2008) e garantiu às formigas maior sucesso no processo de adaptação ao ambiente, grande versatilidade nutricional e alta eficiência na competição com outros herbívoros na colonização de diversos habitats (VASCONCELOS et al., 1990).

As formigas cortadeiras cultivam o fungo simbionte no interior de câmaras subterrâneas, utilizando como substrato fragmentos de folhas e flores frescas, no caso dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, e fezes de animais, carcaças de insetos e material vegetal em decomposição no caso dos demais gêneros (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). O substrato processado pelas operárias compõe o “jardim de fungo”, que compreende o micélio do fungo e o substrato (ANDRADE et al., 2002).

A relação simbiótica entre o fungo e as formigas proporciona benefícios a ambos (SCHULTZ et al., 2005). Devido à ação enzimática. (RICHARD et al., 2005), o fungo degrada os polissacarídeos vegetais do substrato, resultando dessa hidrólise açúcares simples que servirão de alimento para o próprio fungo e para as operárias (SILVA et al., 2003), enquanto que as larvas se alimentam do próprio fungo (CAETANO et al., 2002).

As formigas cortadeiras do gênero *Atta* são consideradas insetos eusociais por apresentarem sobreposição de gerações, divisão de trabalho e cuidado com a prole (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). A organização social caracteriza-se pelo polimorfismo acentuado e divisão das tarefas entre os indivíduos (OLIVEIRA, 2006). A casta das operárias jardineiras é responsável pelo cuidado com a cria e manutenção do jardim de fungo; as operárias generalistas exploram novos recursos alimentares, cortam e transportam o substrato vegetal e escavam os ninhos; os soldados defendem a colônia por apresentarem mandíbula bem desenvolvida e grande tamanho. As formas aladas iças (fêmeas) e bitús (machos) aparecem somente na época de reprodução (DELLA LUCIA et al., 1993; JUSTI et al., 1996).

A fundação de uma nova colônia tem início com a revoada das formas sexuadas. Geralmente após as primeiras chuvas da primavera, todos ou pelo menos uma grande parte das formas sexuadas dos ninhos de uma região, saem dos ninhos para iniciar seu vôo nupcial. Ao saírem da colônia, as iças carregam uma pequena porção do fungo simbionte em sua cavidade bucal (JUSTI et al., 1996). Durante o vôo os machos fecundam as fêmeas que

regressam ao solo, arrancam as asas e começam a buscar um local para a construção de um novo ninho (CAETANO et al., 2002; AUTUORI, 1957). Uma vez escolhido o local, a rainha começa a perfurar com as mandíbulas um canal que culminará em uma pequena câmara, na qual o fragmento do fungo simbiote é regurgitado e depois de cultivado, servirá de alimento para o saúveiro (JUSTI et al., 1996).

2.2.1. Relação com micro-organismos

Formigas são de interesse particular para estudos relacionados com micro-organismos porque desenvolveram numerosas formas de interagir com diferentes espécies, em vários níveis. A evolução desses insetos teve como fator principal o mutualismo com fungos e bactérias, o que representa uma das chaves para o seu enorme sucesso (BOURSAUX-EUDE; GROSS, 2000).

O fungo simbiote é propagado pelas formigas às colônias que serão fundadas (SCHULTZ, 1999), alimentados com folhas cortadas e protegidos de organismos competidores (POWELL; STRADLING, 1986). Em troca, os fungos alimentam as larvas e fornecem enzimas utilizadas para a digestão de fragmentos foliares que servirão de alimento para as formigas adultas (BASS; CHERRETT, 1995, 1996).

Segundo PAGNOCCA et al. (1996) no ninho das formigas cortadeiras o jardim de fungos é dividido em duas partes distintas: 1) a parte mais nova (esponja nova) é constituída de folhas relativamente frescas e do micélio do fungo recém implantado; 2) “esponja velha”, parte basal do jardim de fungo onde se encontra o material vegetal já parcialmente exaurido. Há também o depósito de descartes, onde fragmentos da esponja velha, formigas mortas, gravetos e tudo o que não tenha utilidade é encontrado.

Abril e Bucher (2004) relataram que o fungo mutualista tem natureza biotrófica, i.e. necessita do hospedeiro vivo para completar seu ciclo de vida (DANGL; JONES, 2001), sendo sua nutrição proveniente de solutos citoplasmáticos das folhas cortadas e retirada de nitrogênio inorgânico do solo. Acreditava-se que o fungo possuía hábitos saprofíticos, porém outros estudos demonstraram que ele é capaz de produzir amido e carboidratos simples. Vivendo apenas como sapróbio, seria necessário um volume muito maior de material vegetal, o que geraria enorme quantidade de lixo, visto que o fungo metaboliza de 11 a 27% dos componentes da folha. (SILVA et al., 2006).

As primeiras descrições sobre o mutualismo entre fungos e formigas consideravam os jardins de fungos como culturas puras, nas quais as formigas excluía micro-organismos

parasitas (DINIZ, 2008). Na verdade, apesar de cultivar prioritariamente o fungo simbiote, as formigas não conseguem evitar a presença de outros micro-organismos no ninho. Diversas espécies de bactérias, leveduras e fungos filamentosos podem ocorrer em um estado dormente ou participar da dinâmica do funcionamento desta simbiose (FISHER et al. 1996; RODRIGUES, 2004) ou até mesmo prejudicar a simbiose (CURRIE et al., 1999a; CURRIE, 2001a).

Fisher et al. (1996) determinaram que 70% da microbiota presente no formigueiro de *Atta cephalotes* são formados pelo fungo simbiote, 20% por leveduras e 10% por outros micro-organismos. O estudo de Barbosa (2004) demonstrou que jardins de fungos de *Atta laevigata* podem ser contaminados com diversos fungos filamentosos, dentre eles *Trichoderma* spp. e *Penicillium* spp. Nos trabalhos de Rodrigues et al. (2005, 2008) foi relatada a presença de microfungos nos jardins de *A. sexdens rubropilosa* e de formigas do gênero *Acromyrmex*, pertencentes a gêneros comumente encontrados no solo.

Os fungos do gênero *Escovopsis* (Ascomycota: Hypocreales) são os principais invasores, ocasionando decréscimo no acúmulo de biomassa do jardim, diminuição na produção de pupas, larvas e operárias, levando a um retardo no crescimento da colônia (CURRIE, 2001b). Evidências sugerem que *Escovopsis* é um fungo micoparasita, que se alimenta indiretamente das hifas do fungo simbiote (REYNOLDS; CURRIE, 2004).

Para controlar a infestação de seus ninhos por este patógeno, as formigas apresentam uma segunda simbiose com uma bactéria filamentosa do gênero *Pseudonocardia* (CAFARO; CURRIE, 2005), que produz um antibiótico ativo capaz de inibir o crescimento do parasita *Escovopsis* e estimular o crescimento do fungo simbiote (CURRIE et al, 1999b). Entretanto, esta predição vem sendo questionada por pesquisadores que consideram a associação mais ocasional do que mutualística, já que a atividade antimicrobiana também atua contra uma grande diversidade de outros micro-organismos (KOST et al., 2007; MUELLER et al., 2008; SEN et al., 2009).

Ortiz et al. (1999) avaliaram em seu trabalho o comportamento de descontaminação do jardim de fungo de *Atta cephalotes* pelo fungo *Trichoderma lignorum*. A descontaminação do jardim de fungo não foi realizada por jardineiras, e sim, por operárias que ingeriam o contaminante, ou cortavam parte dos fungos contaminados e em alguns casos, retiravam uma parte não contaminada do fungo para iniciar um novo jardim em outra câmara. Assim, as saúvas possuem alta capacidade de se adaptar às condições ambientais que coloquem em risco a colônia, o que permite respostas rápidas no caso de contaminação do jardim de fungo (RODRIGUES, 2007).

O papel de alguns desses micro-organismos ainda é desconhecido, porém é possível que exerçam nos ninhos funções específicas que resultem na estabilidade dos mesmos. Dentre as possíveis funções que eles podem realizar podemos citar: digestão do substrato vegetal nos jardins de fungos; produção de nutrientes essenciais para as formigas e até mesmo a produção de substâncias que controlem outros micro-organismos indesejáveis à cultura do fungo simbiote (MUELLER et al., 2005), (STOW; BEATTIE, 2008). Existem ainda outras questões interessantes a serem esclarecidas, por exemplo, a das leveduras negras relacionadas ao gênero *Phialophora*, descritas por Little e Currie (2007), os quais sugerem este fungo como um novo simbiote das formigas Attine.

2.2.2. Forrageamento

As formigas cortadeiras são conhecidas pela habilidade em usar uma grande diversidade de espécies vegetais (NORTH et al., 1997) desenvolvida ao longo da evolução como uma forma de responder a uma gama de diferentes inibidores vegetais (SILVA-FILHO; FALCO, 2000), e por isso, estão entre os insetos mais polípagos conhecidos (HOWARD, 1987).

O forrageamento das formigas cortadeiras envolve a seleção, o corte e o transporte do material vegetal para o ninho, sendo efetuado por meio de trilhas físicas bem construídas (WEBER, 1972) e de trilhas marcadas quimicamente com substâncias denominadas feromônios (WILSON, 1962). Existe uma composição química básica para as trilhas de todas as espécies de formigas cortadeiras, sendo a proporção dos componentes na mistura e a presença de componentes minoritários os fatores responsáveis pela especificidade destas trilhas (VILELA apud VILELA, 1994). Tais feromônios também constituem um dos principais meios químicos de comunicação entre as formigas (ASSIS; FERREIRA JUNIOR, 2003).

Estudos em florestas tropicais sugerem que a herbivoria das formigas cortadeiras pode afetar a vegetação, modificando a composição e diversidade das espécies vegetais na comunidade (VASCONCELOS; CHARRETT, 1998; RAO et al, 2001; TERBORGH et al, 2006).

Apesar de serem classificadas como “herbívoros generalistas” (ROCKWOOD, 1977), as formigas cortadeiras fazem uma seleção ativa das plantas atacadas, utilizando apenas parte dos recursos disponíveis (VASCONCELOS, 1997). A seletividade das folhas pode estar relacionada com suas propriedades físicas, tais como: presença e densidade de tricomas

(FALCÃO, 2004), espessura (ZANETTI et al., 2000), dureza (HOWARD, 1987), substâncias atrativas por nectários extra florais (DEL-CLARO; OLIVEIRA, 1993), palatabilidade e qualidade nutricional (FALCÃO, 2004), presença ou ausência de látex (DELLA LUCIA et al., 1995), compostos químicos secundários tóxicos ou repelentes (HEBLING et al., 2000).

Segundo North et al. (1997) o comportamento de forrageio de formigas pode ser controlado pelo fungo simbionte através de mecanismos químicos, que seleciona o substrato. Dessa maneira, o fungo não é prejudicado por plantas que contenham agentes tóxicos antifúngicos (HUBBELL et al., 1984).

O horário de forrageamento de algumas formigas é determinado pelo clima, presença de alimento e disponibilidade de forrageiras em determinado período (DELLA LUCIA et al., 1993). Na espécie *Atta laevigata*, na revoava há decréscimo ou até paralisação do forrageio (AMANTE, 1972; SALZEMANN; JAFFÉ, 1990).

A espécie *A. capiguara* corta preferencialmente monocotiledôneas (FORTI; BOARETTO, 1997), como os capins colônia, favorita, gordura e grama seda (JUSTI et al., 1996). *A. laevigata* corta tanto monocotiledôneas quanto dicotiledôneas (FORTI; BOARETTO, 1997), como algodão, arroz, cana-de-açúcar, mandioca, além de goiabeiras, castanheiras, mangueiras, capins, eucaliptos, florestas naturais (JUSTI et al., 1996).

Durante o corte do substrato vegetal, as formigas cortadeiras podem entrar em contato com plantas infectadas por fungos, havendo uma aquisição de esporos pela cutícula, que serão dispersos por essas formigas.

2.2.3. Importância do controle das formigas Attini

O cultivo do fungo simbionte das formigas Attini requer um substrato vegetal para seu desenvolvimento e para isso as saúvas realizam o corte de folhas, ramos, flores e sementes. A importância do seu estudo deve-se aos prejuízos causados às plantações, ao elevado número de colônias que uma determinada área pode apresentar, à vasta distribuição e ao difícil e oneroso controle, devido à localização dos ninhos sob o solo (MARICONI, 1970; JUSTI et al., 1996). Assim, esses insetos têm sido alvo de diversas pesquisas para o desenvolvimento de metodologias de combate de suas colônias (MARINHO et al., 2006).

Estima-se que as perdas provocadas por pragas e doenças na agricultura mundial, atinjam 37% da produção, sendo 13% por ataques de insetos (SILVA-FILHO; FALCO, 2000). O dano econômico total causado pelas formigas cortadeiras, no continente americano, supera a casa dos 5 bilhões de dólares americanos por ano (CAETANO et al., 2002).

Dentre as espécies mais importantes destacam-se as saúvas (*Atta* spp.) e as quenquéns (*Acromyrmex* spp.), que durante o corte do material vegetal fresco arruinam colheitas, bosques e plantas ornamentais (CAETANO et al., 2002). Quando adulto, um saúveiro pode medir mais de 200 m², com uma população que pode variar de 3 a 6 milhões de formigas (FORTI, 1985). Uma colônia adulta de *Atta laevigata*, por exemplo, é capaz de cortar cerca de 5 kg de material vegetal por dia (CAETANO et al., 2002).

Para minimizar os impactos causados nos agroecossistemas pelas formigas cortadeiras, empregam-se métodos de controle, como: 1) controle mecânico, através da escavação e aração (RODRIGUES, 2004); 2) controle biológico, método não poluente e que não provoca desequilíbrios biológicos, aproveitando o potencial biótico do agroecossistema (ALMEIDA et al., 2003); 3) uso de plantas tóxicas ou atrativas, através de iscas tóxicas (RODRIGUES, 2004); 4) feromônios (VILELA; HOWSE, 1988); e 5) produtos químicos em forma de pó, líquido ou líquidos nebulizáveis, frequentemente utilizados e aplicados diretamente nos ninhos (BOARETTO; FORTI, 1997).

Apesar de prejudiciais à vegetação, quando estão em ambiente equilibrado, as cortadeiras exercem importante papel biológico, realizando o corte natural das plantas e disseminando sementes (DUMPERT, 1981). Também acumulam grandes quantidades de nutrientes em um único lugar, permitindo o crescimento de determinadas plantas que não podem sobreviver em solos pobres, exercendo papel de recicladoras de nutrientes. Segundo Caetano et al. (2002) a espécie *Atta capiguara*, uma formiga que habita pastos com solos pobres, permite com a morte da colônia o aparecimento de espécies e arbustos que colonizam o ninho colapsado, devido a presença de minerais, umidade e material orgânico.

As formigas cortadeiras podem atuar também como agentes dispersores secundários de plantas dispersas por vertebrados, rearranjando a distribuição das sementes e influenciando o sucesso reprodutivo das plantas e a estrutura espacial das populações (KASPARI, 1993).

2.3. Os fungos

Os fungos são heterotróficos, excretam enzimas no substrato colonizado e absorvem os nutrientes através da parede e membrana celular. Assim, além de obterem nutrientes para seu crescimento, também disponibilizam os produtos resultantes da degradação para outros micro-organismos, participando ativamente nos ciclos de carbono, nitrogênio e fósforo (SILVA; COELHO, 2006). São encontrados em diversos ambientes, pois conseguem utilizar uma grande variedade de substratos como fonte de carbono, tornando-os mais competitivos na

degradação de substratos específicos (SILVA; COELHO, 2006; SINGH, 2006). Além do solo, encontram-se nos vegetais, na água e nos animais (COLOMBO, 2007), dentre outros.

Pertencem ao Reino Fungi devido às características intrínsecas, que incluem aspectos morfológicos e fisiológicos, como: células eucarióticas, desprovidas de clorofila e celulose, micélio uni ou pluricelular sem a capacidade de formar tecido, e imóveis na sua maioria (BURNETT, 2003).

As células fúngicas apresentam morfologia variável, mostrando grande diferença em tamanho, estrutura e atividade metabólica, formando diferentes tipos de colônias quando cultivados em meios apropriados, estruturas de frutificação complexas e/ou elaborados mecanismos de propagação e dispersão (CROUS et al., 2009a).

Os fungos se desenvolvem em meios de cultivos especiais, formam colônias que são classificadas em dois tipos principais, leveduriformes e filamentosas. Várias espécies apresentam a capacidade de alternar entre fase micelial e leveduriforme, fenômeno denominado dimorfismo. A fase de levedura geralmente ocorre quando o micro-organismo é um parasita, e a forma filamentosa quando o micro-organismo encontra-se em habitat natural como sapróbio ou em meio de cultura (PELCZAR, 1997). Tais alterações podem ainda ser causadas por variações nos nutrientes, temperatura e/ou aeração (GRIFFIN, 1994).

As leveduras produzem células simples, arredondadas, ovais ou alongadas que se reproduzem quase sempre por brotamento. As colônias de fungos filamentosos podem ser granulares, cotonosas, aveludadas, pulverulentas, membranosas. O conjunto de hifas denomina-se micélio, o qual pode ser visualizado a olho nu, como um emaranhado de fios delgados que pode variar do hialino (incolor) ao colorido, dependendo da espécie. O micélio vegetativo penetra no meio de cultivo, para absorver substâncias nutritivas para o fungo, e produz as estruturas de reprodução típicas para cada grupo de fungos (WENDLAND, 2001).

Outro aspecto é a coloração da parede dos fungos, que é determinada por diferentes pigmentos (BUTLER; DAY, 1998). Muitas micotoxinas também são pigmentadas, como por exemplo, as naftoquinonas de *Penicillium* e *Aspergillus* (RITTER, 2007).

Algumas espécies fúngicas apresentam pigmentação escura em sua parede celular, ocasionada pela presença de melanina (diidroxinaftalenomelanina), sendo assim denominados de fungos escuros ou dematiáceos. A melanização favorece a capacidade fotoprotetora e atua como um fator de virulência (RIBEIRO et al., 2006). Em fungos fitopatogênicos, a melanina pode desempenhar um papel importante na proteção contra os radicais livres de oxigênio, gerados pela planta, como resposta à infecção pelo fungo (HENSON et al., 1999).

Desenvolvem-se preferencialmente à temperatura de 25°C, sendo seu crescimento mais lento que o das bactérias. Assim, recomenda-se o uso de antibióticos nos meios de cultura, dentre os quais cloranfenicol nas concentrações de 50 a 300 mg/L, muito empregado para inibir o desenvolvimento bacteriano. Para minimizar e inibir o crescimento de fungos anemófilos de esporulação intensa deve-se usar cicloheximida (SATOW, 2008).

Através de métodos específicos, os fungos podem ser isolados de seu habitat, das vias de dispersão, dos materiais contaminados e de diversos hospedeiros com micoses (ATTILI et al., 1993). Para a dispersão, os fungos exibem estruturas especializadas, sendo a principal, os esporos e conídios. Os fungos anemófilos tem como via de dispersão o ar atmosférico (MEZZANI et al., 2003), causando alergias no homem e a deterioração de diversos materiais (ATTILI et al., 1993).

Principalmente fungos como os ascomicetos podem também estabelecer associações simbióticas com algas, formando os líquens (SPIELMANN, 2006). Como benefícios, no estado liquenizado, a parede celular da alga se torna mais permeável à perda de carboidratos, fornecendo ao fungo compostos carbônicos ricos em energia. Já a alga é protegida contra a dissecação e a alta intensidade luminosa (HONDA; VILEGAS, 1998). Essa relação entre esses dois simbiossistemas confere aos líquens a capacidade de colonizar ambientes inóspitos (SILVA; COELHO, 2006).

2.3.1. Fungos fitopatógenos

O início da agricultura há mais de 10.000 anos atrás, ocasionou o surgimento de pragas agrícolas como resultado da monocultura que desequilibrou a diversidade microbiana natural do ecossistema (ROSA, 2009). Atualmente, a agricultura moderna busca um aumento da produtividade através da mecanização, irrigação, adubação química e aplicação de pesticidas, aliadas ao melhoramento dos genótipos vegetais (ZILLI et al., 2003).

O controle de doenças na agricultura ainda é altamente dependente do uso de fungicidas, sendo brometo de metila um produto comumente utilizado em fumigação de solos (KIMATI, 1995). Apesar de ser largamente utilizado na agricultura, trata-se de um composto de alto nível de toxicidade, podendo causar danos ao manipulador e ao meio ambiente (SARON, 2000), assim como outros agentes tóxicos empregados (LIMA et al., 2000). Infelizmente, o impacto ambiental causado pela exploração agrícola provocou uma intensa degradação ambiental, com perda de recursos não-renováveis e da biodiversidade (SHIKI, 1997).

Existem cerca de 8.000 espécies de fungos fitopatogênicos (AGRIOS, 1997), habitando o solo e causando grandes perdas em culturas econômicas (BUENO, 2004). Segundo Pozza et al. (1999) 70% das doenças que ocasionam danos agrícolas são causadas por fungos. Nas safras de frutas e vegetais, são responsáveis por cerca de 25% a 50% das perdas (TORTORA et al., 2000). No campo, estes fungos se difundem com facilidade pelo vento, chuvas e transporte por pequenos animais, percorrendo grandes distâncias e colonizando novos ambientes (FERREIRA, 2008).

Ao longo de sua evolução, os fungos desenvolveram estruturas para invadir e explorar o tecido de plantas hospedeiras, como enzimas degradadoras de compostos estruturais protetores da planta e toxinas que inibem o metabolismo celular vegetal. Alguns fatores permitiram o sucesso dos fungos fitopatogênicos: 1) capacidade de se desenvolver em plantas que produzem compostos tóxicos depositados na superfície; 2) penetração através da ativação de genes de defesa; e 3) capacidade de permanecer e explorar o tecido da planta de maneira prolongada, coordenada e proveitosa. Quando parasitada, a planta hospedeira sofre redução de crescimento e outras alterações (PASCHOLATI et al., 2008).

Na presença de nutrientes e ótimas condições de temperatura e umidade, os fungos desenvolvem um crescimento micelial. Sua propagação ocorre através da produção e disseminação de esporos, que colonizarão outros tecidos hospedeiros ou fontes alternativas de alimentos. Além desse, existem outros mecanismos para a manutenção da viabilidade e localização de tecidos-alvo, como espessamento de parede celular e desenvolvimento de estruturas para movimentação (PASCHOLATI et al., 2008).

Patógenos podem sobreviver em estado vegetativo nos tecidos da planta hospedeira. Muitos podem permanecer em estado latente em tecidos vegetais por longos períodos sem o aparecimento de sintomas. Também podem viver saprobiamente como epífitas sem penetrar no hospedeiro, em ambientes com limitações nutricionais (PASCHOLATI et al., 2008). A longevidade de esporos na natureza pode variar de meses para *Puccinia graminis* até anos para *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (LUCAS, 1998). Os inibidores de germinação são substâncias químicas das mais variadas classes, incluindo alguns compostos voláteis (TARIQ; CAMPBELL, 1991).

3. CONTEXTO DO PROJETO

Até o momento, o laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos de Insetos Sociais, ao qual esta pesquisa está vinculada, acumulou 20 anos de experiência em estudos sobre leveduras em formigas. Apesar das pesquisas com fungos filamentosos serem mais recentes, resultados importantes já foram gerados e publicados. Sabe-se que conhecer a micota relacionada aos insetos-praga, como as formigas cortadeiras, pode contribuir para a compreensão de dois aspectos de vasta aplicação: 1) o processo de disseminação de fungos, neste caso os fitopatógenos melanizados, para induzir políticas de manejo no campo que evitem o desenvolvimento de epidemias e não gerem danos ao meio ambiente e à população; e 2) evidenciar espécies fúngicas que possam ter aplicação no controle destas formigas, a fim de minimizar seus danos à agricultura.

4. OBJETIVOS

Dentro do contexto apresentado, o trabalho objetivou:

1. Isolar e identificar fungos melanizados encontrados em içás de *A. capiguara* e *A. laevigata*, coletadas em ninhos de campo localizados na Fazenda Santana, Botucatu, SP;
2. Fomentar o acervo de fungos filamentosos e leveduras do Laboratório de Microbiologia do CEIS, sob responsabilidade do Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca;
3. Fornecer ao banco de dados do acervo informações sobre as estirpes isoladas, enfocando as espécies com potencial fitopatológico e para uma possível exploração em biocontrole de insetos-praga.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Meios de cultura

5.1.1. Ágar Sabouraud com Cicloheximida e Cloranfenicol (“Mycosel”)

Dextrose	20,0 g
Peptona	10,0 g
Ágar	20,0 g
Cicloheximida	500,0 mg
Cloranfenicol	200,0 mg
Estreptomicina	200,0 mg
Água destilada q.s.p.	1000 mL

O meio foi esterilizado em autoclave a 1 atm, 121°C por 15 minutos.

5.1.2. Ágar batata dextrose (BDA) (Acumedia Manufactures®)

Ágar batata dextrose	39,0 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

O meio foi esterilizado em autoclave a 1 atm, 121°C por 15 minutos.

5.1.3. Ágar Czapek extrato de levedura (CYA)

K ₂ HPO ₄	1,0 g
Czapek concentrado (vide item 5.2.6.)	10 mL
Extrato de levedura	5,0 g
Sacarose	30,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

O meio foi esterilizado em autoclave a 1 atm, 121°C por 15 minutos.

5.1.4. Ágar extrato de malte (MEA) (Acumedia Manufactures®)

Ágar Extrato de Malte	61,0 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

O pH do meio foi ajustado para 5,5 e esterilizado em autoclave a 1 atm, 121°C por 15 minutos.

5.1.5. Ágar malte 2% (MA 2%) (Acumedia Manufactures®)

Extrato de Malte	20,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

O meio foi esterilizado em autoclave a 1 atm, 121°C por 15 minutos.

5.1.6. Caldo de malte 2% (Acumedia Manufactures®)

Extrato de Malte	20,0 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

O meio foi esterilizado em autoclave a 1 atm, 121°C por 15 minutos.

5.2. Reagentes e soluções**5.2.1. Solução salina 0,85%**

NaCl	8,5 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

A solução foi autoclavada por 15 minutos a 121°C e 1 atm.

5.2.2. Solução de cloranfenicol

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

A solução foi esterilizada por ultra-filtração em membrana com poros de 0,22 µm de diâmetro e mantida a -20° C.

5.2.3. Solução de estreptomicina

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

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

5.2.4. Solução de penicilina

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

A solução foi esterilizada com membrana de ultrafiltração com poros de 0,45 μm de diâmetro e mantida a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2.5. Solução de cicloheximida

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

A solução foi esterilizada com membrana de ultrafiltração com poros de 0,45 μm de diâmetro e mantida a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2.6. Czapek concentrado

NaNO_3	30,0 g
KCl	5,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	5,0 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,1 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,1 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,05 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

A solução foi autoclavada por 15 minutos a 121°C e 1 atm.

O precipitado de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ pode ser re-suspendido mediante agitação antes de ser utilizada.

5.2.7. Solução de glicerol 30%

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

A solução foi autoclavada por 15 minutos a 121°C e 1 atm.

5.2.8. Solução de lise

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 filtrante e mantida a temperatura ambiente.

5.2.9. Tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 10x (solução estoque)

Tris	108,0 g
Ácido bórico	55,0 g
EDTA	8,3 g
Água ultra pura, qualidade MilliQ®	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.

5.2.10. Tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 1x

TBE 10x (solução estoque)	100 mL
Água ultra pura, qualidade MilliQ®	900 mL

Misturou-se os dois volumes. Não foi necessário esterilizar.

5.2.11. Tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 0,5x

TBE 10x (solução estoque)	50 mL
Água ultra pura, qualidade MilliQ®	950 mL

Misturou-se os dois volumes. Não foi necessário esterilizar.

5.2.12. Tris-EDTA (TE) (para 1 L de tampão)

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 miliq. Autoclavou-se durante 20 minutos.

5.2.13. Gel de agarose 1%

Agarose	1,0 g
TBE 1x	100,0 mL

Pesou-se a agarose que foi adicionada a um Erlenmeyer de 250 mL, juntamente com TBE 1x e a solução foi homogeneizada. Em seguida, a solução foi aquecida até tornar-se completamente límpida. Deixou-se a solução esfriar até atingir a temperatura aproximada de 55°C.

5.2.14. Gel de agarose 1,4%

Agarose	1,4 g
TBE 0,5x	100,0 mL

A agarose foi pesada em um Erlenmeyer de 250 mL, adicionou-se o TBE 0,5x e a solução foi homogeneizada. Em seguida, a solução foi aquecida até tornar-se completamente límpida. Deixou-se a solução esfriar até atingir a temperatura aproximada de 55°C.

5.2.15. Marcador de massa molecular

DNA Ladder 1 kb (LGC[®])

5.2.16. Primers

Para a amplificação do DNA, utilizaram-se os seguintes *primers*:

V9G (5'-TTACgTCCCTgCCCTTTgTA-3') (ATTILI-ANGELIS et al., 1998)

LS266 (5'-gCATTCCCAAACAACgACTC-3') (PRYCE, 2010)

Para a reação de sequenciamento:

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 mantidos a -20°C.

5.2.17. Tampão de amostra para corridas em gel de agarose – “Loading Buffer”

Azul de bromofenol	0,025 g
Sacarose	4,0 g
Água ultra pura, qualidade MilliQ [®]	10 mL

A solução foi misturada e armazenada a 4 °C.

5.2.18. Solução EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) 0,5 M pH 8,0

Na-EDTA (Titriplex III Bio Rad 161- 0729)	186,1 g
Água ultrapura q.s.p.	800 mL

Adicionou-se Na-EDTA a água ultra pura e misturou-se com auxílio de agitador magnético. O pH foi ajustado para 8,0 com NaOH ($\pm$ 20g NaOH em “pellet”) e a solução foi autoclavada.

5.2.19. Acetato de sódio 3 M, pH 4,6

Acetato de sódio ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (Merck 6267)	20,4 g
Água ultra pura q.s.p.	50 mL

Dissolveu-se o acetato de sódio em 50 mL de água ultra pura, ajustou-se o pH para 4,6 e armazenou-se a -20°C .

5.2.20. dNTPS (concentração final: 1,25 mM)

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

5.2.21. 10X Buffer

Tampão do kit Taq-polimerase Brasil - Invitrogen[®] pronto para uso. Aliquotar 125 μL em microtubos de 0,5 mL.

5.2.22. MgCl_2 (concentração final: 50 mM)

Cofator do kit Taq-polimerase Brasil - Invitrogen[®] pronto para uso. Aliquotar 50 μL em microtubos de 0,5 mL.

5.2.23. Taq polimerase (5U/ μL)

Aliquotar 10 μL de Taq-polimerase Brasil - Invitrogen[®] em microtubos de 0,5 mL.

5.2.24. Brometo de etídio

Brometo de etídio	8 μL
Tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 1x	300 mL

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

5.2.25. Corante lactofenol azul de algodão (COLLINS, 1969)

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

5.3. Local de coleta

As coletas foram realizadas durante a revoada, na saída dos olheiros, momentos antes de iniciarem o vôo nupcial, em três ninhos adultos de *Atta capiguara* Gonçalves (1944) (Figura 1) e um ninho adulto de *Atta laevigata* Smith (1858), localizados na Fazenda Santana, Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil (localização no GPS: 22°50.6"S; 48°26.1"W; elevação 798 m) (Figura 2), em novembro 2008 e novembro 2009. Na área são encontradas predominantemente gramíneas *Paspalum* sp.

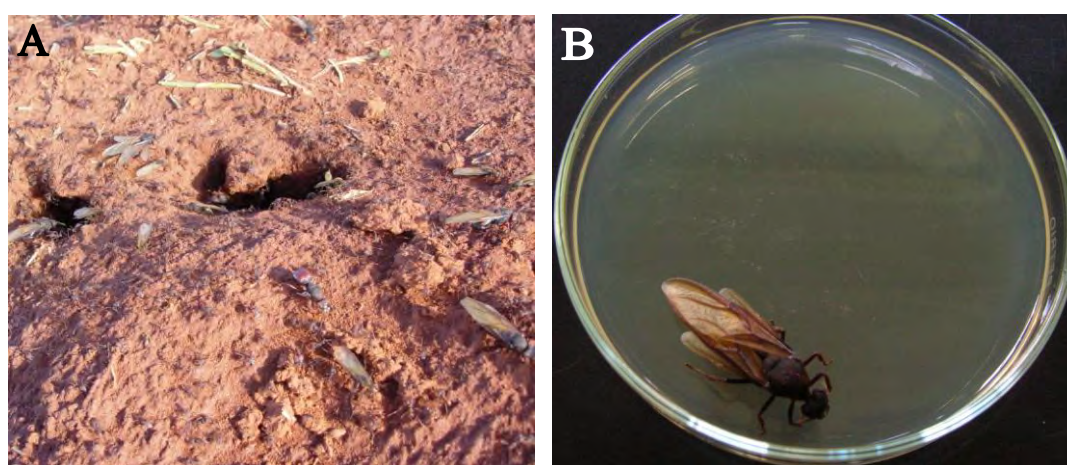


FIGURA 1. A - Içás e bitus saindo dos olheiros antes de iniciarem o vôo nupcial e B – Içá coletada e acondicionada em placa petri para transporte ao laboratório. Imagens cedidas pelo Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca.

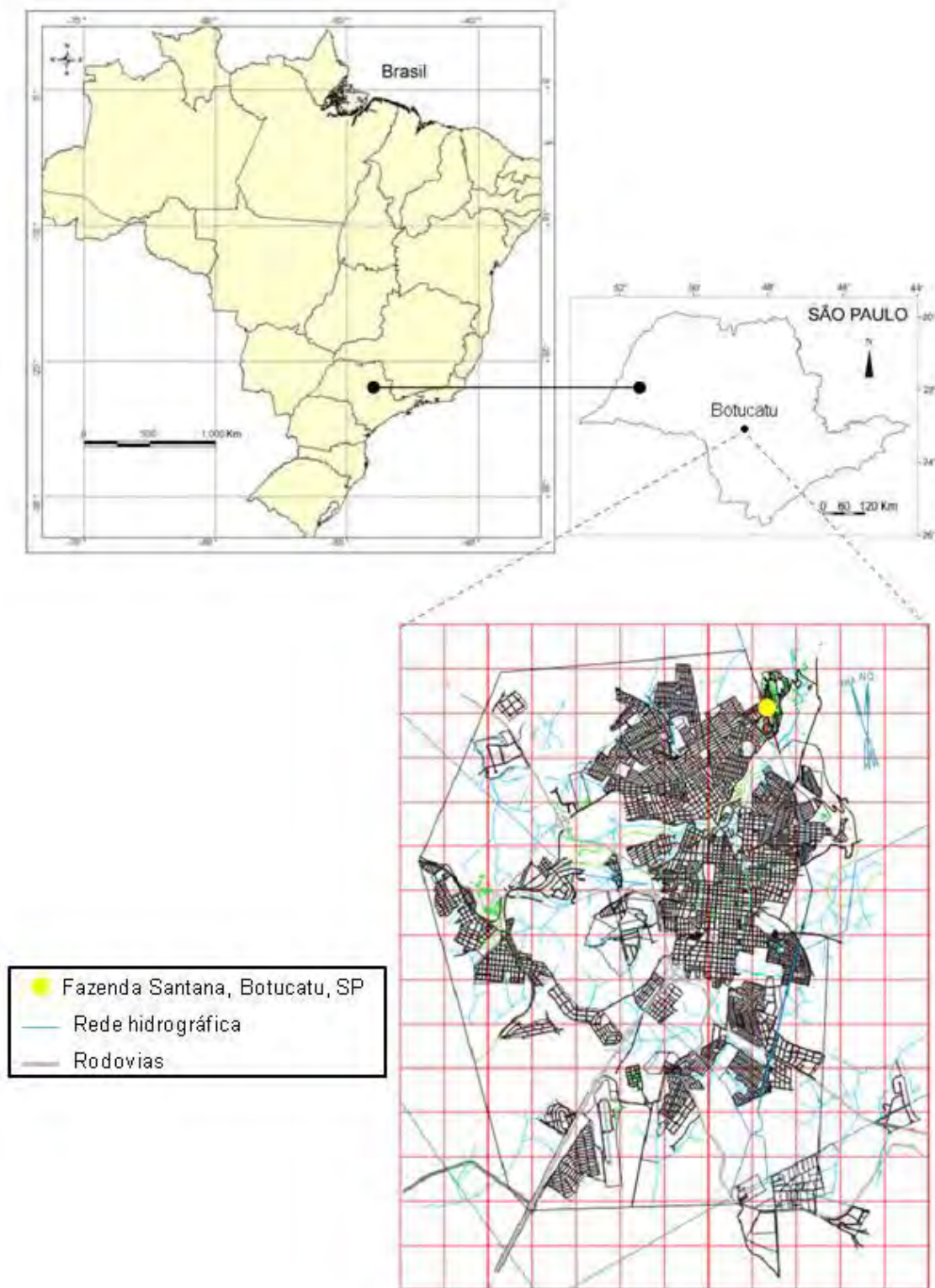


FIGURA 2. Localização da Fazenda Santana, Botucatu, São Paulo, Brasil.

5.4. Isolamento dos fungos

Para o isolamento dos fungos das içás, utilizou-se a técnica de flotação em óleo (SATOW et al., 2008). As formigas foram colocadas em tubos de 50 mL contendo 25 mL de solução salina; 200 U de penicilina; 200 µg/mL de cloranfenicol; 200 µg/mL de estreptomicina e 500 µg/mL de cicloheximida (actidiona). Os tubos foram agitados manualmente e incubados à temperatura ambiente por 30min. Após, adicionou-se a essa solução 5 mL de óleo mineral esterilizado, seguido de uma agitação vigorosa por 5 minutos. Por 20 minutos os tubos foram deixados em repouso. Da interface desta solução foram retiradas alíquotas de 100µL, e semeadas em Agar Mycosel. As placas foram incubadas a 35°C por aproximadamente 45 dias, até o aparecimento de colônias. O isolamento das mesmas foi feito em placas contendo MA 2% e antibióticos (16.570 U/ml de penicilina; 100.000 µg/ml de estreptomicina; 10.000 µg/ml de clorotetraciclina) para garantir a pureza da cultura.

Alguns tubos foram incubados a 25°C por um período de até 45 dias, sendo também realizado um isolamento destes. Uma pequena porção do micélio do fungo foi retirada do tubo e transferida para placas contendo MA 2% e antibióticos (16.570 U/ml de penicilina; 100.000 µg/ml de estreptomicina; 10.000 µg/ml de clorotetraciclina). A Figura 3 ilustra o crescimento fúngico observado.

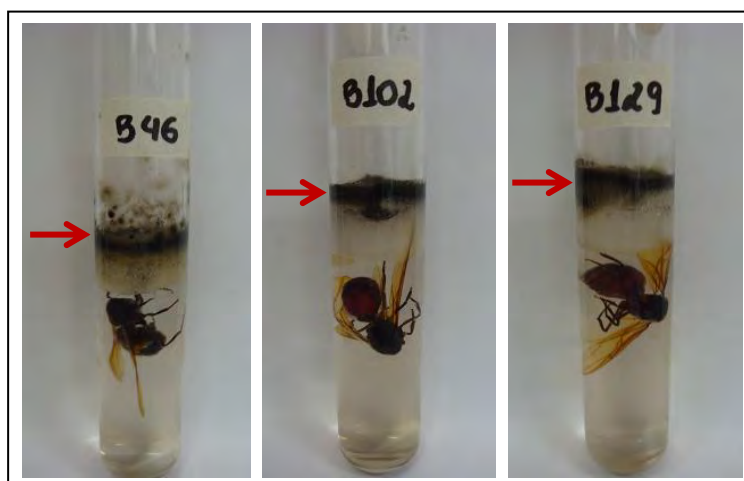


FIGURA 3. Crescimento fúngico em tubo (apontado pela seta vermelha e numerado, onde B significa *body* – corpo), observado pela técnica de flotação em óleo mineral. Incubação à 25°C por 45 dias.

As culturas puras foram armazenadas em tubos de cultura contendo MA 2% inclinado e mantidas a 10°C.

5.5. Identificação e caracterização dos fungos

As culturas foram observadas macro e microscopicamente mediante o uso de estereomicroscópio e preparação de lâminas para microscopia óptica a partir da técnica de microcultivo. Dois pequenos blocos de ágar inoculados foram colocados nas extremidades de uma lâmina esterilizada, cobertos por lamínulas estéreis. Este conjunto foi mantido no interior de uma câmara úmida, constituída de uma placa de Petri com um pedaço de algodão umedecido em água destilada esterilizada, sobre um tubo de vidro em U, conforme a Figura 4 (CROUS et al., 2009a).

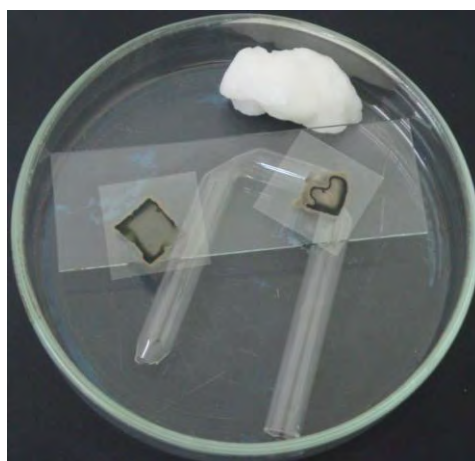


FIGURA 4. Microcultivo em lâmina do fungo do gênero *Cladosporium*.

Sabe-se que os caracteres macromorfológicos da colônia fúngica podem variar conforme o meio de cultivo, dependendo de sua constituição nutricional ou devido a diferentes tempos e temperaturas de incubação. A análise macroscópica dos cultivos visou caracterizar: textura (serosa, cremosa, mucóide, membranosa, pulverulenta, granular, camurça, cotonosa), topografia (plana, convexa, umbilicada, pregueada, cerebriforme), aspecto (brilhante, opaco, seco, úmido), superfície (lisa, fissurada, rugosa), bordas (regulares, irregulares, radiadas), cor da colônia, presença ou ausência de pigmento, tempo de crescimento e diâmetro da colônia.

No caso dos gêneros mais comuns, a caracterização foi realizada baseando-se em chaves e manuais de identificação de acordo com medições de estruturas, coloração e superfície de colônias, e taxa de crescimento.

Para culturas com marcadores fenotípicos insuficientes para uma identificação morfológica, foi realizado o seqüenciamento do DNA ribossômico (rDNA), utilizando-se as técnicas descritas abaixo.

5.5.1. Extração de DNA

O equivalente a 100 μL de micro-esferas de vidro esterilizadas (Sigma[®]) foram adicionadas a microtubos de 1,5 mL contendo 500 μL de solução de lise estéril. Foram adicionadas aproximadamente duas a três alçadas da cultura com até 10 dias de crescimento e agitadas vigorosamente em vortex por 4 minutos, promovendo a quebra das células para liberação do DNA. Em seguida, os tubos foram incubados em banho-maria por 1 hora a 65°C. Repetiu-se os procedimentos de agitação e aquecimento em banho-maria mais duas vezes e, depois disso, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 13.000 rpm. Em seguida, recuperou-se a fase aquosa (aproximadamente 400 μL) em novos tubos estéreis previamente marcados (modificado de Sampaio et al., 2001 e Almeida, 2005a).

5.5.2. Eletroforese

Produtos de extrações, amplificações e purificações foram caracterizados em gel de agarose a 1% em TBE 1x para conferir a qualidade do procedimento. A eletroforese foi realizada em uma cuba horizontal, onde o gel de agarose carregado com 2 μL de cada amostra obtida do DNA bruto misturadas com 2 μL de corante (Loading Buffer) foram submetidos a 100 e 50 mA por 40 minutos. O marcador de peso molecular (ladder) utilizado foi de 1kb. Depois da corrida, o gel foi corado em brometo de etídio 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, que permite que o DNA fique visível quando submetido à luz UV e visualizado através do transiluminador Eletronic MultiwaveTM Transilluminator e fotografado com auxílio do programa Kodak Digital Science ID[®].

5.5.3. Microsatélites (MSP-PCR)

As extrações bem sucedidas foram diluídas na proporção de 1 µL de amostra para 750 µL de água ultrapura estéril, qualidade MilliQ[®] para a realização do procedimento de PCR para microsatélite (MSP-PCR), adaptado de Meyer et al. (1993), no qual foram comparados padrões de bandas para realização de agrupamentos entre as linhagens, bem como para detecção de diferenciações intra-específicas. Os padrões de bandas foram comparados com marcador molecular (Ladder), que possui 1000 pares de bases com pesos conhecidos (Promega[®] Corp.), aplicando-se 5 µL nos poços das extremidades do gel. Para a amplificação por MSP-PCR, foi preparado um mix de reagentes contendo o *primer* GAC, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Reagentes para o MIX de PCR para microsatélite

Reagentes	Quantidade por amostra
dNTPs (1,25 mM cada)	4,0 µL
Buffer 10x (“tampão da Taq”)	2,5 µL
MgCl ₂ (50 mM)	1,0 µL
Primer GAC – (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 vortex e posto em centrífuga por alguns segundos, distribuído em alíquotas de 20 µL em microtubos de 0,2 mL e por fim, adicionado 5 µL do DNA diluído. Essas misturas de reagentes com DNA foram agitadas brevemente em vortex e logo em seguida centrifugadas por alguns segundos. A partir de então, os microtubos das amostras foram colocados em um termociclador para dar início ao programa “MSP-PCR” (1º ciclo: 95°C/ 3 min, 40 ciclos a 93°C/ 45 s, 50°C/ 1 min, 72°/ 1 min e final de 72°C/ 6 min, 10°C ∞). Após a amplificação, as amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,4% preparado com TBE 0,5x), em tampão TBE 0,5x para verificar a qualidade dos produtos formados. Depois da corrida, o gel foi revelado em brometo de etídio, visualizado através do transiluminador Eletronic MultiwaveTM Transilluminator e fotografado com auxílio do programa Kodak Digital Science ID[®]. Quando identificada a semelhança entre as estirpes, uma foi selecionada para seguir as etapas subsequentes de sequenciamento.

5.5.4. Amplificação do DNA

Após a extração foi feita a amplificação da região ITS do DNA ribossômico 26S. Para isso, um mix de reagentes contendo os *primers* V9G e LS266 foi preparado para amplificação do DNA dos fungos (Tabela 2).

Tabela 2. Reagentes para o MIX de PCR para amplificação da região ITS do DNA ribossômico 26S

Reagentes	Quantidade por amostra
Água ultrapura, qualidade Milliq [®] estéril	8,3 µL
<i>Primer</i> V9G (10 pmol)	2,0 µL
<i>Primer</i> LS266 (10 pmol)	2,0 µL
Buffer 10x (“tampão da Taq”)	2,5 µL
MgCl ₂ (50 mM)	1,0 µL
dNTPs (1,25 mM cada)	4,0 µL
Taq polimerase (5U/µL)	0,2 µL

O mix foi distribuído em alíquotas de 20 µL em tubos de 0,2 mL e, em cada tubo, foram adicionados 5 µL de sua respectiva amostra de DNA diluído em água ultrapura, qualidade Milliq[®] estéril na proporção de 1:750. Os tubos foram agitados em vortex por 5 segundos, aproximadamente, seguido de breve centrifugação para serem distribuídos no termociclador e iniciar o programa de amplificação “BLACKIE” (1 ciclo de 94°C/ 2 min seguido de 35 ciclos a 94°C/ 35 s, 52°C/ 30 s, 72°C/ 1 min, 10°C/ ∞). Para verificação dos produtos de amplificação foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% como realizado para verificação da extração.

5.5.5. Purificação do DNA bruto

Depois da verificação da qualidade dos produtos formados na amplificação, as amostras foram purificadas, utilizando-se o kit “Illustra GFX PCR DNA and gel band purification kit”, da GE Healthcare[®]. As amostras puras resultantes foram aplicadas em gel de agarose 1% para eletroforese para nova checagem.

5.5.6. Reação de seqüenciamento

Utilizou-se o kit “DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit”, da GE Healthcare® para a reação de seqüenciamento de 1 µL de cada amostra purificada. Foi empregado o programa “DYEnamic” (25 ciclos de 95°C/20 s, 50°C/ 15 s e 60°C/ 60 s). Após a amplificação, todas as amostras seguiram para a purificação da reação de seqüenciamento, adaptado do manual de instruções do kit “DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit”, GE Healthcare®. A seguir, após secagem, os *pellets* das amostras foram re-suspendidos com 3 µL de formamida (do kit do DYEnamic®), agitadas em vortex, centrifugadas por alguns segundos, colocadas no gelo e abrigadas da luz até serem aplicadas no sequenciador automático 3130 Genetic Analyser – model 627-0040 (Applied Biosystems, Foster City, E.U.A).

As seqüências resultantes foram editadas usando o software BioEdit v.7.0.5.3 (HALL, 1999). Um “blast” foi realizado no banco de dados do National Center for Biotechnology Information – Genbank, a fim de se comparar as seqüências “consensus”.

5.6. Preservação dos fungos

As estirpes foram preservadas em ágar malte 2% inclinado em tubos de cultura mantidos a 10°C e em *ultrafreezer* mediante a técnica de criopreservação a -80°C. Nesta, microtubos de 2 mL e pérolas de vidro (3 mm diâmetro) foram esterilizados em autoclave, a 1 atm, a 121°C, por 15 minutos. Em seguida foram etiquetados em duplicata, sendo dois microtubos para cada linhagem a ser preservada. 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. Após, foi adicionado 300 µL de glicerol 30% e agitado vigorosamente em vortex por 10 segundos e, logo após, foram adicionadas 12-15 pérolas de vidro de 0,2-03 mm de diâmetro até cobrir todo o volume de glicerol. Em seguida, os microtubos foram congelados por 2 horas a -20°C antes de serem transferidos para os *ultrafreezers* a -80°C. As duplicatas foram guardadas em caixas e *freezers* separados, para garantir uma cópia de segurança para cada estirpe (modificado de CBS, 2010).

5.7. Documentação dos fungos

As espécies de fungos isoladas foram foto-documentadas através de uma câmera digital Sony Cyber-shot® DSC-W150 e utilizando-se um fotomicroscópio óptico Leica® DM 1000 com uma câmera Leica® DFC 280 acoplada.

As imagens obtidas, juntamente com as suas respectivas descrições e observações, foram reunidas em uma ficha catalográfica para cada táxon identificado. Na ficha constam: código do isolado, data de coleta, identificação, origem, imagem da colônia, imagem de morfologia celular, medições, informações taxonômicas, descrições macro e microscópicas, sequência de DNA (quando obtida) e referências bibliográficas utilizadas para identificação morfológica mediante uso de chaves.

5.8. Descarte de resíduos

Nas Tabelas 3 e 4 encontram-se listados os resíduos sólidos e líquidos, respectivamente, gerados durante este trabalho e a forma como foram tratados. Assim, foram separados em sólidos e líquidos, sendo os tóxicos e perigosos ao meio ambiente e saúde humana tratados de maneira especial.

Tabela 3. Resíduos sólidos produzidos, efeitos prejudiciais e formas de tratamento

Resíduo	Efeitos prejudiciais	Tratamento
Materiais recicláveis, como papel	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 venda para a Empresa Primos (Apara de Papel)
Materiais não recicláveis, como placas de petri e lâmpadas	Por apresentarem caráter perfuro-cortante apresentam riscos às pessoas que vivem próximas a “lixões”, e possuem tem de decomposição superior a 10 mil anos	Os pedaços foram enrolados em pedaços de papel grosso e acondicionados em tambores
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 em autoclave durante 20 minutos a 121°C, destruindo os micro-organismos através da termocoagulação das proteínas citoplasmáticas
Materiais contaminados com brometo de etídeo, como luvas de nitrila e géis de agarose	Substância intercalante de alta toxicidade e mutagenicidade, causando danos à saúde humana e ao meio ambiente (MOREIRA, 2010)	Separados e etiquetados em sacos plástico azuis e encaminhados à Central de Resíduos da UNESP Rio Claro para posterior incineração

Tabela 4. Resíduos líquidos produzidos, efeitos prejudiciais e formas de tratamento

Resíduo	Efeitos prejudiciais	Tratamento
Resíduos líquidos não-tóxicos, como soluções aquosas	Poluição de rios, alterando a qualidade da água	Lançados diretamente na rede coletora de esgoto, passando por um tratamento na Estação de Tratamento de Esgoto (ETE), reduzindo a concentração de poluentes até o ponto em que não apresentem riscos para a saúde
Antibióticos: cloranfenicol (100g em 1L de álcool), penicilina (10g em 1L de água), estreptomicina (100g em 1L de água), clorotetraciclina (10g em 1L de álcool 70%) e cicloheximida (100g em 1L de acetona)	Se liberados na rede de esgoto, persistem no meio ambiente e não são completamente removidos nas ETEs, podendo causar efeitos adversos na saúde humana e de outros organismos, como peixes (BILA; DEZOTTI, 2003). Cicloheximida é uma substância muito tóxica por inalação, ingestão e em contato com a pele, possuindo caráter cancerígeno	Por possuírem componentes termossensíveis são inativados durante esterilização por calor úmido em autoclave, sendo o resíduo eliminado em água corrente durante lavagem da vidraria (LUNN; SANSONE, 1994)
Solução de brometo de etídeo	Substância intercalante de alta toxicidade e mutagenicidade, causando danos à saúde humana e ao meio ambiente (MOREIRA, 2010)	Armazenadas em galões reforçados, encaminhados à Central de Resíduos da UNESP Rio Claro e posteriormente incinerados

6. RESULTADOS

Nas tabelas 5 e 6 encontram-se os resultados dos isolamentos da 1ª e 2ª coletas, respectivamente. Ao todo, foram obtidas duzentas e quatorze estirpes a maioria proveniente do ninho 2 de *Atta capiguara*. Na 1ª coleta os fungos melanizados foram tão freqüentes nas amostras (56,7%), quanto os fungos hialinos (43,3%); na 2ª coleta os hialinos foram menos freqüentes (35%)(Figura 5).

Tabela 5. Quantidade e origem das iças e dos fungos isolados na primeira coleta (Novembro/2008).

	Número de iças	Número de fungos isolados		Total de fungos isolados
		Negros	Hialinos	
<i>Atta capiguara</i> 1	30	6	17	23
<i>Atta capiguara</i> 2	10	19	9	28
<i>Atta capiguara</i> 3	30	17	29	46
Total	70	42	55	97

Tabela 6. Quantidade e origem das iças e dos fungos isolados na segunda coleta (Novembro/2009).

	Número de iças	Número de fungos isolados		Total de fungos isolados
		Negro	Hialino	
<i>Atta capiguara</i> 1	50	33	13	46
<i>Atta capiguara</i> 2	50	29	11	40
<i>Atta laevigata</i>	50	14	17	31
Total	150	76	41	117

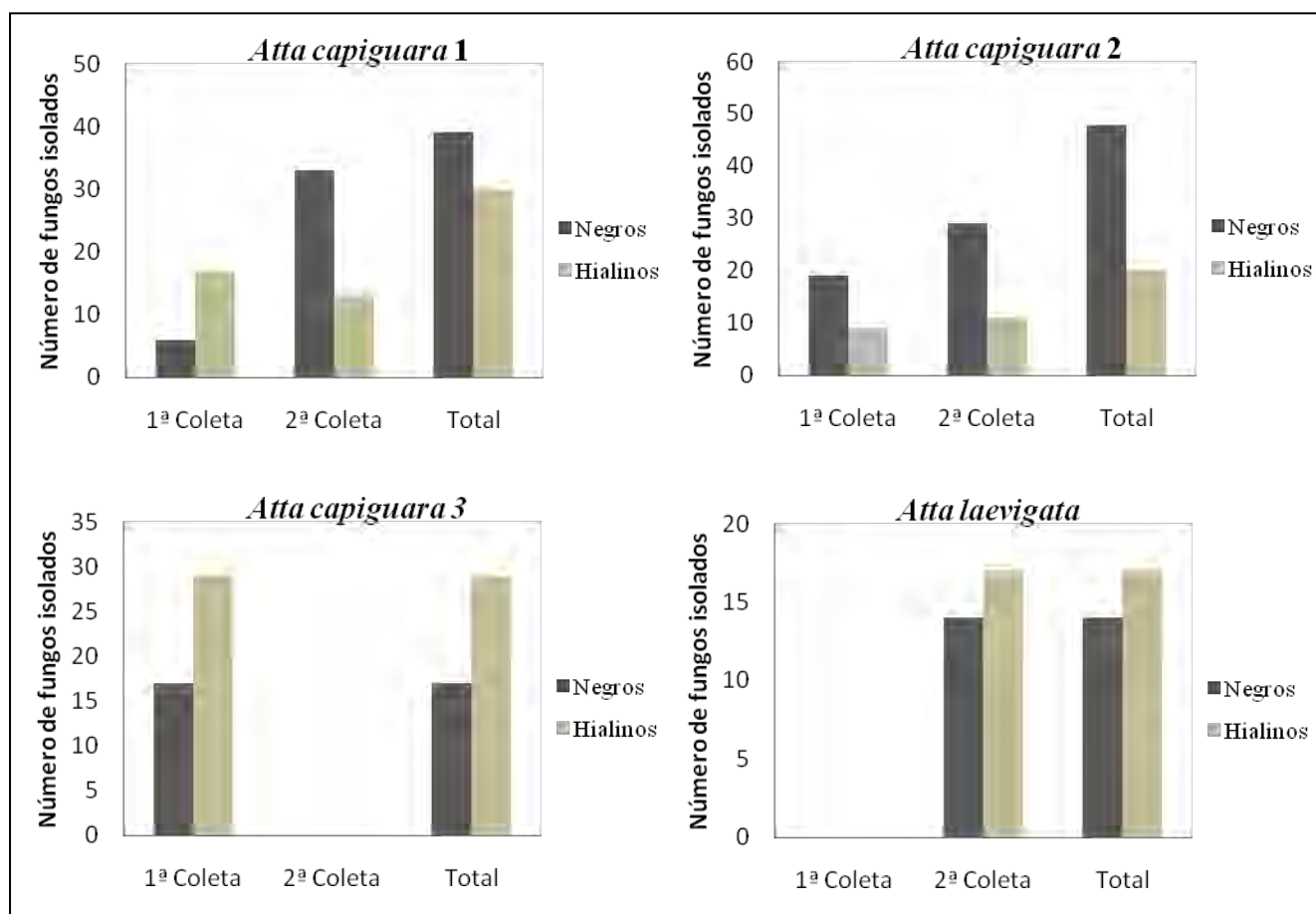


FIGURA 5. Relação de fungos negros e hialinos para cada coleta em ninhos de içás.

Nos ninhos *Atta capiguara 3* e *Atta laevigata* foram realizadas apenas uma coleta cada. Das duzentas e quatorze estirpes obtidas, 81 com aspecto filamentoso foram selecionadas para este trabalho (Tabela 7), e as restantes estão sendo utilizadas em outros projetos.

Tabela 7. Quantidade de fungos utilizados neste trabalho, por ninho e por coleta

	Número de fungos filamentosos				Total
	1ª Coleta		2ª Coleta		
	Negros	Hialinos	Negros	Hialinos	
<i>A. capiguara</i> 1	1	1	22	2	26
<i>A. capiguara</i> 2	17	0	10	4	31
<i>A. capiguara</i> 3	13	0	0	0	13
<i>A. laevigata</i>	0	0	5	6	11
Total	31	1	37	12	81

Observou-se a predominância de gêneros como *Penicillium*, *Cladosporium* e *Cladophialophora* (Tabela 8), sendo a maior diversidade de gêneros encontrada no ninho 1 de *A. capiguara*. Como observado pela sua alta ocorrência em ninhos específicos, essas espécies podem estar encontrando condições adequadas para sobrevivência e propagação.

Tabela 8. Distribuição dos fungos isolados utilizados neste estudo a partir dos corpos de iças coletadas na Fazenda Santana, Botucatu, SP, em novembro/2008 e novembro/2009.

Gênero	Ninho					
	<i>A. capiguara</i> 1		<i>A. capiguara</i> 2		<i>A. capiguara</i> 3	<i>A. laevigata</i>
	1 ^a coleta	2 ^a coleta	1 ^a coleta	2 ^a coleta	(uma coleta)	(uma coleta)
<i>Acremonium</i> sp.						1
<i>Cladophialophora</i> sp.	1		2	1		
<i>Cladosporium</i> sp.		2			4	2
<i>Exophiala</i> sp.		2				
<i>Paecilomyces</i> sp.			1			
<i>Penicillium</i> sp.		1		4		5
<i>Phialophora</i> sp.		1				
<i>Scolecobasidiella</i> sp			1			
<i>Scolecobasidium</i> sp.		1				
<i>Teratosphaeria</i> sp.				2		

Das oitenta e uma estirpes inicialmente isoladas, treze (16%) perderam a viabilidade, possivelmente devido ao estresse sofrido durante o isolamento e em trinta e oito (46,0%) não se observou fase sexuada.

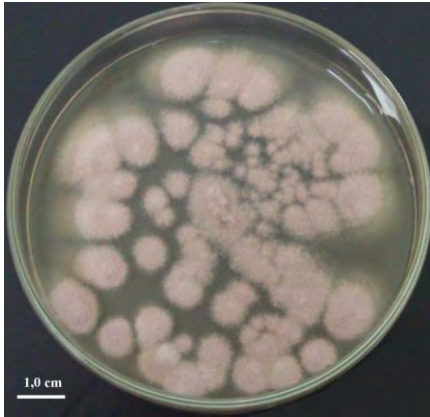
Os dados sobre caracteres macroscópicos, microscópicos e moleculares (quando realizados) sobre os fungos isolados foram organizados em fichas catalográficas cujo modelo foi modificado de Cruz (2010).



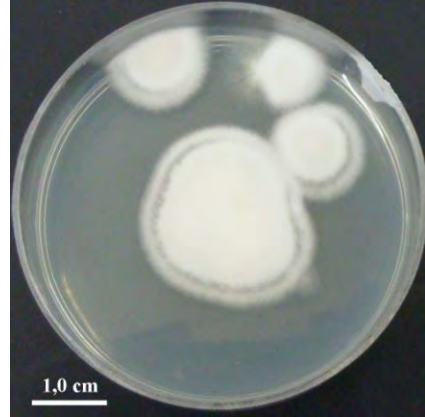
FICHA CATALOGRÁFICA

Paecilomyces sp. Bain. (1907)

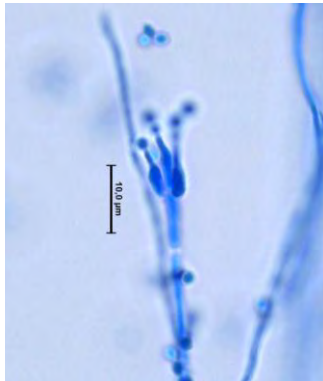
- 1) **Código:** F0076 2) **Data do isolamento:** 19/11/2008
 3) **Substrato de origem:** Corpo de içá – *Atta capiguara* 2
 4) **Foto-caracterização:**



Colônias de *Paecilomyces* sp., com 9 dias de crescimento, em M.A. 2%, a 25°C



Colônias de *Paecilomyces* sp., com 9 dias de crescimento, em PDA, a 25°C



Conidióforo



Conidióforos e conídios

5) Medições:

Conídios: 2,3 a 4,5 µm x 1,1 a 3,4 µm.

Fíalides: 8,0 µm x 3,0 µm.

6) Observações:

Colônias se espalham amplamente pela placa, com coloração róseo em M.A.2% e branca em PDA. As fíalides, de paredes lisas, apresentam formato de garrafa; e os conídios são unicelulares, arredondados, de parede lisa e separados das fíalides em forma de cadeias.

7) Referências bibliográficas:

de HOOG, G.S. et al. **Atlas of Clinical Fungi**. 2nd. ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Universitat Rovira i Virgili, Utrecht/Reus, 2000. 720p.

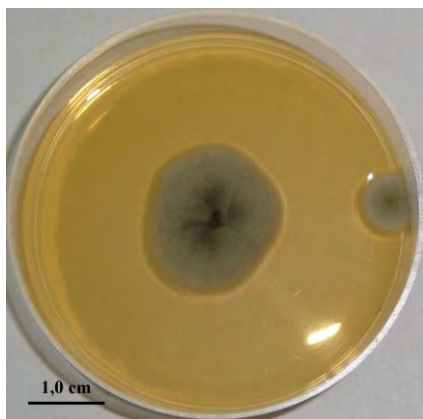
DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press. v. 1. 120p. 1993.



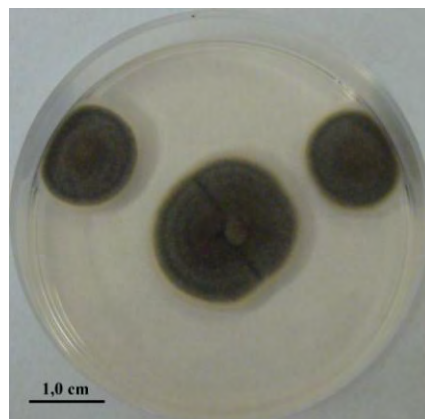
FICHA CATALOGRÁFICA

Cladosporium spp, Link ex Fr. (1821)

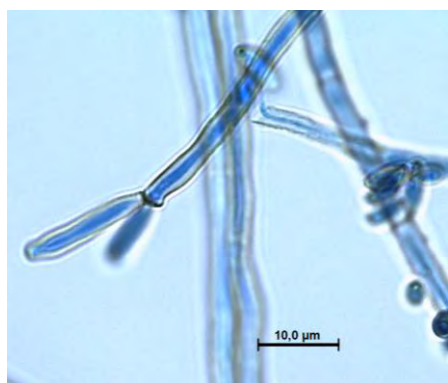
- 1) Código: F0104 2) Data do isolamento: 19/11/2008
 3) Substrato de origem: Corpo de içá – *Atta capiguara* 3
 4) Foto-caracterização:



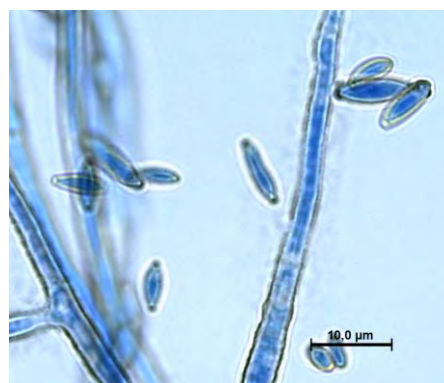
Colônia de *Cladosporium* sp., com 7 dias de crescimento, em M.A. 2%, a 25°C



Colônias de *Cladosporium* sp., com 7 dias de crescimento, em PDA, a 25°C



Ramoconídio e conídios



Ramoconídio e conídios

5) Medições:

Conídios: 4,5 a 6,8 µm x 1,7 a 2,8 µm.

6) Observações:

Colônias possuem crescimento moderado, sendo verde acinzentada em M.A.2% com aspecto pulverulento e verde oliva em PDA com aspecto aveludado, sendo o verso preto. Os conídios são unicelulares, elípticos, de parede lisa e ocorrem em cadeias ramificadas que prontamente desarticulam-se.

7) Referências bibliográficas:

CROUS, P.W. et al. The genus *Cladosporium* and similar dematiaceous hyphomycetes. **Studies in Mycology**. Utrecht, v. 58, 2007, 253p.

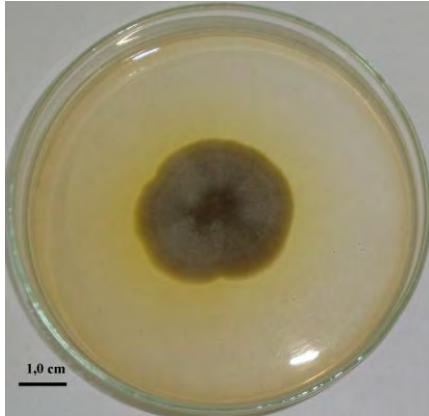
DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press. v. 1. 120p. 1993.



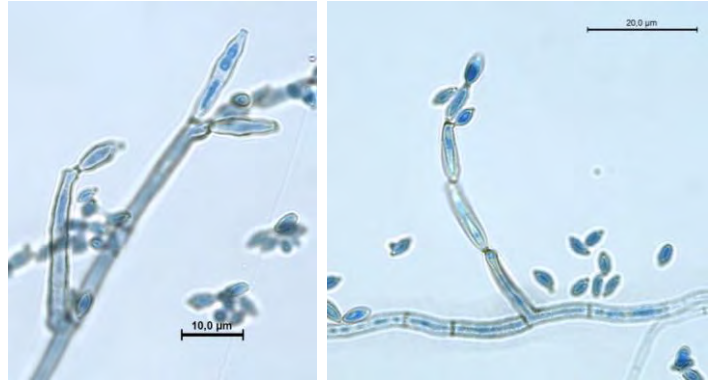
FICHA CATALOGRÁFICA

Cladosporium spp. Link ex Fr. (1821)

- 1) **Código:** F0109 2) **Data do isolamento:** 19/11/2008
 3) **Substrato de origem:** Corpo de içá – *Atta capiguara* 3
 4) **Foto-caracterização:**



Colônia de *Cladosporium* sp., com 9 dias de crescimento, em M.A. 2%, a 25°C



Conidióforos e conídios

5) Medições:

Conídios: 5,7 a 6,8 µm x 1,1 a 3,3 µm.

6) Observações:

Colônias possuem crescimento moderado, sendo verde oliva acinzentada em M.A.2% com aspecto pulverulento e verso preto. Os conídios são unicelulares, elípticos, de parede lisa e ocorrem em cadeias ramificadas que prontamente desarticulam-se. O fungo libera um pigmento amarelo no meio que se difunde na placa com o passar do tempo.

7) Referências bibliográficas:

CROUS, P.W. et al. The genus *Cladosporium* and similar dematiaceous hyphomycetes. **Studies in Mycology**. Utrecht, v. 58, 2007, 253p.

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

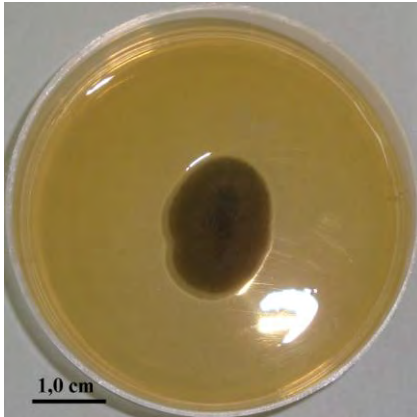
de HOOG, G.S. et al. **Atlas of Clinical Fungi**. 2nd. ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Universitat Rovira i Virgili, Utrecht/Reus, 2000. 720p.



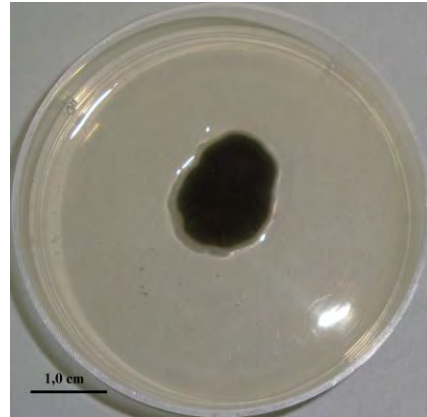
FICHA CATALOGRÁFICA

Cladophialophora spp. Link ex Fr. (1821)

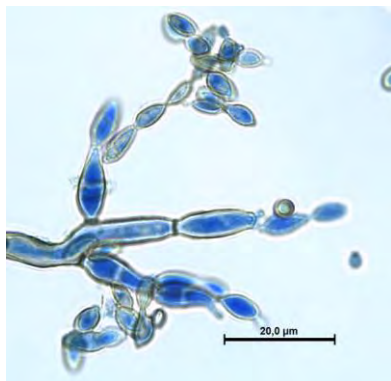
- 1) Código: F0136 2) Data do isolamento: 19/11/2008
 3) Substrato de origem: Corpo de içá – *Atta capiguara* 2
 4) Foto-caracterização:



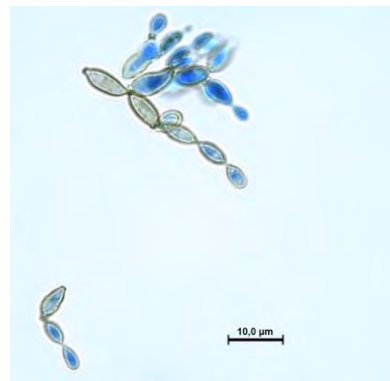
Colônia de *Cladophialophora* sp., com 7 dias de crescimento, em M.A. 2%, a 25°C



Colônia de *Cladophialophora* sp., com 7 dias de crescimento, em PDA, a 25°C



Conidióforo e conídios



Conídios em cadeia

5) Medições:

Conídios: 2,3 a 3,4 µm x 1,7 a 2,3 µm.

6) Observações:

Colônias possuem crescimento moderado, sendo verde oliva acinzentada em M.A.2% com aspecto pulverulento e verde oliva escuro em PDA, com verso preto. Os conídios são elípticos, de parede lisa e ocorrem em cadeias ramificadas.

7) Referências bibliográficas:

BADALI, H. **Biodiversity, pathogenicity and antifungal susceptibility of *Cladophialophora* and relatives.** Universiteit van Amsterdam: Digital Academic Repository. 149p. 2010.

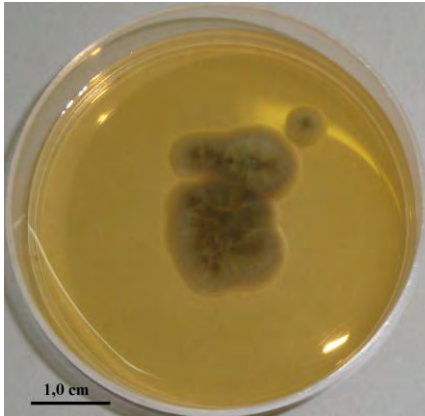
DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. **Compendium of soil fungi.** London: Academic Press. v. 1. 120p. 1993.



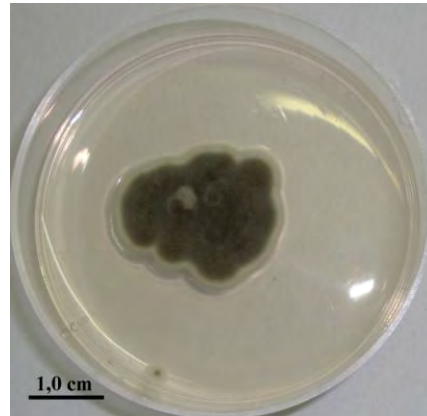
FICHA CATALOGRÁFICA

Cladophialophora spp. Link ex Fr. (1821)

- 1) Código: F0162 2) Data do isolamento: 26/11/2008
 3) Substrato de origem: Corpo de içá – *Atta capiguara* 2
 4) Foto-caracterização:



Colônia de *Cladophialophora* sp., com 4 dias de crescimento, em M.A. 2%, a 25°C



Colônia de *Cladophialophora* sp., com 4 dias de crescimento, em PDA, a 25°C



Conidióforo e conídios



Conidióforo e conídios

5) Medições:

Conídios: 6,8 a 8,0 µm x 1,7 a 2,8 µm.

6) Observações:

Colônias possuem crescimento moderado, sendo verde esbranquiçada em M.A.2% com aspecto pulverulento e verde oliva acinzentado com borda branca em PDA, com verso preto. Os conídios são elípticos, de parede lisa e ocorrem em cadeias ramificadas.

7) Referências bibliográficas:

BADALI, H. **Biodiversity, pathogenicity and antifungal susceptibility of *Cladophialophora* and relatives.** Universiteit van Amsterdam: Digital Academic Repository. 149p. 2010.

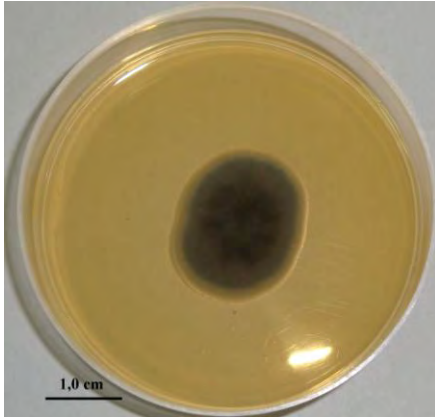
DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. **Compendium of soil fungi.** London: Academic Press. v. 1. 120p. 1993.



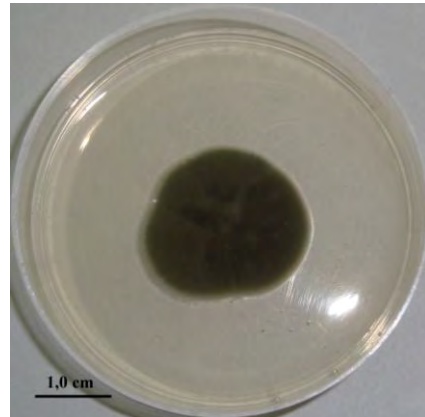
FICHA CATALOGRÁFICA

Cladophialophora spp. Link ex Fr. (1821)

- 1) Código: F0269 2) Data do isolamento: 12/02/2009
 3) Substrato de origem: Corpo de içá – *Atta capiguara* 1
 4) Foto-caracterização:



Colônia de *Cladophialophora* sp., com 7 dias de crescimento, em M.A. 2%, a 25°C



Colônia de *Cladophialophora* sp., com 7 dias de crescimento, em PDA, a 25°C



Conidiogênese



Conidióforo

5) Medições:

Conídios: 4,5 a 8,0 µm x 2,3 a 3,9 µm.

6) Observações:

Colônias possuem crescimento moderado, sendo verde oliva em M.A.2% com aspecto pulverulento e verde oliva escuro em PDA, com verso preto. Os conídios são elípticos, de parede lisa e ocorrem em cadeias ramificadas.

7) Referências bibliográficas:

BADALI, H. **Biodiversity, pathogenicity and antifungal susceptibility of *Cladophialophora* and relatives.** Universiteit van Amsterdam: Digital Academic Repository. 149p. 2010.

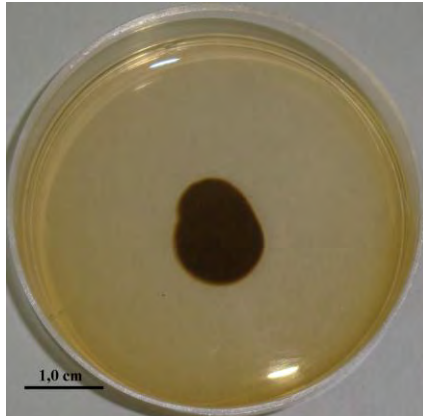
DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. **Compendium of soil fungi.** London: Academic Press. v. 1. 120p. 1993.



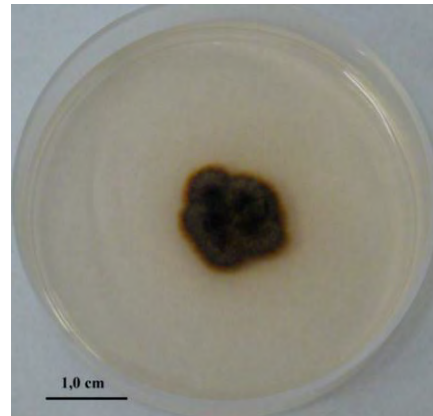
FICHA CATALOGRÁFICA

Scolecobasidiella sp M.B. Ellis (1971)

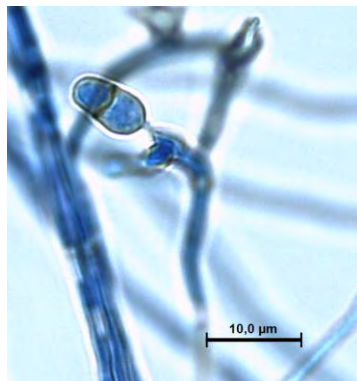
- 1) **Código:** F0171 2) **Data do isolamento:** 26/11/2008
 3) **Substrato de origem:** Corpo de içá – *Atta capiguara* 2
 4) **Foto-caracterização:**



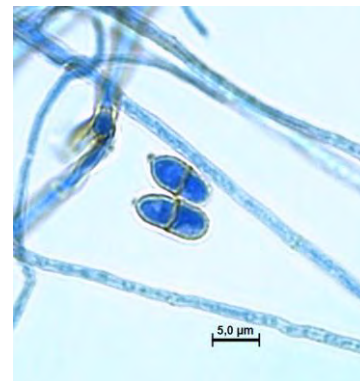
Colônia de *Scolecobasidiella* sp., com 11 dias de crescimento, em M.A. 2%, a 25°C



Colônia de *Scolecobasidiella* sp., com 11 dias de crescimento, em PDA, a 25°C



Conidiogênese



Conídios

5) Medições:

Conídios: 6,7 x 2,8 µm.

6) Observações:

Colônias possuem crescimento lento, sendo verde oliva em M.A.2% com aspecto pulverulento e verde oliva escuro com borda alaranjada em PDA. Os conídios são individuais, septados e elipsoidais.

7) Referências bibliográficas:

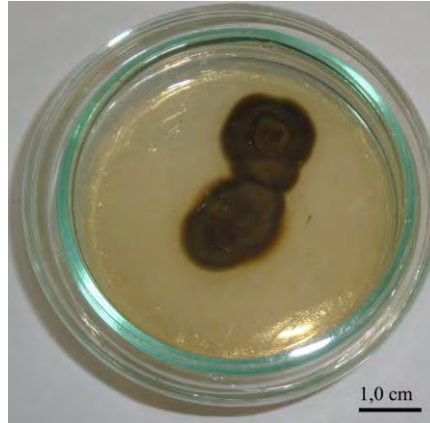
ELLIS, M.B. **More dematiaceous hyphomycetes.** Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 1976; pp. 507



FICHA CATALOGRÁFICA

Scolecobasidium sp Abbott (1927)

- 1) **Código:** F0297 2) **Data do isolamento:** 03/12/2009
 3) **Substrato de origem:** Corpo de içá – *Atta capiguara* 1
 4) **Foto-caracterização:**



Colônia de *Scolecobasidium* sp com 17 dias de crescimento, em M.A. 2%, a 25°C

5) Medições:

Colônias estéreis.

6) Observações:

Consenso – região ITS:

```
ATCATTACTGAGTGGGCTTTTCTTAGGAATTGCAACACCCGATCTGATGTCATTTGATCGTTGGGGT
GAGGTGTGGCTTTTTTGGGACGAACCTGGAATTCGGGTAACCGAGAGCTAGCACGGACCACCAAGTC
AACCTCACAGCCAACACTGATATTTCCGCCGAAGAGGTAGTCATTGAATTGCCCGCCGGCGGCCGT
ATTTACAACCTCTGTTTGAATTGTGAAGTCTGAATACGACAAAAAATGAAAAGCAAACTTTCAACA
ACGGATCTCTTGGCTCTGGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAACGCGAAAGGTAATGCGAATTGCA
GAATCAGTGAGTCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCTCTTGGTATTCCAGGAGGCACGCCTG
TTCGAGCGCCATTACAAACTCCAAGCTTGGCTTGATGATGGGGGATGTTTGAACCTTAGTATCTAAC
ACCTCTGGAACGCGTTGGCGCCGCCGGCGAACCACGAGCGTAGCAAGACGAAAGTCATCGCATCG
TTGGGATCGTCGGACGGTCTGCCTTGTCGATATAACAACCGATATACACTTACCA
```

7) Referências bibliográficas:

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

ELLIS, M.B. **More dematiaceous hyphomycetes**. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 1976; pp. 507



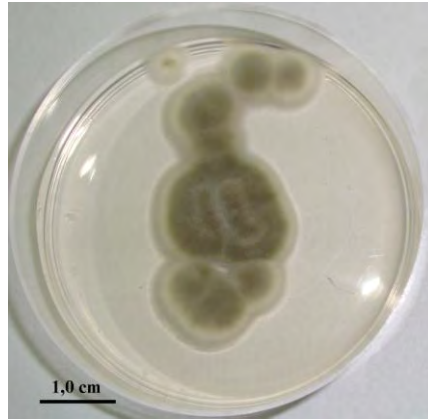
FICHA CATALOGRÁFICA

Cladosporium sp Link ex Fr. (1821)

- 1) Código: F0312 2) Data do isolamento: 03/12/2009
 3) Substrato de origem: Corpo de içá – *Atta laevigata*
 4) Foto-caracterização:



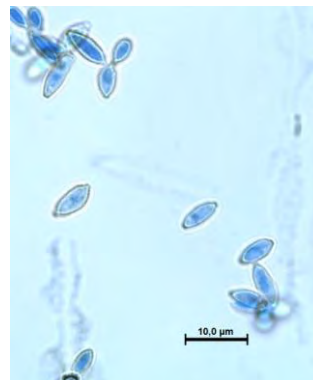
Colônias de *Cladosporium* sp., com 13 dias de crescimento, em M.A. 2%, a 25°C



Colônias de *Cladosporium* sp., com 7 dias de crescimento, em PDA, a 25°C



Ramoconídio



Conídios

5) Medições:

Conídios: 6,2 a 7,9 µm x 2,3 a 2,8 µm.

6) Observações:

Colônias possuem crescimento moderado, sendo verde oliva em M.A.2% com aspecto pulverulento e verde oliva claro em PDA. Os conídios são elípticos, de parede lisa.

7) Referências bibliográficas:

CROUS, P.W. et al. The genus *Cladosporium* and similar dematiaceous hyphomycetes. **Studies in Mycology**. Utrecht, v. 58, 2007, 253p.

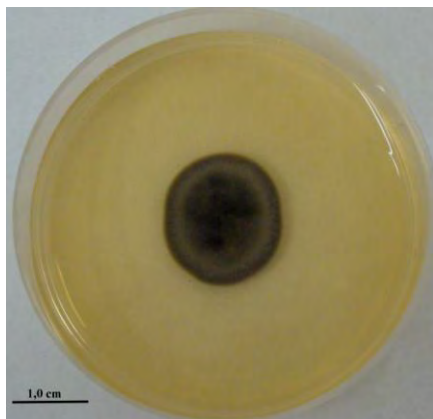
DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press. v. 1. 120p. 1993.



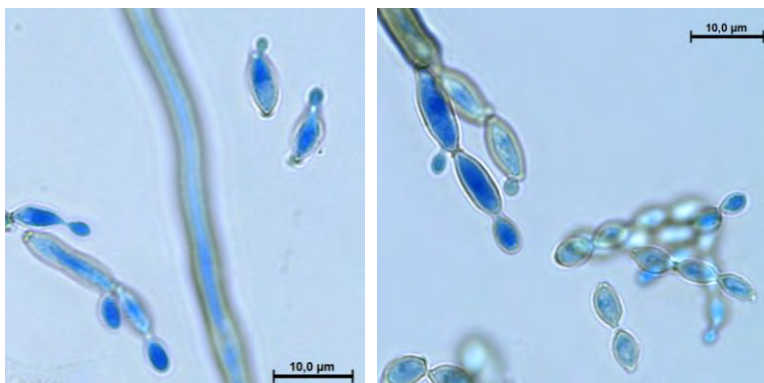
FICHA CATALOGRÁFICA

Exophiala salmonis Carmichael (1966)

- 1) **Código:** F0322 2) **Data do isolamento:** 03/12/2009
 3) **Substrato de origem:** Corpo de içá – *Atta capiguara* 1
 4) **Foto-caracterização:**



Colônia de *Exophiala salmonis*, com 12 dias de crescimento, em M.A. 2%, a 25°C



Conidiogênese e conídios

5) Medições:

Conídios: 8,0 µm x 3,0 a 4,0 µm.

6) Observações:

Colônias possuem crescimento lento sendo verde oliva escuro em M.A.2% com aveludado . A forma leveduriforme é geralmente ausente. Os conídios são elípticos, de parede lisa.

Consenso – região ITS:

```
CCCGATCTCCCACCCTTTGTCTACTTGACCATCGTTGCTTCGGCGAGCCCCGTCCTCATGGACCGCCG
GAGGGCCCTCACGCCCTCTGGCCCGCGCCCGCCGACAGCCCCCTCTTTAAAATCTTAACTAAACGT
GTCTTGAATCTAAGTATTTATTTGTTAAATTAAAAACAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCT
GGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGCGAATTGCAGAATTCCAGTGAGTCAT
CGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCGGAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTATC
ACCCCTCAAGCCCTCGGCTTGGTGTGGACGGTTTGGTGGAGGCCCGGCCCTACCCCTCCCAA
GACAATGACGGCGGCCTCGTTGGACCCCCGGTACACTGAGTTCTTCACGGGACACGTATCGGACAC
ACGGGTTTACGGGACACGGTCTGCCTCCCCCTCAGGGAGAATTTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGG
TAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCT
CAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCTCTTTGGGGTCCGAGTTGT
AATTTGTAGAGGGATGTTTCGGGT
```

7) Referências bibliográficas:

de HOOG, G.S. et al. **Atlas of Clinical Fungi**. 2nd. ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Universitat Rovira i Virgili, Utrecht/Reus, 2000. 720p.

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



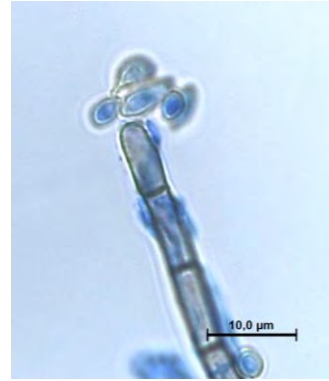
FICHA CATALOGRÁFICA

Phialophora sp. Medlar

- 1) **Código:** F0324 2) **Data do isolamento:** 03/12/2009
 3) **Substrato de origem:** Corpo de içá – *Atta capiguara* 1
 4) **Foto-caracterização:**



Cultura de *Phialophora* sp, com 35 dias de crescimento em M.A. 2%, a 25°C



Conidiogênese e conídios

5) Medições:

Conídios: 3,0 a 4,0 µm x 2,0 a 3,0 µm.

6) Observações:

Colônias possuem crescimento lento, coloração negras e topografia plana em MA2%. Os conídios são elípticos, de parede lisa.

7) Referências bibliográficas:

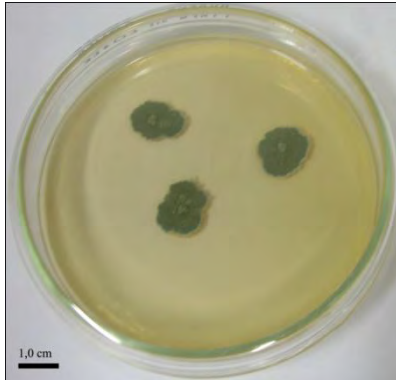
de HOOG, G.S. et al. **Atlas of Clinical Fungi**. 2nd. ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Universitat Rovira i Virgili, Utrecht/Reus, 2000. 720p.



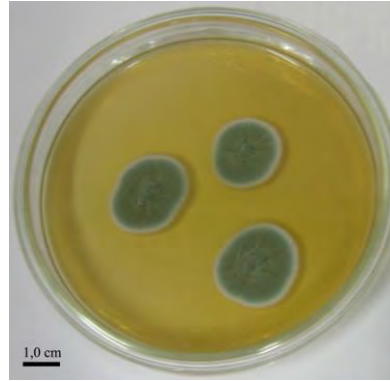
FICHA CATALOGRÁFICA

Penicillium citrinum Thom

- 1) Código: F0332 2) Data do isolamento: 03/12/2009
 3) Substrato de origem: Corpo de içá – *Atta capiguara* 1
 4) Foto-caracterização:



Colônias de *Penicillium citrinum*, com 7 dias de crescimento em MEA, a 25°C



Colônias de *Penicillium citrinum*, com 7 dias de crescimento em CYA, a 25°C



Conidióforo



Conidióforo

7) Medições:

Dimensões das colônias após 7 dias a 25°C: CYA (26mm; 22mm; 28mm), MEA (16mm; 15mm; 16mm).

Conídios: 1,7 a 2,8 µm

Fiálide: 5,6 a 7,9 µm

Métula: 10 a 18 µm

8) Observações: Colônias em tons de verde (CYA: verso amarelo/verde claro, sulcado; MEA: verso amarelo). Conídio globoso e liso, parede do conidióforo lisa; fiálides em formato flask-shaped.

9) Referências bibliográficas:

PITT, J.I. The genus *Penicillium* and its teleomorph states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. London: Academic Press Inc. 1979. 633p.

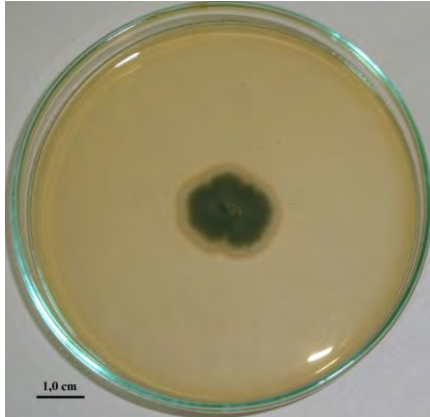
SAMSON, R.A. FRISVAD, J.C. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and extrolites. **Studies in Mycology**. Utrecht, v. 49, 2004. 260p.



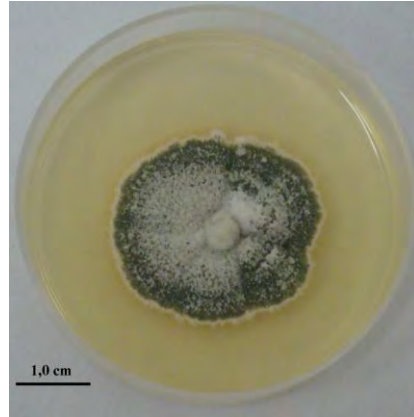
FICHA CATALOGRÁFICA

Acremonium sp Link

- 1) **Código:** F0340 2) **Data do isolamento:** 03/12/2009
 3) **Substrato de origem:** Corpo de içá – *Atta laevigata*
 4) **Foto-caracterização:**



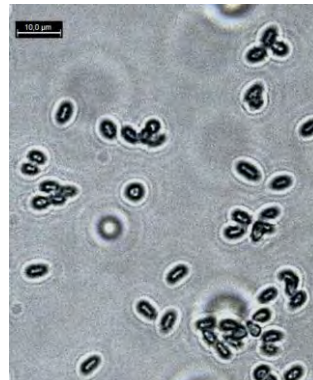
Colônia de *Acremonium* sp., com 12 dias de crescimento, em M.A. 2%, a 25°C



Colônia de *Acremonium* sp., com 16 dias de crescimento, em PDA, a 25°C



Fiálides aciculares



Conídios

5) Medições:

Conídios: 6,2 a 7,9 µm x 2,3 a 2,8 µm.

6) Observações:

Colônias possuem crescimento moderado, sendo verde oliva em M.A.2% com aspecto pulverulento e verde oliva claro em PDA, presença de pigmento amarelo difuso no meio. Os conídios são elípticos, de parede lisa.

7) Referências bibliográficas:

CROUS, P.W. et al. The genus *Cladosporium* and similar dematiaceous hyphomycetes. **Studies in Mycology**. Utrecht, v. 58, 2007, 253p.

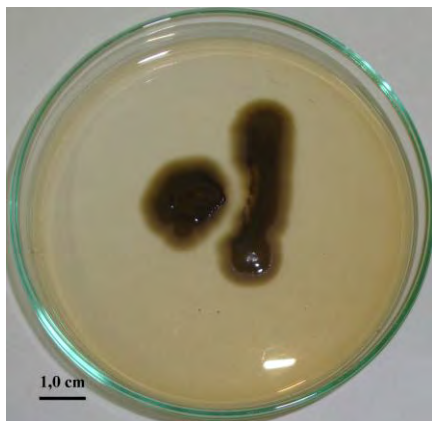
DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press. v. 1. 120p. 1993.



FICHA CATALOGRÁFICA

Exophiala spinifera (Nielsen & Conant) McGinnis

- 1) Código: F0359 2) Data do isolamento: 03/12/2009
 3) Substrato de origem: Corpo de içá – *Atta capiguara* 1
 4) Foto-caracterização:



Cultura de *Exophiala spinifera*, com 9 dias de crescimento, em M.A. 2%, a 25°C



Células com 15 dias de incubação a 25°C

5) Medições:

Células: 2,0 a 6,0 µm x 2,0 a 4,0 µm.

6) Observações:

São leveduriformes e com o tempo tornam-se filamentosas, com coloração olivácea-negra e verso negro. As células são elípticas.

Consenso – região ITS:

ATCATTACCGAGTTAGGGTCCTCATCGGGCCCGACCTCCCAACCCATTGTTTATGATACTCAGTGTT
 GCTTCGGCAGGCCTGGTCTCGACCTGCCGGAGGGCCGTAACACGCCCCCGGAGAGTGCCTGCCGA
 CGGCCCCAACTTCCAAATTCTTTAACTAAACGTGTCTTTGTCTGAGTAAAGTCTTTAATAAAAAGCAA
 AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
 GCGAATTGCAGAATTCTCGTGAGTCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAA
 GGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTTCACCCCTCAAGCCCCGGCTTGGTGTGGACGGTTTGGTCC
 CGGGACGCCCCCTGGACCCCTCCCAAAGACAATGACGGCGGGCTGTTGCACCCCCGGTACACTGAGC
 ATCTTCACGGAGCACGTACCGGTCTCAAGGGTTCGACGGCACCCGGTCTTACCTATATCTTCAAGGT
 GACC

7) Referências bibliográficas:

de HOOG, G.S. et al. **Atlas of Clinical Fungi**. 2nd. ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Universitat Rovira i Virgili, Utrecht/Reus, 2000. 720p.

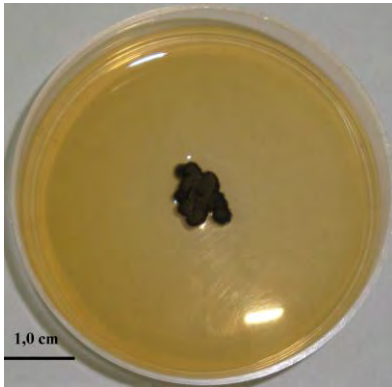
DOMSCH, K. H., GAMS, W., ANDERSON, T.H.. **Compendium of soil fungi**. London: Academic Press. v. 1. 120p. 1993.



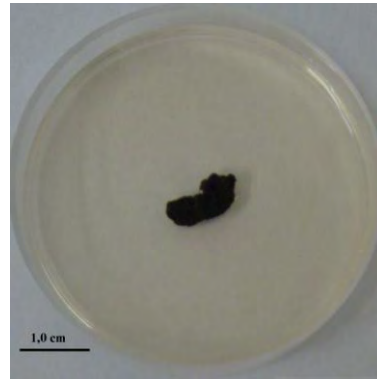
FICHA CATALOGRÁFICA

Terastosphaeria sp Syd. & P. Syd.

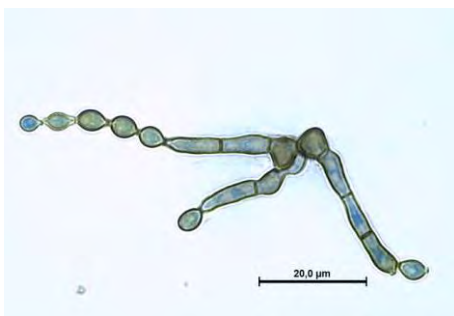
- 1) **Código:** F0386 2) **Data do isolamento:** 10/12/2009
 3) **Substrato de origem:** Corpo de içá – *Atta capiguara* 2
 4) **Foto-caracterização:**



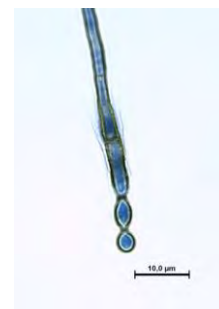
Colônia de *Teratosphaeria* sp., com 11 dias de crescimento, em M.A. 2%, a 25°C



Colônia de *Teratosphaeria* sp., com 11 dias de crescimento, em PDA, a 25°C



Conídios em cadeia



Conidiogênese

5) Medições:

Conídios: 6,8 a 10,0 µm x 1,1 a 2,8 µm.

6) Observações:

Colônias possuem crescimento lendo, sendo verde oliváceas-negras em M.A.2% e PDA. Os conídios são elípticos, de parede lisa, encontrados em cadeias.

Consenso – região ITS:

```
CCCGACCTCCACCCCATGTAAATCATACCATGTTGCCTCGGGGGCGACCCGGCCCTTTTGGGCGTC
GGGGCCCCCGGTGGACCCATAAACACTGCATCTGTGCGTCTGAGTGATTAATCAATCAATTAAAACT
TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA
ATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTCGGTATTCCGGGGGGC
ATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCACCGCGGTCCCGCCGC
GCGCCCTAATGTCTCCGGCTGAGCCGTCTGTTCTCCAGCGTTGTGGTTACATCATCCGCTGCCGGA
CACGATGGTTCATCGCCGTTAAACCCTTTTTTTRTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG
CTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGA
GTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGCAAGCCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGACGCT
TCTGGGCAGCGCCCGGTCTAAGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTATGCG
ACCGGTTGGCACCC
```

7) Referências bibliográficas:

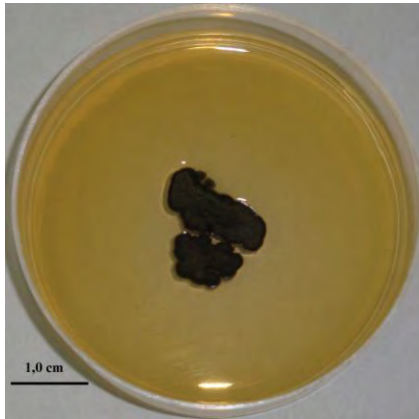
CROUS, P.W. et al. *Mycosphaerella* is polyphyletic. **Studies in Mycology**. Utrecht, v. 58, 2007, p.1-32.



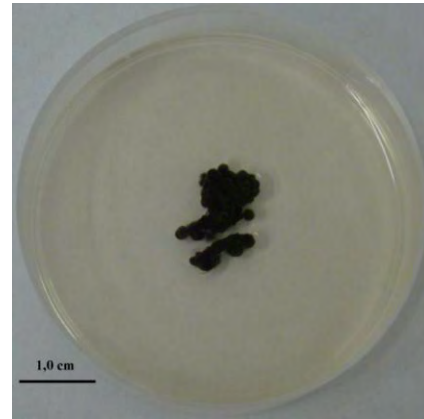
FICHA CATALOGRÁFICA

Teratosphaeria sp Syd. & P. Syd.

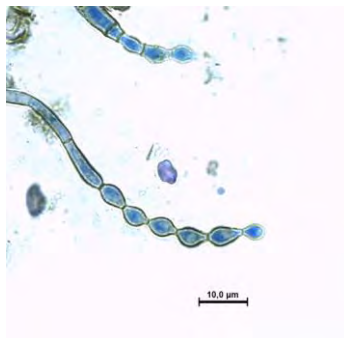
- 1) Código: F0387 2) Data do isolamento: 10/12/2009
 3) Substrato de origem: Corpo de içá – *Atta capiguara* 2
 4) Foto-caracterização:



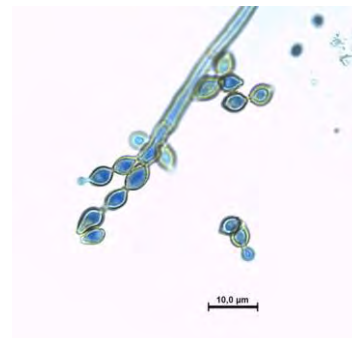
Colônia de *Teratosphaeria* sp., com 11 dias de crescimento, em M.A. 2%, a 25°C



Colônia de *Teratosphaeria* sp., com 11 dias de crescimento, em PDA, a 25°C



Conídios em cadeia



Conidiogênese

5) Medições:

Conídios: 4,3 a 5,0 µm x 3,0 a 4,0 µm.

6) Observações:

Colônias possuem crescimento lendo, sendo verde oliváceas-negras em M.A.2% e PDA. Os conídios são elípticos, de parede lisa, encontrados em cadeias.

Consenso – região ITS:

```
CCCCATGTAAATCATACCATGTTGCCTCGGGGGCGACCCGGCCCTTTTGGGCGTCGGGGCCCCCGG
TGGACCCATAACACTGCATCTGTGCGTCTGAGTGATTAATCAATCAATTAATACTTTCAACAACGG
ATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATT
CAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCG
AGCGTCATTACACCACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCACCGCGGTCCCCGCCGCGCGCCCTAATG
TCTCCGGCTGAGCCGTCTGTTCTCCAGCGTTGTGGTTACATCATCCGCTGCCGGGACACGATGGTTC
ATCGCCGTTAAACCCTTTTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAG
CATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCA
ACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGCAAGCCCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGACGCTTCTGGGCAGCG
GCCGGTCTAAGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTATGCGACCGGTTGGCA
CCCGTCACGTAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGGAATGCAA
```

7) Referências bibliográficas:

CROUS, P.W. et al. *Mycosphaerella* is polyphyletic. **Studies in Mycology**. Utrecht, v. 58, 2007, p.1-32.

7. DISCUSSÃO

Para a caracterização macromorfológica dos fungos isolados utilizaram-se dois meios de cultivos diferentes, sendo M.A.2%, para estimular a esporulação e PDA, para observar o crescimento micelial, especialmente com o intuito de evidenciar a superfície da colônia (ATTILI et al., 1993).

O uso das características morfológicas para a identificação de 46% dos táxons foi dificultada pela ausência de estruturas reprodutivas destes isolados. Em condições de estresse ambiental, onde um menor gasto de energia parece garantir a sobrevivência do fungo, o mesmo pode não esporular (CRUZ, 2010).

Diferentemente de outros trabalhos sobre a interação de microfungos e formigas cortadeiras (RODRIGUES, 2004, 2009), não foi isolado nenhum representante do gênero *Escovopsis* sp., conhecido por ser um parasita específico dos jardins de fungos de Attini (CURRIE et al., 1999b). Pagnocca et al. (2008) também relataram a ausência de desse fungo em iças de *Atta capiguara* e *Atta laevigata*. A presença deste gênero nas Attini derivadas não é muito freqüente (CURRIE et al., 1999a) embora também deva ser ressaltado que neste trabalho a metodologia de isolamento empregada foi seletiva para fungos melanizados em geral, o que garantiu maior biodiversidade dos gêneros de fungos negros isolados comparado ao estudo de Pagnocca et al. (2008), cujo isolamento teve como princípio a caminhada de iças em placas fechadas contendo YMA.

A maioria das espécies encontradas são cosmopolitas, como *Cladosporium* sp. e *Penicillium* sp. e outras menos comuns como *Exophiala* sp., *Scolecobasidium* sp e *Scolecobasidiella* sp. Embora reportado por Rodrigues (2004) como um fungo contaminante dos ninhos de formiga, em nosso estudo *Penicillium citrinum* teve 10 ocorrências, sendo uma no ninho 1 de *A. capiguara*, quatro no ninho 2 de *A. capiguara* e cinco no ninho de *A. laevigata*. Estudando a relação entre microfungos e formigas da espécie *Cirsium wheeleri*, Rodrigues (2009) observou que alguns táxons como *Cladosporium cladosporioides*, *Paecilomyces lilacinus* e espécies de *Penicillium*, ocorreram nos jardins de fungo em todas as estações do ano, sugerindo que esses fungos podem permanecer nas colônias em forma latente. Entretanto, considerando a freqüência com que foi isolado neste trabalho pensamos que o papel biológico desta espécie deva ser melhor investigado pois pode não ser um contaminante ocasional.

Acremonium, *Cladosporium* e *Penicillium* são gêneros muito presentes em amostras de solos e possuem aplicação em biocontrole (Tabela 9), tendo sido encontrados também em

outros estudos envolvendo ninhos de *Atta sexdens* (RODRIGUES, 2004), *Atta laevigata* (BARBOSA, 2004) e em *Atta cephalotes* (ORTIZ et al., 1999). Tais resultados revelaram que é provável que as formigas entrem em contato com esses fungos no momento do forrageamento e, segundo Currie (2002) os mesmos podem ser levados para dentro do ninho através de sua cutícula, sendo dispersos entre as formigas e no próprio ambiente. Essas espécies fúngicas podem contaminar o fungo simbiote, sendo necessárias ações rápidas por parte das formigas operárias para evitar ou remediar o aparecimento dos mesmos (RODRIGUES, 2004).

Little & Currie (2007) fizeram a primeira menção oficial da presença de leveduras negras (Herpotrichiellaceae), do gênero *Phialophora*, em ninhos de *Apterostigma* spp, também encontrado no presente trabalho.

Assim como no presente estudo, Mayer e Voglmayr (2009) relataram a presença de fungos melanizados da ordem Chaetothyriales (como *Cladophialophora* e *Exophiala*), presentes em túneis construídos por formigas *Azteca brevis* (Formicidae). A presença simultânea de várias espécies envolvidas na construção dos túneis sugere uma relação muito generalizada entre *Azteca* e seus fungos simbiotes, diferença marcante entre as formigas cortadeiras dos gêneros *Atta* e *Acromyrmex* que cultivam uma única espécie de fungo.

Os gêneros *Scolecobasidium* e *Scolecobasidiella* são habitantes naturais do solo (DOMSCH et al., 1993; ELLIS, 1976), porém não são cosmopolitas, tendo relatos apenas em solo, substrato vegetal e folhas em contato com o solo (DOMSCH et al., 1993). Existem apenas duas espécies descritas de *Scolecobasidiella*, sendo assim este trabalho poderá possibilitar um melhor entendimento a respeito da fisiologia e ecologia deste fungo.

Exophiala salmonis é uma espécie patogêna de peixes (OTIS; WOLKE, 1985), enquanto *Exophiala spinifera* pode causar sérias infecções em humanos (DE HOOG et al., 2000). A constatação da associação dessas espécies com as formigas pode ser considerada um problema para a sociedade tendo em vista a grande capacidade de adaptação das formigas ao ambiente urbano e de dispersão de micro-organismos (BUENO; CAMPOS-FARINA, 1999).

Cladophialophora constitui um gênero encontrado em solo e materiais em decomposição (DE HOOG et al., 2000), porém em humanos ocasiona lesões sistêmicas e cutâneas que podem ser fatais (DIXON et al., 1989). O isolamento dessas espécies potencialmente patogênicas nesses ninhos e a ocorrência de fato semelhante com outras espécies de Attini basais, como foi o caso do isolamento de *Candida dubliniensis* em ninho de *Myrmicocrypta* por Pagnocca et al., (2010) deve ser melhor investigado pela importância em relação à saúde pública.

Além disso, também foram isoladas espécies fitopatogênicas clássicas ou potencialmente fitopatogênicas, como os gêneros *Teratosphaeria*, particularmente conhecido por causar lesões foliares em *Eucalyptus* sp (CROUS et al., 2009b; HUNTER et al., 2009) e *Penicillium* é um fungo que inclui espécies fitopatogênicas, além das conhecidas produtoras de antibióticos (TAKAHASHI; FERREIRA-LUCAS, 2008). Não sabemos se as formigas cortadeiras podem estar atuando como agentes dispersores de fungos entomopatogênicos, mas o fato de que tais fungos estão no interior de seus ninhos nos permite inferir que os mesmos podem chegar à superfície foliar durante o forrageamento e nesse caso, além dos danos para a agricultura já conhecidos, temos um problema adicional.

Outros estudos são necessários para definir melhor o papel exercido por estes micro-organismos nos ninhos de formigas cortadeiras e o efeito secundário da dispersão de patógenos potenciais no ambiente.

Tabela 9. Importância econômica e aplicações dos táxons isolados.

Táxon	Importância e Aplicação	Referência
<i>Acremonium</i> sp.	Biocontrole de <i>Botrytis cinerea</i> e <i>Penicillium expansum</i> ; interesse médico (patogenicidade); degradação de compostos xenobióticos	JANISIEWCZ, 1988; FINCHER et al., 1991; SILVA; MONTEIRO, 2000
<i>Cladophialophora</i> sp.	Biorremediação de BTEX. Interesse médico (patogenicidade)	PRENAFETA-BOLDÚ, et al., 2002; PATTERSON et al., 1999
<i>Cladosporium</i> sp	Patógena (lesões na pele, sinusites e infecções pulmonares); fitopatogena de <i>Passiflora</i> ; controle biológico de insetos (mosca branca da mandioca - <i>Besimia argentifolii</i>).	SUTTON, 1998; KRUSCHEWSKY et al., 2006; FARIAS; SANTOS FILHO, 1992
<i>Exophiala</i> sp	Espécie patógena responsável por feohifomicose, cromoblastomicose e micetoma.	SUDDUTH et al., 1992; DE HOOG et al., 2000
<i>Paecilomyces</i> sp	Interesse médico; biodeteriogênico.	DE HOOG et al., 2000. SAMSON et al., 2004.
<i>Penicillium citrinum</i>	Produção de mitoxinas e contaminação de frutos cítricos	NORBERG; SERRA-FREIRE, 1993
<i>Phialophora</i> sp.	Interesse médico.	DE HOOG et al., 2000.
<i>Teratosphaeria</i> sp	Fitopatogena de <i>Eucalyptus</i> spp.	HUNTER et al., 2009

Portanto, nos ninhos das formigas Attini ocorrem muitos micro-organismos que podem ser transientes ou participar de funções que os tornem mais frequentes nas colônias. (CURRIE, 2001a,b; RODRIGUES, 2009). Essas associações têm impacto na dispersão e sobrevivência da microbiota associada.

Segundo observações de Bueno et al. (2002), durante a produção de indivíduos alados para a reprodução, há um declínio na biomassa do jardim de fungo, pois a produção de fêmeas adultas e machos exige grandes quantidades de energia. Nessa etapa do ciclo de vida da colônia é possível que alguns micro-organismos, especialmente fungos filamentosos, se proliferem devido ao menor controle das formigas cortadeiras (PAGNOCCA et al., 2008), o que pode explicar porque foram predominantes neste estudo.

Os resultados demonstram que a biodiversidade de fungos encontrados em ninhos de formigas cortadeiras não foi ainda totalmente explorada. Como possuem natureza oportunista nos ninhos de formigas cortadeiras, é possível que alguns desses micro-organismos possam ser empregados como coadjuvantes em métodos de controle desses insetos, o que diminuiria a utilização de produtos químicos tóxicos e prejudiciais ao meio ambiente e saúde. Além disso, a literatura indica alguns isolados como fitopatógenos, o que pode abrir perspectivas para outra área das agrobiociências.

É importante ressaltar que o Brasil é um país de destaque no cenário mundial da produção agrícola, se consolidando como um dos maiores exportadores de soja, açúcar, café, laranja e fumo. Nos últimos 15 anos, a produção agrícola brasileira cresceu numa taxa média de 6% e as expectativas futuras indicam um crescimento igual ou superior (SCOLARI, 2008). Pesquisas que favoreçam o setor agro-industrial brasileiro devem ser encorajadas, assim como a preocupação com a formação de recursos humanos para o desenvolvimento das mesmas.

8. CONCLUSÕES

- O isolamento dos fungos a partir do corpo das iças revelou que o ninho alberga um número muito diversificado de fungos, que podem ser dispersados pelas formas aladas;
- Dentre os isolados filamentosos escolhidos para este estudo, o ninho 1 de *A. capiguara* apresentou maior diversidade de gêneros;
- Os fungos *Cladosporium* sp, *Penicillium citrinum* e *Teratosphaeria* sp, possuem potencial fitopatogênico, e a possível dispersão destes táxons pelas formigas cortadeiras deveria ser objeto de futuros estudos;
- Dos táxons encontrados, *Acremonium* e *Cladosporium* apresentam potencial para biocontrole de insetos;
- Considerando-se que insetos sociais apresentam grande capacidade de adaptação ao ambiente urbano, transportando propágulos fúngicos e atuando como reservatórios de micro-organismos, concluiu-se que a ocorrência de espécies patogênicas como *Exophiala spinifera* e *E. salmonis* no corpo das iças estudadas, pode se tornar um fator preocupante em termos de saúde pública;
- Os resultados são promissores e motivam a continuação destes estudos. Considera-se que a associação dos fungos com as formigas-cortadeiras deve ser melhor compreendida para que novas metodologias de controle desses insetos sejam desenvolvidas.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 2000 (IBGE, 2000), revela que 228.413 toneladas de lixo geradas diariamente no Brasil, 21% tem como destinação lixões a céu aberto ou áreas alagadas, 37% são levadas a aterros controlados, 36% vão para aterros sanitários, 2,8% são utilizadas na compostagem, 0,9% vão para usinas de triagem e 0,5% são incineradas.

Nas instituições de ensino e pesquisa são realizadas atividades que utilizam substâncias consideradas perigosas por apresentarem características como inflamabilidade, corrosividade, reatividade e toxicidade estabelecidas pela NBR 10.004 da Associação Brasileira de Normas Técnicas, e, assim, geram resíduos também considerados perigosos, oferecendo risco potencial aos seres vivos e/ou ao meio ambiente (FONSECA, 2009). Assim, procurou-se durante o desenvolvimento do trabalho descartar corretamente os resíduos gerados.

10. REFERÊNCIAS

ABRIL, A.B.; BUCHER, E.H. Nutritional sources of the fungus cultured by leaf cutting ants. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.26, p.243-247, 2004.

AGRIOS, N. **Plant Pathology**. San Diego: Academic Press, 4ed, 1997.

ALMEIDA, J.M.G.C.F. Yeast community survey in the Tagus estuary. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, n. 53, p. 295-303, 2005a.

ALMEIDA, E.G. de. **Identificação dos microrganismos presentes em bebida fermentada produzida pelos índios Tapirape**. 2005. 74f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais. 2005b.

ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A.; SANTOS, A.S. Avaliação do controle biológico de *Mahanarva fimbriolata* (HOM.,CERCOPIDAE) com o fungo *Metarhizium anisopliae* em variedades de cana-de-açúcar e diferentes épocas de corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.70, n.1, p.101-103, 2003.

AMANTE, E. Preliminary observations on the swarming behavior of the leaf-cutting ant, *Atta capiguara* (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of the Georgia Entomological Society**, Athens, v.7, p.82-83, 1972.

ANDRADE, A. P. P.; FORTI, L. C.; MOREIRA A. A.; BOARETTO, M. A. C.; RAMOS, V. M.; MATOS, C. A. O. Behavior of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers during the preparation of the leaf substrate for symbiont fungus culture. **Sociobiology**, Chico, v.40, n.2, p.293-306, 2002.

ASSIS, R.; FERREIRA, W.C.Jr. Um Modelo Computacional de Recrutamento em Formigas. **Biomatemática III**, p. 21-31, 2003.

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.

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.

AUTUORI, M. A saúva e seu combate. **Anhembi**, v.25, n.74, p.3-20, 1957.

BACHIEGA, G.L.; VILEGAS, W.; UJIKAWA, K. Antibiótico antifúngico produzido por um estreptomiceto da região de Araraquara. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, SP, v. 26, n. 1, p. 29-37, 2005.

BARBOSA, V. S. **Efeito da fragmentação florestal na taxa de parasitismo de fungos associados ao jardim da formiga cortadeira *Atta laevigata***. 2004. 68 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

BASS, M.; CHERRETT, J.M. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **Physiological Entomology**, London, v.20, n.1, p 1-6, 1995.

BASS, M.; CHERRETT, J.M. Leaf-cutting ants (Formicidae, Attini) prune their fungus to increase and direct its productivity. **Functional Ecology**, British, p.10, n.1, p 55-61, 1996.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. História da Fitopatologia. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres. 3ed., v.1, p. 2-12, 1995.

BERKELEY, M.J.; COOKE, M.C. The fungi of Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v.15, p. 363-398, 1877.

BILA, D.M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, São Paulo, v.26, n.4, 2003.

BOARETTO, M.A.C.; FORTI, L.C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. **Série Técnica IPEF**, Piracicaba, SP, v.11, n.30, p.31-46, 1997.

BOLTON, B.; ALPERT, G.; WARD, P.S.; NASRECKI, P. **Bolton's Catalogue of ants of the world**. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, CD-ROM. 2006.

BOURSAUX-EUDE, C.; GROSS, R. New insights into symbiotic associations between ants and bacteria. **Research in Microbiology**, Paris, v. 151, p. 513-519, 2000.

BUENO, C.J. **Produção e preservação de estruturas de resistência de fungos fitopatogênicos habitantes do solo**. 2004. 116f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2004.

BUENO, O.C.; CAMPOS-FARINA, A.E.C. Formigas Urbanas: estratégias de controle. **Vetores & Pragas**, Rio de Janeiro, RJ, v.2, p.5-7, 1999.

BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; SCHNEIDER, M. O.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI, M. Jr. Occurrence of winged forms of *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae) in laboratory colonies. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 469-473, 2002.

BULL, A.T.; ,WARDAND, A.C.; GOODFELLOW, M. Search and Discovery Strategies for Biotechnology: the Paradigm Shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.64, n.3, p. 573-606, 2000.

BURITI, F.C.A. **Desenvolvimento de queijo fresco cremoso simbiótico**. 2005. 86f. Tese (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2005.

BURNETT, J. **Fungal populations & species**. Oxford University Press, Oxford, USA, 348pp. 2003.

BUTLER, M. J.; DAY, A. W. Fungal melanins: a review. **Canadian Journal of Microbiology**, Canada, v.44, p.1115-1136, 1998.

CAETANO, F.H.; JAFFÉ, K.; ZARA, F.J. **Formigas: biologia e anatomia**. Rio Claro: F.H.C., 42p. 2002.

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

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.55, n.3, p.37-39, 2003.

CANHOS, V.P. Views of a developing country. In: KIRSOP, B.; HAWKSWORTH, D.L. (Eds.). The biodiversity of microorganisms and the role of microbial resource centers. **World Federation for Culture Collections**, Japan, p. 45-52, 1994.

CBS – CENTRAALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES. **CBS yeast collections**. Disponível em: <<http://www.cbs.knaw.nl/yeast/Defaultpage.aspx>>. Acesso em: 07 set. 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.

COLLINS, C.H. **Métodos microbiológicos**. Zaragoza: Acribia, 410p. 1969.

COLOMBO, A. L. Diagnóstico de Doenças Fúngicas Oportunisticas: o grande desafio para os centros médicos de atendimento terciário. **Prática Hospitalar**, São Paulo, Ano IX, n. 52, p.50-55, 2007.

COWELL, R.R. Microbial diversity: the importance of exploration and conservation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 18, p. 302–307, 1997.

CROUS, P.W.; VERKLEY, G.J.M.; GROENEWALD, J.Z.; SAMSON, R.A. **Fungal biodiversity**. CBS Laboratory Manual Series. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 269 p. 2009a.

CROUS, P.W.; GROENEWALD, J.Z.; SUMMERELL, B.A.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. Co-occurring species of *Teratosphaeria* on *Eucalyptus*. **Persoonia**, Nederland, v. 22, p.38-48, 2009b.

CRUZ, A.S. **Avaliação dos fatores abióticos e bióticos de uma área petroquímica da região de Paulínia, SP, e fotodocumentação dos fungos transientes isolados**. 2010. 134f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 96, n. 7, p. 7998-8002, 1999a.

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

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

CURRIE, C. R. Prevalence and impact of a virulent parasite on a tripartite mutualism. **Oecologia**, Rio de Janeiro, v. 128, n. 1, p. 99-106, 2001b.

CURRIE, C.R. Ants, agriculture and antibiotics: A quadripartite symbiosis. In: SECKBACH, J. (Ed.). **Symbiosis: mechanisms and model systems**. Dordrecht, Boston & London: Kluwer Academic Publisher, 2002. 796p.

DANGL, J.L.; JONES, J.D.G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, London, v.411, p.826-833, 2001.

DE HOOG, G. S.; QUEIROZ-TELLES, F.; HAASE, G.; FERNANDEZ-ZEPPEFELDT, G.; ANGELIS, D.A.; VAN DEN ENDE, A.; MATOS, T.; PELTROCHE-LLACSAHUANGA, H.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; RAINER, J.; RICHARD-YEGRES, N.; VICENTE, V.; YEGRES, F. Black fungi: clinical and pathogenic approaches. **Medical Mycology**, Washington, v.38, p.243-250, 2000.

DEL-CLARO, K. & OLIVEIRA, P.S. Ant-Homoptera interaction: do alternative sugar sources distract tending ants? **Oikos**, Sweden, v.68, p.202-206, 1993.

DELLA LUCIA, T.M.C., FOWLER, H.G., ARAÚJO, M.S. Castas de formigas cortadeiras. In: DELLA-LUCIA, T.M.C. (Ed.). **As formigas cortadeiras**. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, p.43 – 48, 1993.

DELLA LUCIA, T.M.C.; OLIVEIRA, M.A. de; ARAÚJO, M.S.; VILELA, E.F. Avaliação da não-preferência da formiga cortadeira *Acromyrmex subterraneus subterraneus* Forel ao corte de *Eucalyptus*. **Revista Árvore**, Viçosa, v.19, n.1, p.92-99, 1995.

DI CASTRI, F.; YOUNES, T. Ecosystem function of biological diversity. **IUBS Biology International Special Issues**, France, n.22, 1990.

DINIZ, E.A. **Evolução dos comportamentos de preparação do substrato para o cultivo do fungo simbiote e cuidados com a cria, rainha e alados em formigas da tribo Attini (Hymenoptera: Formicidae)**. 2008. 102f. Tese (Doutorado em Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro. 2008

DIXON, D. M.; WALSH, T. J.; MERZ, W. G.; MCGINNIS, M. R. Infections due to *Xylohypha bantiana* (*Cladosporium trichoides*). **Reviews of infectious diseases**, U.S.A., v.11, p.515-525, 1989.

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

DUMPERT, K. **The social biology of ants**. London: The Pitman Press, p.235-254, 1981.

ELLIS, M.B. **More dematiaceous hyphomycetes**. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 507p. 1976.

FALCÃO, P.F. **Efeito da fragmentação florestal na diversidade de plantas cortadas pela formiga cortadeira *Atta cephalotes***. 2004. 53f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2004.

FARIAS, A.R.N.; SANTOS FILHO, H.P. Controle de *Alerothrixus aepimcom* e os fungos *Botrytis* sp. e *Cladosporium* sp. na cultura de mandioca. In: **III SICONBIOL. Simpósio de Controle Biológico**. Águas de Lindóia. 1992.

FERREIRA, I.E.P. **Modelagem matemática para a dispersão de fungos fitopatogênicos via autômatos celulares**. 2008. 47f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Física Médica) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2008.

FIDALGO, O. Rick, o pai da Micologia brasileira. **Rickia**, São Paulo, v.1, p.3-11, 1962.

FIDALGO, O. Introdução à história da Micologia brasileira. **Rickia**, São Paulo, v.3, p.1-44, 1968.

FINCHER, R.E.M.D.; FISHER, J.F.M.D.; LOVELL, R.D.M.D.; NEWMAN, C.M.D.; ESPINEL-INGROFF, A.M.S.; SHADOMY, H.J. Infection Due to the Fungus *Acremonium* (*Cephalosporium*). **Medicine**, Philadelphia, v.70, n.6, p.398-409, 1991.

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.

FITTKAU, E.J.; KLINGE, H. On biomass and trophic structure of the centralamazonian rain forest ecosystem. **Biotropica**, U.S.A., n.5, p.2-14, 1973.

FONSECA, J.C.L. da. **Manual para gerenciamento de resíduos perigosos**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 104p, 2009.

FORTI, L.C. Relação entre plantas atacadas e a saúva *Atta sexdens rubropilosa* (Formicidae: Hymenoptera). **Boletim do GTFC**, Piracicaba, v.2, p.11-13, 1985.

FORTI, L.C., BOARETTO, M.Ap.C. **Formigas cortadeiras: Biologia, ecologia, danos e controle**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 1997. 61p.

FURLANI, R.P.Z.; GODOY, H.T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis. **Ciência Tecnológica de Alimentos**, Campinas, SP, v.27, n.1, 2007.

GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology**. Wiley& Sons: Nova York, USA, 2ed., 458pp, 1994.

HALL, T.A. 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.

HAWKSWORTH, D.L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**, Cambridge, v.95, n.6, p.641-655, 1991.

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.

HEBLING, M.J.A.; BUENO, O.C.; PAGNOCCA, F.C. et al. Toxic effects of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) to laboratory nests of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Applied Entomology**, U.S.A., v.124, p.33-50, 2000.

HENSON, J.M.; BUTLER, M.J.; DAY, A.W. The dark side of the mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.37, p. 447-471, 1999.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants**. Cambridge: Harvard University. Press, 1990. 732p.

HONDA, N.K.; VILEGAS, W. A química dos liquens. **Química nova**, São Paulo, v.21, n.6, p.110-125, 1998.

HOWARD, J.J. Leafcutting ant diet selection: the role of nutrients, water and secondary chemistry. **Ecology**, U.S.A., v.68, p.503-515, 1987.

HUBBELL, S.P.; HOWARD, J.J.; WIEMER, D.F. Chemical repellency to an attini ant: seasonal distribution among potential host plant species. **Ecology**, U.S.A., v.65, p.1067-1076, 1984.

HUNTER, G.C., et al. *Teratosphaeria nubilosa*, a serious leaf disease pathogen of *Eucalyptus* spp. in native and introduced areas. **Molecular Plant Pathology**, U.S.A., v.10, n.1, p.1-14, 2009.

HUNTER-CEVERA, J. C. The value of microbial diversity. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, v. 1, n. 3, p. 278-285, 1998.

IBGE. **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico – 2000**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pnsb/default.shtm>>. Acesso em: 21/agosto/2010.

JANISIEWICZ, W.J. Biocontrol of postharvest diseases of apples with antagonist mixtures. **Phytopathology**. Saint Paul, n. 78, p. 194-198, 1988.

JUSTI, J. Jr; IMENES, S.L.; BERGMANN, E.C.; CAMPOS-FARINHA, A.E.C.; ZORZENON, F.J. Formigas cortadeiras. **Boletim Técnico do Instituto Biológico**, São Paulo, n.4, p.5-31, 1996.

KASPARI, M. Removal of seeds from Neotropical frugivore droppings: Ant responses to seed number. **Oecologia**, Rio de Janeiro, v.95, p.81-88, 1993.

KIMATI, H. Controle químico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, p.46-95, 1995.

KRIEGER, H.; BEIGUELMAN, B.; DE CAMARGO, E.P.; KRIEGER, M.; VANIN, S.A. Área de Ciências Biológicas. **Parcerias estratégicas**. Academia Brasileira de Ciências: Edição especial. Brasília: MCT, Centro de estudos estratégicos. 2009. Disponível em: <<http://java.cgee.org.br/kmmsearch/download?doc=200806040437202.pdf>>. Acesso em: 21 agosto 2010.

KRUSCHEWSKY, M.C.; BEZERRA, J.L.; SOUZA, M.M. de; SILVEIRA, A. Detecção, isolamento e identificação de fitopatógenos em *Passiflora* spp. **XII Seminário de Iniciação Científica da UESC**, p. 118-119, 2006.

KOST, C.; LAKATOS, T.; BÖTTCHER, I.; ARENDHOLZ, W-R.; REDENBACH, M.; WIRTH, R. Non-specific association between filamentous bacteria and fungus-growing ants. **Naturwissenschaften**, Germany, v.94, p.821-828, 2007.

KUPPER, K.C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. de. Controle Biológico de *Colletotrichum acutatum*, Agente Causal da Queda Prematura dos Frutos Cítricos. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v.28, n.3, 2003.

LACAVA, P.T.; AZEVEDO, J.L. Técnicas moleculares aplicadas ao estudo de ecologia microbiana. In: Melo, I.S.; Azevedo, J.L. (Eds.). **Microbiologia Ambiental**. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, Brasil, p. 107-124, 2008.

LIMA, L.H.C.; MARCO, J.L.; FELIX, C.R. Enzimas hidrolíticas envolvidas no controle biológico por micoparasitismo. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Org.). **Controle Biológico**. 1 ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v.2, p.263-304, 2000.

LITTLE, A. E; CURRIE, C. R. Symbiotic complexity: discovery of a fifth symbiont in the attine –microbe symbiosis. **Biology Letters**, London, v. 3, n. 5, p. 501-504, 2007.

LUCAS, J.A. **Plant pathology and plant pathogens**. Oxford: Blackwell Science, 3ed, 74 p, 1998.

LUNN, G.; SANSONE, E. B. **Destruction of Hazardous Chemicals in the Laboratory**. New York; John Wiley & Sons, 501p, 1994.

MANFIO et al. 1998. **Biodiversity: Perspectives and Technological Opportunities**. Capítulo 9: Diversidade Microbiana e Desenvolvimento Sustentável (diversos documentos). Disponível em: <<http://www.bdt.org.br/publicacoes/padctbio/cap9/>>. Acesso em: 07 set.2010.

MARICONI, F.A.M. **As saúvas**. São Paulo, Editora Agronômica Ceres, 167p. 1970.

MARINHO, C.G.S.; DELLA LUCIA, T.M.C.; PICANÇO, M.C. Fatores que dificultam o controle das formigas cortadeiras. **Revista Bahia Agrícola**, Bahia, v.7, n.2, p.18-21, 2006.

MAYER, V.E.; VOLGMAYR, H. Mycelial carton species galleries of *Azteca brevis* (Formicidae) as a multi-species network. **Proceedings of the Royal Society B**, United Kingdom, v.276, p.3265–3273, 2009.

MEZZANI, A.; PERIN, C.; SANTOS Jr, S.A.; BERND, L.A.G.; DI GESU, G. Os fungos anemófilos e sensibilização em indivíduos atópicos em Porto Alegre, RS. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.49, n.3, 2003.

MEYER et al. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the Polymerase Chain Reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, nº 31, p. 2274-2280, 1993.

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.

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

MUELLER, U. G.; GERARDO, N. M.; AANEN, D. K.; SIX, D. L.; SCHULTZ, T. R. The evolution of agriculture in insects. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, Palo Alto, v. 36, n. x, p. 563-595, 2005.

MUELLER, U.G.; DASH, D.; RABELING, C.; RODRIGUES, A. Coevolution between attine ants and actinomycete bacteria: a reevaluation. **Evolution**, U.S.A., v.62, 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.

NORBERG, A.N.; SERRA-FREIRE, N.M. Caracterização da dose letal mínima por irradiação gama para *Penicillium citrinum*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.35, n.6, 1993.

NORTH, R.D.; JACKSON, C.W.; HOWSE, P.E. Evolutionary aspects of ant-fungus interactions in leaf-cutting ants. **Trends in Ecology & Evolution**, Cambridge, v.12, p.386-389, 1997.

O'DONNELL, A. G.; GÖRES, H. E. 16S rDNA methods in soil microbiology. **Current Opinion in Biotechnology**, Amsterdam, v. 10, n. 3, p. 225-229, 1999.

OLIVEIRA, M. F. S. S. de. **Controle de formigas cortadeiras**. 2006. 119f. Dissertação (Doutorado em Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2006.

OLIVEIRA, V.M.de; SETTE, L.D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. Preservação e prospecção de recursos microbianos. **Multiciência: Construindo a história dos produtos naturais**, n.7, 2006.

ORTIZ, A.; MADRIGAL, A.; ORDUZ, S. Evaluación del comportamiento de las hormigas *Atta cephalotes* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) frente a la contaminación del jardín del hongo com *Trichoderma lignorum*. **Revista Colombiana de Entomologia**, Bogotá, v.25, n.3, p.167-177, 1999.

OTIS, E.J.; WOLKE, R.E. Infection of *Exophiala salmonis* in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). **Journal of Wildlife Diseases**, Kansas, v.21, n.1, p.61-64, 1985.

PACE, N. R.; STAHL, D. A.; LANE, D. J.; OLSEN, G. J. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. **Advances in Microbial Ecology**, New York, v. 9, n. 1, p. 1-55, 1986.

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.

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

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

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

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. **Interação Planta-Patógeno**. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz. 2008. 627pp.

PATTERSON, J.W.; WARREN, N.G.; KELLY, L.W. Cutaneous phaeohyphomycosis due to *Cladophialophora bantiana*. **Journal of the American Academy of Dermatology**, U.S.A, v.40, n.2, p.364-366, 1999.

PELCZAR, M.J. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. São Paulo: Makron Books do Brasil, 2ed, vol. 1, 1997

PEROTTO, S.; LANFRANCO, L.; ARLORIO, M.; LONGATO, S.; MATTEUCCI, A.; PERUGINI, J.; MELLO, T.; BONFANTE, P. Molecular aspects of biodiversity of mycorrhizal fungi. In: MARTINS, M.T.; SATO, M.I.Z.; TIEDJE, J.M.; HAGLER, L.N.; DOBEREINER, J.; SANCHEZ, P.S. Progress in Microbial Ecology. (Eds.). **SBM/ICOME Press**, San Paolo, Brasile, pp. 83-90, 1997.

PRENAFETA-BOLDÚ, F.X.; VERVOORT, J.; GROTENHUIS, J.T.C.; van GROENESTIJN, W. Substrate Interactions during the Biodegradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylene (BTEX) Hydrocarbons by the Fungus *Cladophialophora* sp. Strain T1. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.6, p.2660-2665, 2002.

PRYCE, T.M. Universal Detection and Identification of Fungi by PCR and DNA Sequencing. In: CARTER, I.W.J.; SCHULLER, M.; JAMES, G.S.; SLOOTS, T.P.; HALLIDAY, C.L. (Eds.). PCR for Clinical Microbiology: An Australian and International Perspective. **Springer Science and Business Media B.V.** 1ed, p. 397-400, 2010.

POWELL, R.J.; STRADLING, D.J. Factors influencing the growth of *Attamycesbromatificus*, a symbiont of Attini ants. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v.87, p.205-213, Part 2, 1986.

POZZA, E.A.; SOUZA, P.E.; CASTRO, H.A.; POZZA, A.A.A. Frequência da ocorrência de doenças da parte aérea de plantas na região de Lavras- MG. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n.4, p.1001-1005, 1999.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, Paris, v. 51, n. 3, p. 167–177, 2000.

RAO, M.; TERBORGH, J.; NUNEZ, P. Increased herbivory in forest isolates: implications for plant community structure and composition. **Conservation Biology**, U.S.A., v. 15, p.624-633, 2001.

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

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.

RICHARD, F-J.; MORA, P.; ERRARD, C.; ROULAND, C. Digestive capabilities of leaf-cutting ants and the contribution of their fungal cultivar to the degradation of plant material. **Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology**, New York, v. 175, n. 5, p. 297-303, 2005.

RITTER, A.C. **Potencial toxigeno de *Aspergillus flavus* testado em diferentes meios e condições**. 2007. 72f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2007.

ROCKWOOD, L.L. Foraging patterns and plant selection in Costa Rican leaf-cutting ants. **Journal of the New York Entomological Society**, New York, v.85, p.222-233, 1977.

RODRIGUES, A. **Ocorrência de fungos filamentosos em ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) submetidos a tratamentos com iscas tóxicas**. 2004. 84f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro. 2004.

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**, Prague, v. 50, n. 5, p. 421-425, 2005.

RODRIGUES, O.D. **Influência da comunidade microbiana do solo no estabelecimento de saúveiros iniciais de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera: Formicidae)**. 2007. 64f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2007.

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

RODRIGUES, A. **O papel dos microfungos associados aos jardins das formigas Attini (Hymenoptera: Formicidae)**. 2009. 148f. Dissertação (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

ROSA, M.M. **Avaliação de leveduras isoladas de áreas agrícolas como agentes no controle biológico de fitopatógenos**. 2009. 169f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2009.

SALZEMANN, A. & JAFFÉ, K. On the territorial behavior of Field colonies of the leaf-cutting ants *Atta laevigata* (Hymenoptera: Myrmicinae). **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v.36, n.2, p.133-138, 1990.

SAMPAIO et al. Polyphasic taxonomy of basidiomycetous yeasts genus *Rhodospiridium*: *Rhodospiridium kratochvilovae* and related anamorphic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** Reading, n. 51, p. 687-697, 2001.

SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C. **Introduction to food- and airborne fungi**. Wageningen: Ponsen & Looyen, 7ed, 389p. 2004.

SARON, E.S. Controle de pragas através da fumigação do brometo de etila em embalagens e paletes de madeira. **Boletim de Tecnologia e Desenvolvimento de Embalagens**, Campinas, v.12, n.1, 2000.

SATOW, M.M., ATTILI-ANGELIS, D., 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**, Neterland, v.61, p.157–163, 2008.

SATOW, M.M. **Avaliação do método de Iwatsu et al. (1981) para isolamento de leveduras negras do solo, degradadoras de hidrocarbonetos**. 2008. 97f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociência, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2008.

SCHULTZ, T. R. Ants, plants and antibiotics. **Nature**, London, v. 398, n. 6730, p. 747-748, 1999.

SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Washington, v. 105, n. 14, p. 5435-54401, 2008.

SCHULTZ, T. R.; MUELLER, U. G.; CURRIE, C. R.; REHNER, S. A. Reciprocal illumination: a comparison of agriculture in humans and in fungus-growing ants. In: VEGA, F. E.; BLACKWELL, M. (Eds.) **Insect-fungal associations: ecology and evolution**. New York: Oxford University Press, 2005. 333 p.

SCOLARI, D.D.G. **Produção agrícola mundial: o potencial do Brasil**. 2008. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br/noticias/files/materia.pdf>>. Acesso em: 04/setembro/2010.

SEN, R.; ISHAK, H.D.; ESTRADA, D.; DOWD, S.E.; HONG, E.; MUELLER, U.G. Generalized antifungal activity and 454-screening of *Pseudonocardia* and *Amycolatopsis* bacteria in nests of fungus-growing ants. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, U.S.A., v.106, p.17805-17810, 2009.

SHIKI, S. Sistema agroalimentar no cerrado brasileiro. In: SHIKI, S.; SILVA, J.G. da; ORTEGA, A.C. (Org.). **Agricultura, meio ambiente e sustentabilidade do cerrado brasileiro**. Uberlândia: UFU, 1997. p.135-166.

SILVA, J. H.; MONTEIRO R. T. R. Degradação de compostos xenobióticos por fungos filamentosos isolados de areia fenólica. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v.24, p.669-674, 2000.

SILVA FILHO, G.N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v.24, p.311-319, 2000.

SILVA, R.B. da; COELHO, G.D. **Fungos: Principais grupos e aplicação biotecnológicas**. 2006. Disponível em:
<http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/estagio_docencia/RicardoSilvaeGlaucianeCoelho.pdf>. Acesso em: 03/setembro/2010.

SILVA, A.; BACCI, M. Jr.; SIQUEIRA, C. G.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 49, n. 4, p. 307-313, 2003.

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

SILVA-FILHO, M.C.; FALCO, M.C. Interação Planta-Inseto: adaptação dos insetos aos inibidores de proteinases produzidas pelas plantas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, Ano 2, n.12, 2000.

SINGH, H. **Mycoremediation: fungal bioremediation**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 592p. 2006.

SOUZA, C. S.; MIRANDA, R.C.M.; SENA, K.X.R.F. de; ARAÚJO, J.M. de; CHIAPPETA, A.A.; SOUSA, M.F.V.Q. **Isolamento e seleção de microrganismos degradadores de derivados de petróleo**. In: 3º CONGRESSO BRASILEIRO DE P&D EM PETRÓLEO E GÁS. Salvador-BA-Brasil, 2005.

SPIELMANN, A.A. **Fungos Liqueenizados (Liquens)**. Programa de Capacitação de monitores e educadores, São Paulo, 2006.

STALEY, J. **Microbial Diversity and the Biosphere**. 1998. Disponível em : <<http://www.bdt.org.br/oea/sib/staley>>. Acesso em: 07 set. 2010.

STOW, A.; BEATTIE, A. Chemical and genetic defenses against disease in insect societies. **Brain, Behavior and Immunity**, Orlando, v. 22, n. 7, p. 1009-1013, 2008.

SUDDUTH, E. J., CRUMBLEY A. J., FARRAR, W. E. Phaeohyphomycosis due to *Exophiala* species: clinical spectrum of disease in humans. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.15, p.639-44, 1992.

SUTTON, D. A., FOTHERGILL, A. W., RINALDI, M. G. **Guide to Clinically Significant Fungi**. Williams & Wilkins, Baltimore. 1ed. 1998.

TAKAHASHI, J. A. & FERREIRA-LUCAS, E. M. Ocorrência e Diversidade Estrutural de Metabólitos Fúngicos com Atividade Antibiótica. **Química Nova**, São Paulo, v.31, n.7, p.1807-1813, 2008.

TARIQ, V.N.; CAMPBELL V.M. Influence of volatile metabolites from *Geotrichum candidum* on other fungi. **Mycological Research**, Cambridge, v.95, n.7, p.891-893, 1991.

TERBORGH, J.; FEELEY, K.; SILMAN, M.; NUNEZ, P.; BALUKJIAN, B. Vegetation dynamics of predator-free land-bridge islands. **Journal of Ecology**, U.S.A., v.94, p.253-263, 2006.

THOMPSON, F.L.; OLIVEIRA, V.M. de; AZEVEDO, J.L. de; ARAÚJO, W.L. de; INÁCIO, C.A.; SELEGHIM, M.H.R.; KITAJIMA, E.W. **Taxonomia: Microbiana, de Procariontes, de Fungos, de Protozoários e de Vírus**. Brasília: CGEE, 2005. 53p.

TIEDJE, J.M. Microbial diversity: of value to whom? **ASM News**, Washington, v.60, p.524-525, 1994.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 6ed, 2000.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, v. 5, n. 3, p. 240–245, 2002.

VASCONCELOS, H.L. Foraging activity an Amazonian leaf-cutting ant: responses to changes in the availability of woody plants and to previous plant damage. **Oecologia**, Rio de Janeiro, v.112, p.370-378, 1997.

VASCONCELOS, H.L.; FOWLER, H.G. Foraging and fungal substrate selection by leaf-cutting ants. In: MEER, R.K.V.; JAFFÉ, K.; CEDENO, A. (Ed.). **Applied Myrmecology: a world perspective**. San Francisco: Westview Press, 1990. p.410-90.

VASCONCELOS, H.L.; CHERRETT, J.M. Efeitos da herbivoria pela saúva *Atta laevigata* (Fr. Smith) sobre a regeneração de plantas lenhosas em uma área agrícola abandonada da Amazônia Central. In: GASCON, C. & MOUTINHO, P. (Eds.). **Floresta Amazônia: dinâmica, regeneração e manejo**. Manaus: INPA, 1998, p. 171-178.

VILELA, E. F. **Behaviour and control of leaf-cutting ants (Hym.: Formicidae)**. Tese de Doutorado, University of Southampton, Inglaterra. 209 p. 1983.

VILELA, E.F. Feromônios no controle de formigas cortadeiras. **PCMIP/IPEF**: 11-13, 1994. Anais do III Curso de Atualização no Controle de Formigas Cortadeiras. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG

VILELA, E.F.; HOWSE, P.E. Pheromone performance as na attractive component in baits forthe control of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hym.: Formicidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, PR, v.17, p.107-24, 1988.

WARD, D. M. A natural species concept for prokaryotes. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, v. 1, n. 3, p. 271-277, 1998.

WARD, P.S. Phylogeny, classification, and species-level taxonomy of ants (Hymenoptera: Formicidae). In: ZHANG, Z.-Q.; SHEAR, W.A. (Eds.). Linnaeus Tercentenary: Progress in Invertebrate Taxonomy. **Zootaxa**, New Zealand, v.1668, p.1-766, 2007.

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

WENDLAND, J. Comparison of morphogenetic networks of filamentous fungi and yeast. **Fungal Genetics and Biology**, U.S.A., v.34, p.63-82, 2001.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. et al. (Comp.). **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315-322.

WILSON, E.O. Chemical communication in the fire ant *Solenopsis saevissima* 1. The organization of mass recruitment 2. An information analysis of the odour trail 3. The experimental induction of social response. **Animal Behavior**, U.S.A., v.10, p.134-164, 1962.

WILSON, E.O.; HÖLLDOBLER, B. The rise of the ants: A phylogenetic and ecological explanation. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, 102, 7411-7414. 2005.

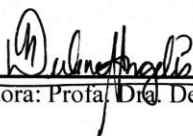
WORLD WILD FUND FOR NATURE. Relatório Planeta Vivo 2006. Disponível em: <http://assets.wwfbr.panda.org/downloads/wwf_brasil_planeta_vivo_2006.pdf>. Acesso em: 21 set 2010.

ZANETTI, R.; JAFFÉ, K.; VILELA, E.F.; ZANUNCIO, J.C.; LEITE, H.G. Proteção de plantas: Efeito da densidade e do tamanho de saueiros sobre a produção de madeira em eucaliptais. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, PR, v.29, n.1, p.105-112, 2000.

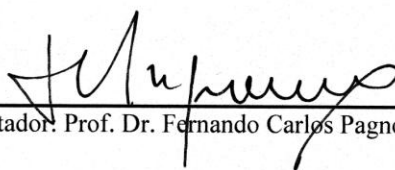
ZILLI, J.E.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R.; COUTINHO, H.L.C.; NEVES, M.C.P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v.20, n.3, p.391-411, 2003.

Ana Paula Miranda Duarte

Aluna: Ana Paula Miranda Duarte



Orientadora: Prof. Dra. Derlene Attili de Angelis



Co-Orientador: Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca

Rio Claro, 08 de dezembro de 2010