UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

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

FUNGOS NEGROS PRESENTES NO INTEGUMENTO DE FORMIGAS-CORTADEIRAS (TRIBO ATTINI)

ANA PAULA MIRANDA DUARTE TOLEDO

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

Agosto - 2016

ANA PAULA MIRANDA DUARTE TOLEDO

FUNGOS NEGROS PRESENTES NO INTEGUMENTO DE FORMIGAS-CORTADEIRAS (TRIBO ATTINI)

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área: Microbiologia Aplicada).

Orientador: Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca

Rio Claro

2016

589.2 Toledo, Ana Paula Miranda Duarte
T649f Fungos negros presentes no integumento de formigas-cortadeiras (Tribo Attini) / Ana Paula Miranda Duarte Toledo. - Rio Claro, 2016
201 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Fernando Carlos Pagnocca

1. Fungos. 2. Taxonomia. 3. Fungos dematiáceos. 4. Fungos melanizados. 5. Pirosequenciamento. 6. Teratosphaeriaceae. 7. Antagonismo. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: FUNGOS NEGROS PRESENTES NO INTEGUMENTO DE FORMIGAS-CORTADEIRAS (TRIBO ATTINI)

AUTORA: ANA PAULA MIRANDA DUARTE TOLEDO
ORIENTADOR: FERNANDO CARLOS PAGNOCCA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FERNANDO CARLOS PAGNOCCA
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB-Rio Claro

Prof. Dr. LUIZ CARLOS FORTI
Departamento de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciencias Agronomicas de Botucatu

Profa. Dra. SIMONE POSSEDENTE DE LIRA
Universidade de São Paulo, ESALQ

Prof. Dr. ODAIR CORREA BUENO
CEIS / IB-Rio Claro

Prof. Dr. ANDRE RODRIGUES
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB-Rio Claro

Rio Claro, 05 de agosto de 2016

Ao meu melhor amigo, companheiro e amor

Vinicius Toledo

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda minha família pelo apoio incessante para que eu concluísse esse Doutorado. Desde sempre vocês têm me incentivado a fazer o meu melhor, com muita dedicação e coragem. Em especial agradeço ao meu marido por dividir comigo as conquistas e os momentos de angústia, sempre com muita paciência e amor. Quero expressar também minha gratidão aos meus sogros que me acolheram e me auxiliaram em todos os momentos.

O desenvolvimento dessa tese contou com a participação de vários colaboradores, sem os quais a conclusão do trabalho não teria sido possível. Assim, agradeço profundamente

- Dr. Fernando C. Pagnocca pela orientação, confiança, disposição, amizade e ensinamentos que pretendo levar por toda a vida;
- Dr. Luiz C. Forti e Dr. Nilson S. Nagamoto pelo monitoramento dos ninhos amostrados e coleta das formigas, que foram o substrato primordial para a realização desta tese;
- Dra. Virginia E. Masiulionis e Me. Sérgio Kakazu pelo sequenciamento de DNA;
- Marina V. Vianna e Samuel Pereira pelo auxílio no isolamento dos fungos;
- Dra. Milene Ferro pelo suporte para a realização do pirosequenciamento e análise dos dados;
- Dr. André Rodrigues e Dr. Maurício Bacci pelo auxílio nas análises dos resultados do pirosequenciamento e comentários valiosos para a construção do artigo;
- Dra. Derlene Attili de Angelis pelo auxílio com as descrições morfológicas das novas espécies e pela participação imprescindível na construção do artigo;
- Dr. JZ Groenewald e Dr. Pedro W. Crous pelas análises filogenéticas das novas espécies, comentários e correções do artigo;
- Dr. Scott E. Solomon por permitir a utilização das actinobactérias e Dra. Thaís D. Mendes pelas informações compartilhadas;
- Maria Carolina Canali, Daiane Polezel e Dra. Weilan Paixão por todo o auxílio no laboratório;
- Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Área: Microbiologia Aplicada) da UNESP - Rio Claro;
- FAPESP pelo apoio financeiro (Projeto n° 2013/08540-4).

RESUMO

As relações das formigas da tribo Attini com seu fungo mutualista e outros micro-organismos são estudadas há mais de 120 anos, porém o vínculo com fungos negros foi recentemente descoberto e até o momento pouco explorado. O grande incentivo para a pesquisa nessa área ocorreu em 2007 a partir da constatação que fungos negros relacionados ao gênero *Phialophora* poderiam ser parte ativa da simbiose dessas formigas. Assim, este trabalho teve como objetivo explorar a diversidade de fungos negros no integumento de formigas cortadeiras de folhas (tribo Attini), fomentando a literatura com novas espécies descritas, e melhor esclarecer sua relação ecológica com outros micro-organismos simbiontes. De maneira geral, as principais conclusões da tese são: i) a comunidade de fungos negros no integumento de formigas cortadeiras de folhas é muito diversa. Os isolamentos realizados em dois anos de coleta mostraram espécies desconhecidas e outras reportadas pela primeira vez neste microambiente; ii) o método de pirosequenciamento revelou a presença de diversos fungos não cultiváveis e a predominância marcante do gênero *Cladosporium* no integumento de formigas cortadeiras de folhas aladas; iii) utilizando análises filogenéticas e morfológicas, seis espécies de *Xenopenidiella*, uma espécie de *Penidiellopsis* e um gênero da família Teratosphaeriaceae associados às formigas são descritos; iv) actinobactérias, como *Amycolatopsis*, *Pseudonocardia* e *Streptomyces*, encontradas no integumento de formigas Attini possuem a habilidade de inibir o crescimento de uma ampla gama de fungos negros, incluindo espécies do gênero *Phialophora*. Assim, o integumento das formigas cortadeiras de folhas mostrou ser um substrato ainda pouco explorado que contêm diversas espécies desconhecidas que podem exercer algum papel importante na simbiose das formigas Attini. O estudo de fungos negros relacionados às formigas ainda é inicial mas já se mostra promissor para a compreensão da complexidade microbiana deste ambiente.

Palavras-chave: fungos dematiáceos. fungos melanizados. pirosequenciamento. Teratosphaeriaceae. antagonismo.

ABSTRACT

The relationship of Attini ants with their mutualistic fungi and other microorganisms are studied for over 120 years, but the connection with black fungi was recently discovered and so far poorly explored. Major incentive for research in this area took place in 2007 when it was reported that black fungi related to the genus *Phialophora* could be an active part of the ants symbiosis. Thus, this study aimed to explore the diversity of black fungi on the integument of leaf-cutting ants (Attini tribe), improving the literature with new species, and to clarify its ecological relationship with other attine symbiotic microorganisms. Overall, the main conclusions of the thesis are: i) the community of black fungi in leaf-cutting ants' integument is diverse. Isolations performed in two collection years revealed unknown species and others first reported in this microenvironment; ii) the pyrosequencing method showed the presence of several uncultured fungi and the remarkable prevalence of *Cladosporium* on the integument of winged ants; iii) using phylogenetic and morphological analysis, six *Xenopenidiella* species, one *Penidiellopsis* species and one genus in the Teratosphaeriaceae family related to the ants are described; iv) actinomycetes, as *Amycolatopsis*, *Pseudonocardia* and *Streptomyces*, associated with the integument of Attini ants are able to inhibit the growth of a broad range of black fungi, including *Phialophora* species. Therefore, the integument of leaf-cutting ants proved to be a poorly explored substrate containing several unknown species that could play a significant role in the Attini ant symbiosis. The study of black fungi related to ants is still initial but it is promising for understanding the complexity of this microbial environment.

Key words: dematiaceous fungi. melanised fungi. pyrosequencing. Teratosphaeriaceae. fungal antagonism.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 10

2 CAPÍTULO 1 – Oito anos de pesquisa em fungos negros no integumento de formigas cortadeiras de folhas: novas descobertas e revisão da literatura 16
2.1 Motivação 17
2.2 Introdução 18
2.2.1 Formigas-cortadeiras 18
2.2.2 Relações com outros micro-organismos 19
2.2.3 Presença de fungos negros no ambiente das formigas 21
2.2.4 Características dos fungos negros 22
2.3 Materiais e Métodos 23
2.3.1 Local e coleta das formigas 23
2.3.2 Métodos de isolamento 23
2.3.3 Preservação dos fungos isolados 25
2.3.4 Extração de DNA dos fungos 25
2.3.5 Amplificação (PCR) 25
2.3.6 Sequenciamento 26
2.3.7 Análises morfológicas do inventário de fungos negros 26
2.4 Resultados e Discussão 27
2.5 Inventário de fungos negros presentes no integumento de formigas cortadeiras de folhas 32
2.6 Considerações finais 91

3 CAPÍTULO 2 – Prevalence of the genus *Cladosporium* on the integument of leaf-cutting ants characterized by 454 pyrosequencing 114
3.1 Contextualização 115
3.2 Abstract 116
3.3 Introduction 117
3.4 Materials and Methods 118
3.4.1 Study site and sampling 118
3.4.2 Molecular analysis 119
3.4.3 Bioinformatics and data analysis 119

3.5 Results 120
3.6 Discussion 126
3.7 Online Resource 1 134
3.8 Online Resource 2 141

4 CAPÍTULO 3 – Riding with the ants 142
4.1 Abstract 143
4.2 Introduction 144
4.3 Materials and Methods 145
4.3.1 Isolation techniques 145
4.3.2 Fungal isolates 146
4.3.3 DNA extraction 146
4.3.4 Multi-locus PCR amplification and sequencing 146
4.3.5 Alignment and phylogenetic reconstruction 147
4.3.6 Morphology 151
4.4 Results 151
4.4.1 Phylogeny 151
4.4.2 Taxonomy 155
4.5 Discussion 176
4.6 Concluding remarks 178

5 CAPÍTULO 4 – Inhibition of black fungi by actinobacteria associated with attine ants 185
5.1 Abstract 186
5.2 Introduction 187
5.3 Materials and Methods 188
5.3.1 Microorganisms selection 188
5.3.2 DNA extraction and sequencing 188
5.3.3 Bioassay challenges 189
5.4 Results 189
5.4.1 Actinobacteria and black fungi identification 189
5.4.2 Antagonism against black fungi 193
5.5 Discussion 195
5.6 Online Resource 200

6 CONSIDERAÇÕES E PERSPECTIVAS 201

1 INTRODUÇÃO

O mutualismo de formigas da tribo Attini com seu fungo cultivado (Leucocoprineae e Pterulaceae) é um exemplo de simbiose moldada em milhões de anos de coevolução (SCHULTZ; BRADY, 2008; MIKHEYEV et al., 2010). Durante a evolução, diversos outros micro-organismos tornaram-se parte dessa simbiose de modo que estudos sobre o consórcio microbiano estabelecido por esses insetos são fundamentais para a compreensão da dinâmica na colônia.

As formigas da tribo Attini cultivam fungos basidiomicetos (CHAPELA et al., 1994) como fonte imprescindível de nutrientes (WEBER, 1972; BASS; CHERRETT, 1995) num arranjo característico conhecido como "jardim de fungo". Para o cultivo deste fungo mutualista, as formigas dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta* utilizam material vegetal fresco recém-cortado (MARICONI, 1970; WEBER, 1972), sendo, por isso, conhecidas como formigas cortadeiras de folhas.

Enquanto as larvas alimentam-se de estruturas ricas em carboidratos (gongilídeos) produzidas pelo fungo mutualista (QUINLAN; CHERRETT, 1979), as operárias também

obtém nutrientes da ação enzimática do fungo sobre o substrato vegetal (SILVA et al., 2003), da seiva das folhas durante o processo de corte (BASS; CHERRETT, 1995) e do líquido proctodeal produzido pelas larvas (SCHNEIDER, 2003).

O fungo mutualista das formigas cortadeiras de folhas, *Leucoagaricus gongylophorus*, é disperso através de transmissão vertical (SCHULTZ; BRADY, 2008) durante o período de reprodução, chamado de vôo nupcial ou revoada. Quando uma fêmea alada (içá) deixa o ninho para realizar o vôo nupcial ela carrega uma pequena porção do fungo em sua cavidade infrabucal, e, após o acasalamento com os machos alados (bitús), as rainhas retornam ao solo para estabelecerem novas colônias (AUTUORI, 1941; QUINLAN; CHERRETT, 1979). Assim, a casta reprodutiva (içás e bitús) foi de particular interesse para esta tese pois contribuem com a formação da microbiota da nova colônia.

Como as formigas Attini dependem diretamente do fungo mutualista, sua manutenção e proteção são de fundamental importância. Assim, esses insetos utilizam diferentes mecanismos para defender seus jardins de fungo de outros micro-organismos indesejáveis (CURRIE; STUART, 2001; FERNÁNDEZ-MARÍN et al., 2006; RODRIGUES et al., 2008). Dentre os mecanismos defensivos empregados, actinobactérias do gênero *Pseudonocardia*, encontradas no integumento de formigas Attini, produzem compostos antimicrobianos que inibem o crescimento de fungos parasitas, como o gênero *Escovopsis* (POULSEN et al., 2010; CAFARO et al., 2011). Porém estudos recentes têm demonstrado que outras actinobactérias, como *Amycolatopsis* e *Streptomyces*, estão presentes no integumento dessas formigas e também produzem compostos antifúngicos que auxiliam na proteção das colônias (HAEDER et al., 2009; BARKE et al., 2010; MENDES et al., 2013; MEIRELLES et al., 2014).

Apesar dos esforços, os mais de 120 anos de pesquisas sobre a relação das formigas Attini com o fungo mutualista, iniciadas com o trabalho de Möller (1893), têm mostrado que as formigas não conseguem eliminar micro-organismos contaminantes presentes nas colônias (PAGNOCCA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2005, 2011; REIS et al., 2015).

Embora diversos trabalhos tenham sido publicados sobre fungos isolados do ambiente das formigas cortadeiras de folhas, a aplicação de sequenciamento de nova geração (NGS) para avaliar a diversidade fúngica no integumento desses insetos ainda não foi explorada. Assim, pela primeira vez, apresentamos no capítulo 2 os resultados de um pirosequenciamento para avaliação da comunidade fúngica presente no integumento de formigas cortadeiras de folhas aladas (içás e bitús) de ninhos de *Atta capiguara* e *Atta laevigata*.

Fungos negros das ordens Chaetothyriales e Capnodiales têm sido frequentemente isolados do integumento de formigas cortadeiras de folhas, como mostrado na revisão do capítulo 1. A presença desses fungos em associação com as formigas tem sido considerada de extrema relevância, pois o nicho na natureza de muitos ainda é desconhecido e existem diversos relatos de fungos negros ocasionando severas infecções em humanos (VICENTE et al., 2008; SAUNTE et al., 2012).

Além disso, uma parte dos fungos negros isolados do integumento das formigas cortadeiras de folhas constitui táxons desconhecidos e algumas novas espécies já foram descritas (ATTILI-ANGELIS et al., 2014; SAMERPITAK et al., 2014, 2015). Duarte et al. (2014) isolaram deste microambiente várias linhagens de fungos pertencentes à família Teratosphaeriaceae e que são melhor analisadas neste trabalho. Assim, seis espécies de *Xenopenidiella*, uma espécie de *Penidiellopsis* e um gênero, *Simplicidiella*, são descritos no capítulo 3, baseado em dados morfológicos e filogenéticos.

Por ser um tema pouco explorado, o papel dos fungos negros na simbiose das formigas Attini ainda é desconhecido. Little e Currie (2007) isolaram massivamente colônias de leveduras negras (filogeneticamente próximas a fungos do gênero *Phialophora*; Ascomycota) do integumento de formigas *Apterostigma* (tribo Attini). Segundo esses autores, as leveduras negras mantêm uma associação com as formigas ao longo do período evolutivo e, portanto, são classificadas como simbiontes. Adicionalmente, Little e Currie (2008) propõem que a levedura negra possui uma relação de antagonismo com *Pseudonocardia*, diretamente competindo por nutrientes e suprimindo o crescimento dessas actinobactérias.

Porém, outros estudos têm revelado que a diversidade de fungos negros e actinobactérias no integumento das formigas Attini é muito maior do que se pensava (SEN et al., 2009; DUARTE et al., 2014) colocando em questionamento a classificação da levedura negra *Phialophora* como simbionte. Assim, na tentativa de melhor elucidar esse complexo microbiano, o capítulo 4 apresenta resultados de testes de antagonismo realizados entre uma grande diversidade de fungos negros presentes no integumento de formigas cortadeiras de folhas e diferentes espécies de actinobactérias simbiontes, incluindo *Amycolatopsis*, *Pseudonocardia* e *Streptomyces*.

O foco dessa tese foi analisar a micobiota no integumento de formigas cortadeiras de folhas, com destaque para os fungos negros, através de abordagens dependentes e independente de cultivo. A descrição de novas espécies de fungos negros presentes nas formigas e a constatação de relações antagônicas com outros micro-organismos simbiontes fornece uma imagem mais completa da complexidade dessas interações ecológicas e contribui

para o desenvolvimento de novas abordagens sobre a simbiose das formigas Attini com fungos negros.

Referências

ATTILI-ANGELIS, D.; DUARTE, A. P. M.; PAGNOCCA, F. C. et al. Novel *Phialophora* species from leaf-cutting ants (tribe Attini). **Fungal Diversity**, Dordrecht, v.65, p.65–75, 2014.

AUTUORI, M. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp.). I. Evolução do sauveiro (*Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.12, p.197–228, 1941.

BARKE, J.; SEIPKE, R. F.; GUÜSCHOW, S. et al. A mixed community of actinomycetes produce multiple antibiotics for the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. **BMC Biology**, London, v.9, p.109, 2010.

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

CAFARO, M. J.; POULSEN, M.; LITTLE, A. E. F. et al. Specificity in the symbiotic association between fungus-growing ants and protective *Pseudonocardia* bacteria. **Proceedings of the Royal Society of London B**, London, v.278, p.1814–822, 2011.

CHAPELA, I. H.; REHNER, S. A.; SCHULTZ, T. R. et al. Evolutionary history of the symbiosis between fungus-growing ants and their fungi. **Science**, Washington, v.266, n.5191, p.1691–1694, 1994.

CURRIE, C. R.; STUART, A. E. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. **Proceedings of the Royal Society of London B**, London, v.268, p.1033–1039, 2001.

DUARTE, A. P. M.; ATTILI-ANGELIS, D.; BARON, N. C. et al. Leaf-cutting ants: an unexpected microenvironment holding human opportunistic black fungi. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.106, n.3, p.465–73, 2014.

FERNÁNDEZ-MARÍN, H.; ZIMMERMAN, J. K.; REHNER, S. A. et al. Active use of the metapleural glands by ants in controlling fungal infection. **Proceedings of the Royal Society of London B**, London, v.273, p.1689–1695, 2006.

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

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.

LITTLE, A.E.; CURRIE, C.R. Black yeast symbionts compromise the efficiency of antibiotic defenses in fungus-growing ants. **Ecology**, Washington, v.89, p.1216–1222, 2008.

MARICONI, F. A. M**. As saúvas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1970.

MEIRELLES, L. A.; MENDES, T. D.; SOLOMON, S. E. et al. Broad *Escovopsis*-inhibition activity of *Pseudonocardia* associated with *Trachymyrmex* ants. **Environmental Microbiology Reports**, Malden, v.6, n.4, p.339–345, 2014.

MENDES, T. D.; BORGES, W. S.; RODRIGUES, A.; SOLOMON, S. E.; VIEIRA, P. C.; DUARTE, M. C. T.; PAGNOCCA, F. C. Anti-*Candida* properties of urauchimycins from actinobacteria associated with *Trachymyrmex* ants. **BioMed Research International**, v.2013, p.1–9, 2013.

MIKHEYEV, A. S.; MUELLER, U. G.; ABBOT, P. Comparative dating of attine ant and lepiotaceous cultivar phylogenies reveals coevolutionary synchrony and discord. **The American Naturalist**, Chicago, v.175, p.126–133, 2010.

MÖLLER, A. Die Pilzgärten einiger südamerikanischer Ameisen. **Botanische Mittheilungen aus den Tropen**, v.6, p.1–27, 1893.

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

POULSEN, M.; CAFARO, M. J.; ERHARDT, D. P. et al. Variation in *Pseudonocardia* antibiotic defence helps govern parasite-induced morbidity in *Acromyrmex* leafcutting ants. **Environmental Microbiology Reports**, Malden, v.2, p.534–540, 2010.

QUINLAN, R. J.; CHERRETT, J. M. The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.). **Ecological Entomology**, London, v.4, n.2, p.151–160, 1979.

RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI, M. et al. Variability of non-mutualistic filamentous fungi associated with *Atta sexdens rubropilosa* nests. **Folia Microbiologica**, Praga, v.50, p.421, 2005.

RODRIGUES, A.; CARLETTI, C. D.; BUENO, O. C. et al. Leaf-cutting ant faecal fluid and mandibular gland secretion: effects on microfungi spore germination. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.39, n.1, p.64–67, 2008.

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

REIS, B. M. S.; SILVA, A.; ALVAREZ, M. R. et al. Fungal communities in gardens of the leafcutter ant *Atta cephalotes* in forest and cabruca agrosystems of southern Bahia State (Brazil). **Fungal Biology**, Oxford, v.119, n.12, p.1170–1178, 2015.

SAMERPITAK, K.; VAN DER LINDE, E.; CHOI, H. -J. et al. Taxonomy of *Ochroconis*, genus including opportunistic pathogens on humans and animals. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v.65, n.1, p.89–126, 2014.

SAMERPITAK, K.; DUARTE, A. P. M.; ATTILI-ANGELIS, D. A new species of the oligotrophic genus *Ochroconis* (Sympoventuriaceae). **Mycological Progress**, Tübingen, v.14, p.6, 2015.

SAUNTE, D.M.; TARAZOOIE, B.; ARENDRUP, M.C. et al. **Mycoses**, Berlin, v.55, n.2, p.161–167, 2012.

SCHNEIDER, M. O. **Comportamento de cuidado da prole da saúva-limão *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera, Formicidae)**. 2003. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas -Área de Zoologia) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2003.

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

SEN, R.; ISHAKA, 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**, Whasington, v.106, n.42, p.17805–17810, 2009.

SILVA, A.; BACCI Jr., M.; SIQUEIRA, C. G. et al. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v.49, p.307–313, 2003.

VICENTE, V.A.; ATTILI-ANGELIS, D.; PIE, M.R. et al. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.61, n.1, p.137–144, 2008.

WEBER, N. A. The fungus-culturing behavior of ants. **American Zoologist**, Thousand Oaks, v.12, p.577–587, 1972.

2 CAPÍTULO 1

Oito anos de pesquisa em fungos negros no integumento de formigas cortadeiras de folhas: novas descobertas e revisão da literatura

2.1 Motivação

O início da taxonomia dos fungos foi marcado pela classificação das espécies baseada em características morfológicas, como a coloração e dimensão de esporos (CROUS et al., 2015). Assim, uma espécie com estágios morfológicos distintos foi separada em diferentes nomes científicos, como o caso de *Eurotium* (fase sexuada de *Aspergillus*).

Nos anos 90, o sequenciamento de DNA começou a ser utilizado para resolver essas questões filogenéticas. A região ITS (*Internal Transcribed Spacer)* do DNA ribossômico foi proposta como um marcador universal para a identificação de fungos (SCHOCH et al., 2012), porém para muitos grupos, como *Alternaria* (WOUDENBERG et al., 2014) e *Bipolaris* (MANAMGODA et al., 2014), a filogenia de múltiplos genes é necessária para estabelecer o limite das espécies.

Nesse contexto, as ferramentas moleculares têm sido amplamente utilizadas para sinonimizar os nomes científicos redundantes e consolidar a descrição de novas espécies (HIBBETT; TAYLOR, 2013). Além disso, a abordagem *Consolidated Species Concept* (QUAEDVLIEG et al., 2014), que integra o sequenciamento multilocus, ecologia e morfologia dos fungos, tem se mostrado mais eficaz.

Assim, a taxonomia está em constante mudança e as novas informações não são encotradas de forma concentrada. O trabalho mais atual com mudanças significativas de nomenclatura é o de Rossman et al. (2015), que fornece recomendações para os nomes de gêneros pleomórficos da classe Dothideomycetes com o suporte da Comissão Internacional sobre a Taxonomia de Fungos (ICTF).

Neste capítulo as características ecológicas e morfológicas dos principais táxons de fungos negros encontrados no integumento de formigas cortadeiras de folhas são apresentadas para reunir as informações mais recentes desses fungos e suprimir a dificuldade de encontrar referências bibliográficas muito antigas com a descrição das espécies-tipo. Além disso, este capítulo servirá como base para futuros trabalhos sobre fungos negros no ambiente das formigas.

2.2 Introdução

O número total de espécies fúngicas existente ainda é desconhecido e há divergências sobre o número de espécies estimadas, variando de 712 mil (SCHMIT; MUELLER, 2007) até 5.1 milhões (O'BRIEN et al., 2005). Apesar dessa disparidade, sabe-se que apenas cerca de 100 mil espécies são reconhecidas (CROUS et al., 2015).

De acordo com Hawksworth (2012), as associações entre fungos e insetos são negligenciadas nas estimativas de riqueza de espécies em escala global e representam uma fonte ainda pouco explorada. Assim, torna-se evidente a importância de estudos destinados ao isolamento de fungos a partir do ambiente das formigas.

Nesse contexto, os ninhos de formigas Attini têm despertado o interesse de diversos taxonomistas. Nos últimos 16 anos, foram descritas cinco novas espécies de leveduras (MIDDELHOVEN et al., 2003; CARREIRO et al., 2004; PAGNOCCA et al., 2010; MELO et al., 2014; MASIULIONIS; PAGNOCCA, 2016) e 13 espécies de fungos filamentosos provenientes desse ambiente (AUGUSTIN et al., 2013; ATTILI-ANGELIS et al., 2014; SAMERPITAK et al., 2014, 2015; MASIULIONIS et al., 2015; MEIRELLES et al., 2015; MONTOYA et al., 2016), incluindo novas espécies de fungos negros. A maior parte dessas novas espécies foi obtida a partir de estudos realizados no Laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos de Insetos Sociais do Instituto de Biociências da UNESP, câmpus de Rio Claro (SP).

A presença de fungos negros no integumento de formigas Attini tem sido considerada de extrema importância, pois, além da possibilidade de desempenharem um papel na dinâmica da colônia, esses fungos potencialmente patógenos podem utilizar as formigas como veículo de dispersão no ambiente.

Nesse capítulo será abordada a diversidade de fungos negros no integumento de formigas cortadeiras de folhas, compilando os dados existentes na literatura e acrescentando novos relatos para melhor compreender as relações ecológicas estabelecidas por esses micro-organismos no ambiente das formigas.

2.2.1 Formigas cortadeiras de folhas

As formigas da tribo Attini ocorrem exclusivamente nas Américas (MEHDIABADI; SCHULTZ, 2009) e são conhecidas por cultivarem um fungo mutualista (CHAPELA et al., 1994) que é utilizado pela colônia como fonte de nutrientes (BASS; CHERRETT, 1995).

Até o momento, 16 gêneros de formigas atíneas estão descritos (BRANDÃO et al., 2011). Os gêneros *Atta* e *Acromyrmex* cortam grandes quantidades de material vegetal que é fornecido ao fungo mutualista (*Leucoagaricus gongylophorus*) como substrato, sendo, por isso, popularmente conhecidas como formigas cortadeiras de folhas.

As formigas cortadeiras de folhas são de grande importância econômica visto que causam prejuízos à agrossilvicultura e pastagens (DELLA LUCIA; SOUZA, 2011). Assim, diversos estudos tem sido realizados visando o controle desse inseto-praga, como a busca por substâncias com propriedades inibitórias (BIGI et al., 2004; PAGNOCCA et al., 2006) e agentes de controle biológico (ORTIZ; ORDUZ, 2001; FOLGARAIT et al., 2011).

Os fragmentos vegetais coletados pelas formigas cortadeiras de folhas são transportados até o ninho e passam por uma apurada limpeza para a remoção de esporos fúngicos e outros micro-organismos presentes (VAN BAEL et al., 2009; CURRIE; STUART, 2001). Além disso, as formigas utilizam outras estratégias para inibir contaminantes, como secreções glandulares com propriedades antissépticas (FERNÁNDEZ-MARÍN et al., 2006) e associações benéficas com micro-organismos produtores de compostos antimicrobianos (HAEDER et al., 2009; CAFARO et al., 2011).

Para garantir o sucesso de sua relação com o fungo mutualista, além do cuidado interno com possíveis fontes de contaminação, as formigas cortadeiras de folhas promovem a dispersão do fungo mutualista durante a revoada. Quando uma fêmea alada (içá) deixa o ninho para realizar o vôo nupcial ela carrega uma pequena porção do fungo *L. gongylophorus* (pellet) em sua cavidade infrabucal, e, após o acasalamento com os machos alados (bitús), as rainhas buscam no solo um local apropriado para o novo ninho, iniciando sua escavação. Uma vez preparada a câmara inicial, retiram a porção do fungo da cavidade infrabucal e dele cuidam até que os primeiros indivíduos possam começar a forragear (WEBER, 1972).

Embora as formigas cortadeiras de folhas utilizem estratégias mecânicas e químicas para eliminar e proteger o fungo mutualista de contaminantes, sabe-se que outros micro-organismos estão presentes nos jardins de fungos e no integumento desses insetos (PAGNOCCA et al., 2011, 2012).

2.2.2 Relações com outros micro-organismos

Com o auxílio de métodos dependentes de cultivo, já foram relatados mais de 180 táxons de fungos filamentosos isolados do ambiente das formigas cortadeiras de folhas (MÖLLER, 1893; GOETSCH; STOPPEL, 1940; KREISEL, 1972; MUCHOVEJ et al., 1991;

DIEHL-FLEIG, 1993; LUCIANO et al., 1995; SEIFERT et al., 1995; FISCHER et al., 1996; CURRIE et al.; 1999a; CURRIE, 2001; HUGHES et al., 2004, 2009; RODRIGUES et al., 2005a, 2005b, 2008, 2010, 2011; PAGNOCCA et al., 2008; CARLOS et al., 2011; GUEDES et al., 2012; RIBEIRO et al., 2012; ATTILI-ANGELIS et al., 2014; DUARTE et al., 2014; REIS et al., 2015). Dentre estes, o gênero *Escovopsis* é relatado como simbionte das formigas, porém, para todos os outros táxons é preciso esclarecer se são apenas transitórios ou se realizam atividades que podem estar realacionadas com as colônias de formigas.

Fungos filamentosos do gênero *Escovopsis* (Ascomycota: Hypocreales) são parasitas especializados dos jardins de fungo mutualista e, até então, não foram encontrados na natureza ocupando outro nicho ecológico. Segundo Reynolds e Currie (2004), este parasita secreta compostos que degradam a parede das hifas/micélio do fungo mutualista e absorve os nutrientes liberados. A transmissão do *Escovopsis* entre os ninhos ainda não é bem compreendida, porém os resultados de Moreira et al. (2015) mostram que a transmissão não é vertical como é o caso do fungo mutualista, isto é, *Escovopsis* não parece ser transmitido através de fragmentos ou esporos levados pelas içás no momento da revoada.

Até o momento sete espécies de *Escovopsis* estão descritas: *E. weberi* (MUCHOVEJ; DELLA LUCIA, 1990), *E. aspergilloides* (SEIFERT et al., 1995), *E. moelleri*, *E. microspora*, *E. lentecrescens* (AUGUSTIN et al., 2013), *E. trichodermoides* (MASIULIONIS et al., 2015) e *E. kreiselii* (MEIRELLES et al., 2015). Augustin et al. (2013) também descreveram um novo gênero relacionado a *Escovopsis*, encontrado dos jardins de fungos de *Acromyrmex*, denominado *Escovopsioides*, e até o momento existe apenas uma espécie descrita neste gênero, *Escovopsioides nivea*.

Para auxiliar na proteção do fungo mutualista, as formigas desenvolveram uma relação simbiótica com actinobactérias do gênero *Pseudonocardia*, que se desenvolvem no integumento desses insetos (CURRIE et al., 1999). Essas actinobactérias são responsáveis pela produção de substâncias antimicrobianas que inibem o crescimento do fungo parasita *Escovopsis* (CAFARO et al., 2011).

Por outro lado, de maneira menos específica, uma grande diversidade de fungos filamentosos tem sido encontrada nos jardins de fungos, câmaras de descarte e integumento das formigas cortadeiras de folhas (RODRIGUES et al., 2005a, 2011; PAGNOCCA et al., 2008). Alguns autores têm sugerido que a presença desses fungos está relacionada com o material vegetal que entra nos ninhos e à própria micobiota do solo (RODRIGUES et al., 2011). Porém, fungos negros, cuja ecologia é muito peculiar, são encontrados no integumento

das formigas cortadeiras de folhas (DUARTE et al., 2014), trazendo questionamentos sobre essa associação.

2.2.3 Presença de fungos negros no ambiente das formigas

O primeiro relato de fungos negros associados com formigas Attini foi feito por Little e Currie (2007), que encontraram leveduras negras no integumento de formigas *Apterostigma*. Essas leveduras negras relacionadas ao gênero *Phialophora* foram isoladas em uma ampla distribuição geográfica, incluindo Panamá, Peru e Equador. Além disso, Little e Currie (2007) observaram que essas leveduras formam um grupo monofilético, indicando que a associação com as formigas *Apterostigma* tem se mantido ao longo do tempo evolutivo. Um ano mais tarde, os mesmos autores (LITTLE; CURRIE, 2008) revelaram que a levedura negra compete por nutrientes com a actinobactéria *Pseudonocardia*, interferindo em seu crescimento. Isso significa que, ao menos indiretamente, a levedura negra pode interferir com um dos mecanismos de proteção das formigas contra *Escovopsis*.

O Laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) já acumulou oito anos de estudos sobre a diversidade fúngica no integumento de formigas cortadeiras de folhas e importantes observações foram feitas, notadamente em relação aos fungos negros encontrados neste microambiente. Assim, os trabalhos de Guedes et al. (2012) e Duarte et al. (2014) mostraram que a diversidade de fungos negros presentes no integumento das formigas cortadeiras de folhas é muito grande.

Alternaria, *Cladophialophora*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Exophiala*, *Ochroconis* e *Phialophora* são alguns dos gêneros de fungos negros encontrados até o momento no corpo de formigas cortadeiras de folhas (GUEDES et al., 2012; DUARTE et al., 2014). Recentemente, Attili- Angelis et al. (2014) e Samerpitak et al. (2014, 2015) descreveram quatro novas espécies de fungos negros (*Phialophora attae*, *P. capiguarae*, *Ochroconis globalis* e *O. sexualis*) isoladas de formigas cortadeiras de folhas.

Além da interação simbiótica constatada por Little e Currie (2008), a ecologia dos fungos negros é outro fator de relevância para melhor compreender sua relação com as formigas Attini. Fungos negros são conhecidos como agentes de severas doenças humanas, sistêmicas ou subcutâneas (de HOOG et al., 2000; MORIO et al., 2012) cujo tratamento é dificultado pela presença da melanina na parede celular. Assim, grande parte dos estudos realizados sobre este grupo de fungos visa esclarecer aspectos clínicos e terapêuticos de doenças infecciosas.

2.2.4 Características dos fungos negros

Os fungos negros são assim denonimados devido à coloração escura de suas colônias, caracterizada pela síntese de melanina na parede celular (GESSLER et al., 2014). A melanização da parede celular depende diretamente das condições de cultivo empregadas e, assim, pode variar de acordo com o meio de cultivo, temperatura e tempo de incubação utilizado.

A presença de melanina nesse grupo de fungos é responsável por sua resistência a condições ambientais adversas (GESSLER et al., 2014) e, consequentemente, boa adaptação a ambientes extremos (GOSTINČAR et al., 2011). Interessantemente, fungos negros podem ser encontrados em salinas (GUNDE-CIMERMAN et al., 2000), carvão (HÖLKER et al., 2004), rochas na Antártica (SELBMANN et al., 2005) e ambientes domésticos (ZALAR et al., 2011).

Além da coloração escura, os fungos negros também apresentam crescimento lento em meios de cultura tradicionais, dificultando seu isolamento. Assim, métodos seletivos são utilizados para isolar esses fungos, como a flotação em óleo mineral (SATOW et al., 2008; DUARTE et al., 2014).

Outra característica marcante dos fungos negros é a preferência por ambientes ricos em hidrocarbonetos (ZHAO et al., 2010), como tolueno (PRENAFETA-BOLDÚ et al., 2006), resíduos de petróleo (SATOW et al., 2008) e creosoto (SUDHADHAM et al., 2008; SEYEDMOUSAVI et al., 2011; GÜMRAL et al., 2014). Attili-Angelis e colaboradores (2014) sugerem que a presença de fungos negros no integumento das formigas cortadeiras de folhas é favorecida por hidrocarbonetos cuticulares encontrados nesses insetos.

Estudos voltados à biodiversidade e ocorrência natural de fungos negros no ambiente têm recebido maior destaque nos últimos anos. Assim, o objetivo deste capítulo foi explorar a diversidade de fungos negros no integumento de formigas cortadeiras de folhas aladas (içás e bitús) através de diferentes técnicas de isolamento para ampliar o conhecimento existente sobre esses fungos. Os principais táxons já encontrados em formigas também foram detalhados quanto à ecologia e aspectos morfológicos.

2.3 Materiais e Métodos

2.3.1 Local e coleta das formigas

As coletas das formigas foram realizadas pelos pesquisadores Dr. Nilson S. Nagamoto e Dr. Luiz Carlos Forti em dias de revoada, momentos antes do inicio do vôo nupcial, em ninhos adultos de *Atta capiguara* e *A. laevigata*, localizados na Fazenda Santana, Botucatu, SP, Brasil (localização no GPS: 22°50.6”S; 48°26.1”W; elevação 798 m).

As coletas de 2012 e 2013 foram realizadas sob as autorizações de coleta número 36333-1 e 36333-3, respectivamente, emitidas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) em nome do Dr. Fernando Carlos Pagnocca.

2.3.2 Métodos de isolamento

Foram escolhidos para as coletas os ninhos que apresentaram maior atividade de içás e bitús iniciando o vôo nupcial. Os ninhos de *Atta capiguara* #2 e *Atta laevigata*, embora tenham fornecido material em 2012, não produziram formas aladas em 2013 e atualmente apresentam declínio e sinais de envelhecimento das colônias (observação pessoal do Dr. N. S. Nagamoto), sendo por isso substituídos pelos ninhos *A. capiguara* #3 e *A. capiguara* #5. Os métodos de isolamento, descritos abaixo, diferiram entre as coletas e, juntamente com o número de formigas utilizadas em cada método, são apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Flotação em óleo mineral (DUARTE et al., 2014)

Inicialmente foram extraídos da cavidade infrabucal das içás os pellets do fungo mutualista. Em seguida, tanto os corpos das formigas quanto os pellets foram mergulhados separadamente em tubos com 25 mL e 1 mL de solução salina, respectivamente, contendo 200 U de penicilina; 200 μg/mL de cloranfenicol; 200 μg/mL de estreptomicina e 500 μg/mL de cicloheximida (actidiona). Os tubos foram incubados à temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente, 5 mL de óleo mineral esterilizado foram adicionados a essa solução, seguido de uma agitação vigorosa por 5 min e repouso de 20 min. Da interface solução-óleo, alíquotas de 100 μL foram retiradas e semeadas em ágar Mycosel (Difco™). As placas foram incubadas a 25 °C até o aparecimento de colônias fúngicas. Após a retirada das alíquotas, os tubos contendo os corpos das formigas foram também incubados a 25 °C por um período de até 45

dias e quando houve o aparecimento de micélio negro nas paredes dos tubos foi realizado o isolamento utilizando ágar Mycosel.

Imersão em meio MYP

Os indivíduos alados foram mergulhados individualmente em tubos esterilizados contendo 5 mL de meio MYP (extrato de malte 0.7 %, extrato de levedura 0.05 %, soytone 0.25 %, cloranfenicol 150 $\mu g.mL^{-1}$, pH 4.0; SAMPAIO et al., 2001). Os tubos foram incubados a 25 ºC e a cada dois dias foram feitas verificações quanto à turvação do meio e crescimento dos fungos.

Caminhada em meio PDA (Difco™)

Os indivíduos alados foram colocados para caminhar por duas horas em placas de Petri contendo o meio Potato Dextrose Agar (PDA) (Difco™) adicionado de cloranfenicol (150 $\mu g.mL^{-1}$). Após esse período, as formigas foram retiradas e as placas incubadas a 20 ºC. Verificações a cada dois dias, até um período de sete dias, foram realizadas. Nessa metodologia foram selecionadas para a etapa de purificação apenas linhagens leveduriformes.

Cultivo em meio ágar Mycosel (Difco™)

Os corpos das formigas foram sonicados em água destilada por 15 min. Devido a diferença de tamanho, foi utilizado 1 mL de água destilada para bitús e 4 mL para içás. Uma alíquota de 150 µL da suspensão celular foi plaqueada em meio ágar Mycosel (Difco™). As placas foram incubadas a 25 °C por três semanas, até o aparecimento de colônias fúngicas negras.

Enriquecimento com glicose 50 % (THANH et al., 2013)

Primeiramente foi realizada uma etapa de enriquecimento na qual os corpos das formigas foram transferidos para tubos contendo 10 mL de meio de enriquecimento (50 % glicose e 0.5 % extrato de levedura) e incubados a 28 °C por dez dias. Para o isolamento, os tubos foram agitados e 150 µL do meio de cultura líquido foram espalhados em placas contendo malte-glicose ágar (1 % malte, 1 % glicose, 2 % ágar e cloranfenicol 150 $\mu g.mL^{-1}$) e incubadas a 28 °C por dez dias.

Cultivo sem nitrogênio (THANH, 2006)

Os corpos das formigas foram sonicados em água destilada por 15 min. Devido a diferença de tamanho, foi utilizado 1 mL de água destilada para bitús e 4 mL para içás. Uma alíquota de 150 μL da suspensão celular foi plaqueada em meio de cultura sem nitrogênio (l^{-1}: 20 g glicose, 20 g ágar, 0.85 g KH_2PO_4, 0.15 g K_2HPO_4, 0.5 g $MgSO_4.7H_2O$, 0.1 g NaCl, 0.1 g $CaCl_2.6H_2O$, 0.5 mg H_3BO_3, 0.04 mg $CuSO_4.H_2O$, 0.1 mg KI, 0.2 mg $FeCl_3.6H_2O$, 0.4 mg $MnSO_4.H_2O$, 0.2 mg $Na_2MoO_4.2H_2O$, 0.4 mg $ZnSO_4.7H_2O$) descrito por Thanh (2006). As placas foram incubadas a 25 °C por três semanas.

2.3.3 Preservação dos fungos isolados

Todos os fungos isolados estão mantidos na coleção de culturas da Central de Recursos Microbianos (CRM - UNESP, Rio Claro) em *ultrafreezer* (-80 °C), mediante técnica de criopreservação (HOFFMANN, 1989).

2.3.4 Extração de DNA dos fungos

Para a identificação dos fungos isolados, técnicas moleculares foram empregadas. Para a extração de DNA, a metodologia descrita por Sampaio et al. (2001) foi utilizada como referência e modificada. Os fungos foram primeiramente cultivados em placas com o meio MA (ágar malte 2 %) por 7 a 14 dias a 25 °C. Cerca de 1 cm^2 do micélio foi transferido para microtubos contendo 500 μL de tampão de lise (50 mmol Tris l^{-1}; 250 mmol de NaCl l^{-1}; 50 mmol EDTA l^{-1}; 0.3 %, w/v, SDS; pH 8) e o equivalente a 100 μL de micro-esferas de vidro (Sigma G9268) esterilizadas. Os microtubos foram agitados por 4 min seguindo-se incubação por 1 hora a 65 °C (duas repetições). Após, os microtubos foram centrifugados por 15 min a 13 000 rpm e a fase aquosa contendo o DNA em suspensão foi transferida para novos microtubos. O DNA bruto foi armazenado a -20 °C e diluído 1:100 no momento de uso.

2.3.5 Amplificação (PCR)

A metodologia descrita foi modificada de Gerrits van den Ende e de Hoog (1999). Para cada amostra de DNA foi preparada uma solução contendo: 2.5 μL de tampão de PCR, 8.3 μL de água ultra pura esterilizada, 2 μL de cada primer (10 pmol), 4 μL dNTP (1 mM) e 0.2 μL Taq polimerase (1 U/μL). Dessa solução, 20 μL foram distribuídos em cada microtubo

e, em seguida, 5 μL de amostra de DNA bruto (diluído 1:100) foram adicionados. Para fungos filamentosos a região *Internal Transcribed Spacer* (ITS) foi amplificada com os primers ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990). Para isolados leveduriformes a região D1/D2 LSU foi amplificada com os primers NL1 e NL4 (KURTZMAN; ROBNETT, 1998). As condições de amplificação seguiram os protocolos de Duarte et al. (2014) para fungos filamentosos e PAGNOCCA et al. (2008) para leveduras. Os produtos amplificados foram então purificados com o kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

2.3.6 Sequenciamento

Para cada amostra foi preparado um *mix* contendo: 0.3 μL de Big Dye, 2 μL de Save Money, 0.32 μL de cada conjunto de primer utilizado na amplificação na concentração de 10 pmol e 5.06 μL de água ultra pura esterilizada. Desse mix, 9 μL foram distribuídos em microtubos e, em seguida, 2 μL do DNA amplificado e quantificado (10 – 20 ng) foram adicionados. A reação de sequenciamento foi realizada em termociclador com os seguintes passos: 95 °C por 1 min, 30 ciclos de 95 °C por 15 s e 50 °C por 45 s, e extensão final de 60 °C por 4 min. As sequências *forward* e *reverse* foram geradas no sequenciador ABI 3130 Genetic Analyser (Life Technologies). As sequências geradas foram editadas e alinhadas no programa BioEdit v7.1.3 (HALL, 1999) para a geração de contigs (alinhamento das sequências *foward* e *reverse*). Os dados obtidos foram comparados com a base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) - GenBank.

2.3.7 Análises morfológicas do inventário de fungos negros

Os meios MA, PDA, CMA (*corn meal agar*, Himedia®), OA (*oatmeal agar*, Himedia®) e YMA (*yeast malt agar*; 0.3 % extrato de malte, 0.3 % extrato de levedura, 0.5 % peptona, 1 % D-glicose e 2 % ágar) foram utilizados para os estudos morfológicos e, após inoculados, foram incubados a 25 °C por 7 a 21 dias. As observações microscópicas foram realizadas a partir da técnica de microcultivo (CROUS et al., 2009b) com o meio CMA e incubação a 25 °C por 7 a 21 dias. As lâminas foram produzidas com água destilada e as micrografias obtidas a partir de microscópio com contraste de fase (DM 750, Leica; software Leica Application Suite v. 3.5.0, Leica). Todas as linhagens analisadas encontram-se depositadas na CRM - UNESP, Rio Claro.

2.4 Resultados e Discussão

No total, 173 linhagens de fungos negros foram isoladas, sendo 79 obtidas em 2012 (Tabela 1) e 94 em 2013 (Tabela 2). As técnicas de isolamento que possibilitaram a obtenção do maior número de fungos negros foram a flotação em óleo mineral (n=58, coleta de 2012) e o cultivo em meio sem nitrogênio (n=33, coleta de 2013). Coincidentemente, a partir desses dois métodos também foi obtida a maior diversidade de fungos negros (n=21 táxons para ambos). Como os fungos negros são oligotróficos (SATOW et al., 2008), a baixa concentração de nutrientes e a ausência de nitrogênio no meio de cultivo utilizado devem ter inibido os fungos não oligotróficos, e consequentemente, os fungos negros foram favorecidos.

Com relação às fontes de origem, o maior número de fungos negros foi obtido a partir de bitús dos ninhos #2 (n=33) e #5 (n=32) de *Atta capiguara*. Os estudos da biodiversidade fúngica em bitús são escassos e, apesar de ser uma casta efêmera, pode haver transferência de micro-organismos deles para as içás durante o acasalamento. Arcuri e colaboradores (2014) isolaram 25 espécies de leveduras do integumento de bitús de *Atta sexdens rubropilosa*, incluindo o fungo melanizado *Aureobasidium pullulans*.

Foram realizadas 37 tentativas de isolamento a partir de pellets, utilizando a técnica de flotação em óleo mineral, e apenas quatro isolados foram obtidos. Pagnocca et al. (2008) fizeram 144 tentativas de isolamento a partir de pellets extraídos de içás antes do início do vôo nupcial e também obtiveram quatro linhagens de fungos filamentosos. Esses resultados sugerem que os pellets fúngicos contendo o fungo mutualista são cuidadosamente preparados pelas içás visando diminuir o número de fungos contaminantes.

A identificação dos isolados provenientes dos pellets revelou que dois pertencem ao gênero *Cladosporium*, um pertence à família Teratosphaeriaceae (98 % de similaridade com a espécie nova *Xenopenidiella nigrescens*) e outro isolado foi identificado como *Pyriculariopsis parasitica*. Pagnocca et al. (2008) e Duarte et al. (2014) também relataram a presença de *Cladosporium* nos pellets, sugerindo que esses fungos possam ser transmitidos verticalmente para o jardim da nova colônia. De fato, vários autores têm demonstrado que espécies de *Cladosporium* estão frequentemente presentes nos jardins de fungo mutualista em formigas Attini (RODRIGUES et al., 2011; REIS et al., 2015). Além disso, o capítulo 2 desta tese mostra a presença marcante de *Cladosporium* no integumento de formigas cortadeiras de folhas aladas através de método independente de cultivo.

De maneira geral, 27 táxons de fungos negros foram identificados (Tabela 3). O gênero *Cladosporium* foi o mais prevalente em todas as amostras (n=103), perfazendo 60.2 %

dos fungos isolados. As sequencias ITS obtidas para esses isolados são insuficientes para delimitar as espécies de *Cladosporium* e por isso os isolados foram agrupados. Bensch et al. (2012) recomenda uma abordagem polifásica, abrangendo análises morfológicas e uma gama de marcadores filogenéticos, para identificar as espécies pertencentes a este gênero.

Alguns táxons apresentaram seletividade com relação ao método de isolamento empregado. Por exemplo, *Aureobasidium* e *Exophiala* foram isolados apenas na caminhada em meio PDA e flotação em óleo mineral, respectivamente.

A análise comparativa das sequências ITS obtidas com os dados do GenBank revelou que diversos fungos apresentaram baixa similaridade com espécies conhecidas, como *Catenulostroma* sp. (93 %), *Cladophialophora* sp. (92 %), *Dactylaria* sp. (95 %), *Strelitziana* sp. (92 %), *Toxicocladosporium* sp. (93 %) e *Trichomerium* sp. (92 %). Em estudos futuros esses dados devem ser melhor analisados para determinar a possível existência de novas espécies.

Tabela 1 – Número de formigas e isolados fúngicos obtidos na coleta de 2012.

	Ninhos amostrados					
	içás de *A. capiguara* #2		bitús de *A. capiguara* #2		bitús de *A. laevigata*	
	n°	fungos negros	n°	fungos negros	n°	fungos negros
Métodos de isolamento						
Flotação em óleo mineral (corpos)	30	20	30	25	21	13
Flotação em óleo mineral (pellets)	37	4				
Imersão em meio MYP	nr	nr	33	3	23	3
Caminhada em meio PDA	30	3	30	5	21	3
Total de fungos negros isolados		27		33		19

nr: não realizado

Tabela 2 – Número de formigas e isolados fúngicos obtidos na coleta de 2013.

	Ninhos amostrados							
	içás de *A. capiguara* #3		bitús de *A. capiguara* #3		içás de *A.capiguara* #5		bitús de *A.capiguara* #5	
	n°	fungos negros	n°	fungos negros	n°	fungos negros	n°	fungos negros
Métodos de isolamento								
Flotação em óleo mineral corpos	19	9	20	3	10	6	20	3
Cultivo em meio ágar Mycosel	10	0	21	0	10	0	20	8
Enriquecimento com glicose 50 %	9	7	27	15	6	7	4	3
Cultivo sem nitrogênio	10	4	21	8	10	3	20	18
Total de fungos negros isolados		20		26		16		32

Tabela 3 – Identificação e abundância de fungos negros isolados de formigas cortadeiras de folhas aladas em 2012 e 2013.

(continua)

	Número de isolados								
	2012				2013				
	A. capiguara #2			*A. laevigata*	*A. capiguara* #3		*A. capiguara* #5		
Táxon	bitús	içás	pellet	bitús	bitús	içás	bitús	içás	**GenBank***
Ascomycota sp.				2^{a}					HQ607825, 97 %
Aureobasidium spp.	5^{d}	3^{d}		3^{d}			1^{g}		KC160578, 100 %
Catenulostroma hermanusense							1^{g}	1^{g}	JF499833, 93 %
Cercospora beticola							1^{g}		KF251146, 100 %
Cladophialophora sp.	3^{a}	4^{a}				2^{a}	2^{e}	1^{a}	EU137293, 92 %
Cladosporium-complex	$20^{a,c}$	15^{a}	2^{b}	$11^{a,c}$	$16^{a,f,g}$	$13^{a,f,g}$	$13^{a,f,g}$	$13^{a,f,g}$	-
Cochliobolus sativus				1^{a}					AB774148, 100 %
Coniothyrium sp.					1^{g}				DQ092505, 99 %
Dactylaria sp.					1^{a}		1^{e}		AY265338, 95 %
Dothideomycetes sp.								1^{g}	JQ905751, 97 %
Exophiala spinifera	2^{a}				1^{a}	5^{a}			AY156975, 100 %
Microsphaeropsis arundinis	1^{a}								EU664487, 99 %
Paraphaeosphaeria sp.					1^{g}				KC871040, 98 %
Penidiellopsis radicularis							2^{g}		KT833148, 100 %
Pyriculariopsis parasitica	1^{a}		1^{b}				1^{e}		AY265340, 97 %
Ramichloridium brasilianum					3^{g}		3^{e}		EU041797, 97 %

Tabela 3 – Identificação e abundância de fungos negros isolados de formigas cortadeiras de folhas aladas em 2012 e 2013.

(conclusão)

	Número de isolados								
	2012				2013				
	A. capiguara #2			*A. laevigata*	*A. capiguara* #3		*A. capiguara* #5		
Táxon	bitús	içás	pellet	bitús	bitús	içás	bitús	içás	**GenBank***
Sporothrix schenkii				1[c]					AB363791, 98 %
Strelitziana eucalypti				1[a]					HQ599596, 92%
Teratosphaeriaceae sp.			1[b]						KT833169, 98 %
Tetraploa sasicola	1[c]								KT270279, 99 %
Toxicocladosporium banksiae							1[g]		HQ599598, 97 %
Toxicocladosporium strelitziae							1[g]		NR111765, 93 %
Trichomerium foliicola		1[a]							JX313653, 92%
Xenopenidiella clavata							1[g]		KT833168, 100 %
Xenopenidiella formica					1[g]		2[g]		KT833165, 100 %
Xenopenidiella nigrescens							1[g]		KT833169, 100 %
Xenopenidiella tarda					2[f,g]		1[g]		KT833160, 100 %

* Número de acesso da sequencia homóloga no GenBank e similaridade (%).
- Devido a pouca diferenciação da região ITS, os isolados de *Cladosporium* foram agrupados no mesmo táxon.

Metodologias de isolamento: [(a)]flotação em óleo mineral (corpos); [(b)]flotação em óleo mineral (pellets); [(c)]imersão em meio MYP; [(d)]caminhada em meio PDA; [(e)]cultivo em meio ágar Mycosel; [(f)]enriquecimento com glicose 50 %; [(g)]cultivo sem nitrogênio.

2.5 Inventário de fungos negros presentes no integumento de formigas cortadeiras de folhas

Nossos dados e os existentes na literatura indicam um total de 74 táxons de fungos negros ascomicetos encontrados no integumento de formigas cortadeiras de folhas, os quais estão apresentados na Tabela 4. Embora não mencionado na tabela, as espécies *Aureobasidium pullulans* e *Kabatiella microsticta* foram observadas em bitús de *Atta sexdens rubropilosa* (ARCURI et al., 2014; Ana Paula M. Duarte, dados não publicados).

O trabalho de Mantovani (2013) analisou a diversidade de fungos em corpos de operárias de *Atta laevigata*, porém na metodologia utilizada as formigas foram esmagadas e, portanto, é incerto se os fungos encontrados estão aderidos ao integumento ou internos aos corpos. Apesar disso, os resultados desse estudo foram incluídos na revisão.

Alguns fungos, como *Cladosporium*, mostraram uma distribuição frequente no integumento das formigas cortadeiras de folhas, enquanto outros, como *Toxicocladosporium* e *Trichomerium*, foram encontrados poucas vezes ou apenas uma vez. Adicionalmente, 28 táxons (marcados na tabela 4 pelos números 2 e 6) foram observados por métodos independentes de cultivo.

As ordens com os maiores números de táxons de fungos negros encontrados foram Capnodiales (n=25) e Pleosporales (n=25). Capnodiales inclui em sua maioria fungos epífitas (FRANK et al., 2010), sapróbios e fitopatógenos (APTROOT, 2006; CROUS, 2009c). Igualmente, fungos da ordem Pleosporales podem ser sapróbios, epífitas, endofíticos e parasitas de plantas, fungos e insetos (KRUYS et al., 2006; TAO et al., 2008; ZHANG et al., 2012). A ecologia e características morfológicas dos principais táxons de fungos negros isolados do integumento de formigas cortadeiras de folhas são apresentadas após a Tabela 4.

Tabela 4 – Fungos negros presentes no integumento de formigas cortadeiras de folhas (+: presença).

(continua)

Fungos negros	Formigas-cortadeiras					
	Atta capiguara		*Atta laevigata*			
	Bitú	Içá	Bitú	Içá	Operária	Soldado
Ordem Capnodiales						
Catenulostroma hermanusense[1]	+	+				
Catenulostroma protearum[2]	+					
Cercospora beticola[1]	+					
Cercospora sp.[6]					+	
Cldosporium -complex[1,2,4,5,6,7]	+	+	+	+	+	+
Devriesia sp.[6]					+	
Mycosphaerella aurantia[6]					+	
Mycosphaerella heimii[2]	+	+				
Mycosphaerella konae[2]	+					
Penidiellopsis radicularis[3]	+	+				
Penidiellopsis ramosus[2,3]		+				
Pseudocercospora norchiensis[2]	+	+				
Pseudocercospora fuligena[2]		+				
Ramichloridium brasilianum[1,2]	+	+				
Simplicidiella nigra[3]		+				
Toxicocladosporium banksiae[1]	+					
Toxicocladosporium strelitziae[1]	+					
Toxicocladosporium sp.[6]					+	
Trichomerium foliicola[1]		+				
Xenopenidiella clavata[2,3]	+					
Xenopenidiella formica[3]	+	+	+			
Xenopenidiella inflata[3]			+			

Tabela 4 – Fungos negros presentes no integumento de formigas cortadeiras de folhas (+: presença).

(continuação)

Fungos negros	Formigas-cortadeiras					
	Atta capiguara		*Atta laevigata*			
	Bitú	Içá	Bitú	Içá	Operária	Soldado
Ordem Capnodiales						
Xenopenidiella laevigata[2,3]				+		
Xenopenidiella nigrescens[2,3]	+					
Xenopenidiella tarda[2,3]	+					
Ordem Chaetothyriales						
Cladophialophora chaetospira[7]	+					
Cladophialophora mycetomatis[7]			+			
Cladophialophora spp.[1,4,8]	+	+	+	+		
Exophiala bergeri[7]				+		
Exophiala dermatitidis[8]		+		+		
Exophiala spinifera[1,2,7,8,12]	+	+				
Exophiala sp.[8]		+				
Phialophora attae[9]		+	+	+		
Phialophora capiguarae[9]		+				
Strelitziana africana[2]	+	+				
Strelitziana eucalypti[1]			+			
Ordem Dothideales						
Aureobasidium spp. [1,2,4]	+	+	+	+		

Tabela 4 – Fungos negros presentes no integumento de formigas cortadeiras de folhas (+: presença).

(continuação)

Fungos negros	Formigas-cortadeiras					
	Atta capiguara		*Atta laevigata*			
	Bitú	Içá	Bitú	Içá	Operária	Soldado
Ordem Helotiales						
Cadophora malorum[2]		+				
Dactylaria sp.[1]	+					
Trimmatostroma sp.[6]	+	+			+	
Ordem Magnaporthales						
Pyriculariopsis parasitica[1,2]	+	+				
Pyricularia sp.[6]					+	
Ordem Ophiostomatales						
Sporothrix schenckii[1]			+			
Ordem Pleosporales						
Alternaria alternata[2,6]			+		+	
Alternaria arborescens[5]						+
Bipolaris sorokiniana[5]						+
Bipolaris eleusines[5]						+
Bipolaris cynodontis[2]			+			
Bipolaris zeae[5]						+
Cochliobolus cynodontis[2]			+			
Cochliobolus lunatus[12]		+				
Cochliobolus geniculatus[7]	+			+		
Cochliobolus sativus[1,6]			+		+	

Tabela 4 – Fungos negros presentes no integumento de formigas cortadeiras de folhas (+: presença).

(continuação)

Fungos negros	Formigas-cortadeiras					
	Atta capiguara		*Atta laevigata*			
	Bitú	Içá	Bitú	Içá	Operária	Soldado
Ordem Pleosporales						
Cochliobolus sp.[2]			+			
Coniothyrium sp.[1]	+					
Curvularia trifolii[2,5]	+					+
Epicoccum spp.[2,6]	+		+		+	
Leptosphaeria sp.[2]	+					
Microsphaeropsis arundinis[1]	+					
Paraconiothyrium sp.[6]					+	
Paraphaeosphaeria michotii[5]						+
Paraphaeosphaeria sp.[1,5,6]	+				+	+
Periconia spp.[2,6]	+				+	
Phaeosphaeria sp.[2,6]	+					
Phaeosphaeriopsis sp.[2]	+		+			
Teratosphaeria considenianae[2]			+			
Tetraploa sasicola[1]	+					
Torula herbarum[2]	+					
Ordem Sordariales						
Chaetomium funicola[2]			+			
Chaetomium sp.[2]			+			
Ordem Trichosphaeriales						
Nigrospora sp.[6]					+	

Tabela 4 – Fungos negros presentes no integumento de formigas cortadeiras de folhas (+: presença).

(conclusão)

Fungos negros	Formigas-cortadeiras					
	Atta capiguara		*Atta laevigata*			
	Bitú	Içá	Bitú	Içá	Operária	Soldado
Ordem Venturiales						
Ochroconis sexualis[10]		+				
Ochroconis globalis[11]		+				
Verruconis verruculosa[7]			+			

[(1)]Capítulo 1 da tese; [(2)]Capítulo 2 da tese; [(3)]Capítulo 3 da tese; [(4)]Pagnocca et al. (2008); [(5)]Guedes et al. (2012); [(6)]Mantovani (2013); [(7)]Baron (2014); [(8)]Duarte et al. (2014); [(9)]Attili-Angelis et al. (2014); [(10)]Samerpitak et al. (2014); [(11)]Samerpitak et al. (2015); [(12)]Duarte (2013).

Táxons de fungos negros detalhados quanto à ecologia e morfologia.

Características ecológicas e morfológicas dos táxons isolados de formigas cortadeiras de folhas

ORDEM CAPNODIALES

Catenulostroma

Família Teratosphaeriaceae

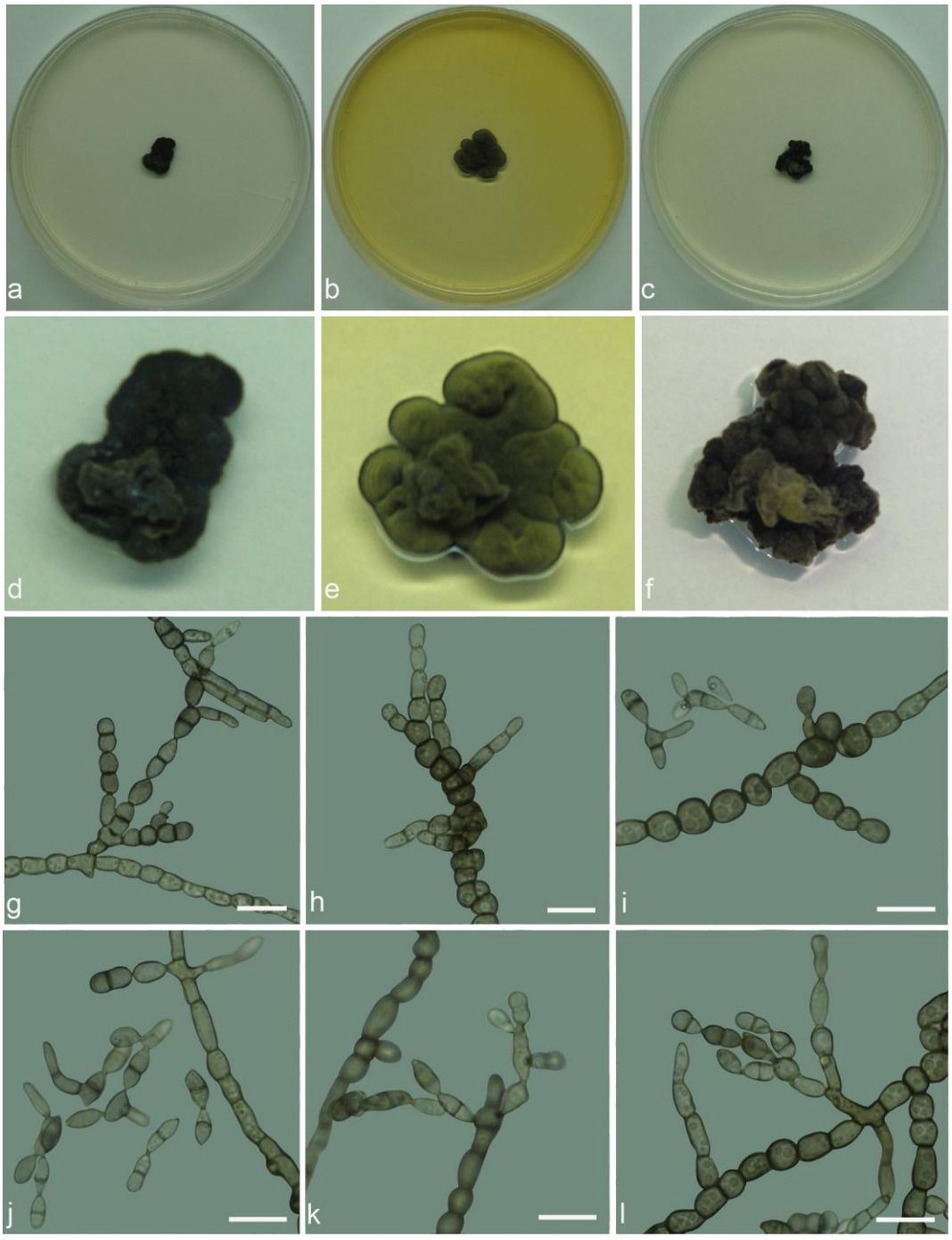
Habitats e distribuição: Recentemente descrito (CROUS et al., 2007a), esse gênero apresenta espécies que foram separadas do gênero *Trimmatostroma.* Até o momento compreende nove espécies (CROUS et al., 2007a; ABBAS et al., 2013) encontradas em materiais vegetais (CROUS et al., 2007a), ambientes domésticos (NONNENMANN et al., 2012), topo de altas montanhas (SELBMANN et al., 2014) e infecções cutâneas (CAMPOLINA et al., 2009). A espécie *C. hermanusense*, exceto pelo relato em formigas cortadeiras de folhas, foi encontrada até o momento apenas em associação com plantas (CROUS; GROENEWALD, 2011).

Patogenicidade: O gênero *Catenulostroma* compreende espécies potencialmente fitopatógenas (CROUS et al., 2013) e oportunistas em humanos, como um dos agentes da cromoblastomicose *C. chromoblastomycosum* (CAMPOLINA et al., 2009).

Morfologia (Figura 2): Fungos anamorfos. A linhagem DOC 337, isolada do integumento de içá de *Atta capiguara* e pertencente ao gênero *Catenulostroma*, foi analisada. Características das colônias após dez dias a 25 °C: Crescimento lento em todos os meios. Colônia em CMA com 10 mm diam, lisa e plana com coloração verde oliva escuro. Colônia em MA com 14 mm diam, lisa, superfície levemente pregueada, margem crenada e coloração verde oliva. Colônia em PDA com 12 mm diam, superfície pregueada com porção central elevada, margem irregular e coloração verde oliva escuro. Microcultivo em meio CMA após dez dias a 25 °C: Conidíoforos reduzidos a células conidiogênicas intercalares ou integradas ao final da hifa. Conídios em cadeias ramificadas ou simples, elipsóides, 0–1 septos, 6–10 × 3–4 µm. Teleomorfo desconhecido.

Nota: A baixa similaridade da sequência ITS com o GenBank (93 %, n° de acesso JF499833) sugere que as linhagens isoladas das formigas (n=2) representem uma nova espécie.

Figura 1. *Catenulostroma* sp. Colônias com dez dias de crescimento a 25 °C nos meios: CMA (a,d), MA (b,e) e PDA (c,f). g–l. conidióforos e conídios. Barra de escala = 10 µm.



Fonte: Elaborado pela autora.

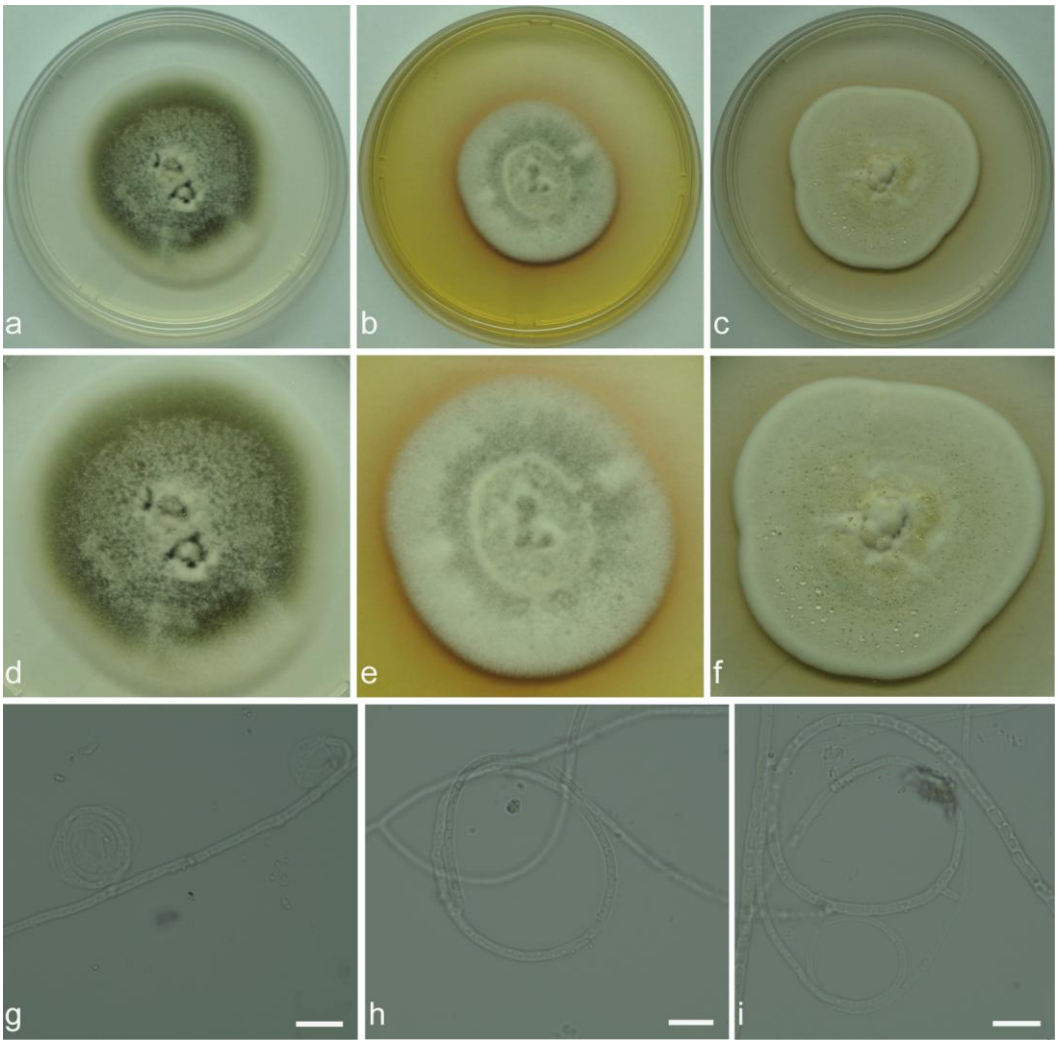
Cercospora
Família Mycosphaerellaceae

Habitats e distribuição: Fungos do gênero *Cercospora* estão entre os mais prevalentes e destrutivos fitopatógenos (GOODWIN et al., 2001), ocorrendo em uma grande variedade de hospedeiros como cereais, plantas ornamentais, árvores e gramíneas (BAKHSHI et al., 2015).

Patogenicidade: Exemplos de fungos fitopatógenos do gênero *Cercospora* são *C. beticola* em beterraba (WEILAND; KOCH, 2004), *C. zonata* em feijão-fava (KIMBER; PAULL, 2011), *C. zeae-maydis* e *C. zeina* em milho (CROUS et al., 2006).

Morfologia (Figura 3): Fungos anamorfos. A linhagem DOC 342, isolada do integumento de bitú de *Atta capiguara* e identificada como *C. beticola*, foi analisada. Características das colônias após 14 dias a 25 °C: Colônia em CMA com 54 mm diam, plana, cotonosa, verde oliva com micélio aéreo e margem hialina. A melanização é mais evidente no meio CMA. Colônia em MA com 42 mm diam, plana, cotonosa, micélio branco para cinza claro e produção de pigmento avermelhado no meio de cultivo. Colônia em PDA com 51 mm diam, plana, lisa para velutinosa, branca com grande produção de exudatos translúcidos. Micélio estéril no meio CMA após 14 dias a 25 °C. Teleomorfo desconhecido.

Figura 2. *Cercospora beticola*. Colônias com 14 dias de crescimento a 25 °C nos meios: CMA (a), MA (b) e PDA (c). g–i. hifa vegetativa com enrolamento. Barra de escala = 10 µm.



Fonte: Elaborado pela autora.

Cladosporium-complex
Família Cladosporiaceae

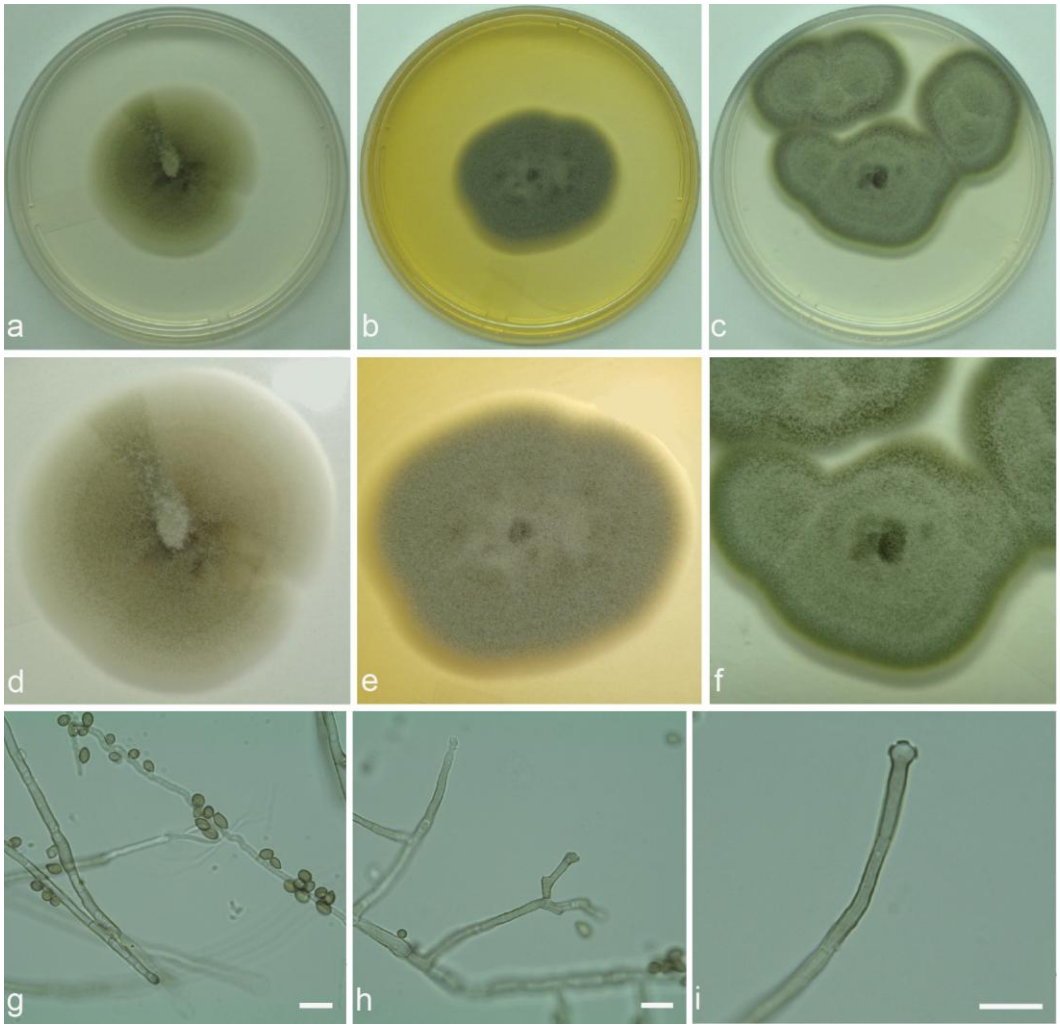
Habitats e distribuição: *Cladosporium* é um dos maiores e mais heterogêneos gênero de hifomicetos, compreendendo mais de 772 nomes (DUGAN et al., 2004; BENSCH et al., 2015). Espécies de *Cladosporium* são cosmopolitas, bem distribuídas e incluem fungos endofíticos, fungícolas, sapróbios, patógenos de plantas e humanos (CROUS et al., 2009b). Além disso, fungos desse gênero são frequentemente isolados em ambientes domésticos como banheiros (LIAN; de HOOG, 2010), escova dental, esponja de banho e borracha de geladeira (MELATI, 2015).

Patogenicidade: Dentre as espécies fitopatógenas, *C. herbarum* e *C. cladosporioides* são frequentemente encontrados em associação com cereais e frutas (CROUS et al., 2009b). Raramente são encontrados como oportunistas em humanos (de HOOG et al., 2001) e ocasionam principalmente doenças respiratórias (YAZICIOGLU et al. 2004).

Morfologia (Figura 4): Fungos anamorfos. A linhagem DOC 401, isolada do integumento de bitú de *Atta capiguara* e pertencente ao gênero *Cladosporium*, foi analisada. Características das colônias após dez dias a 25 °C: Colônia em CMA com 45 mm diam, plana e velutinosa com coloração verde oliva. Colônia em MA com 44 mm diam, plana e velutinosa com coloração verde acinzentada. Colônia em PDA com 32 mm diam, plana, velutinosa, verde acinzentada com margem mais escura. Microcultivo em meio CMA após dez dias a 25 °C: Conidíoforos micronematosos, eretos ou pouco flexuosos, ramificados, 60.5–68 × 1.5–2.5 µm. As cicatrizes após a liberação dos conídios são proeminentes e escuras. Ramoconídios asseptados, 11–32 × 3–4.5 µm. Conídios limoniformes para globosos, asseptados, 3.5–5 × 2.5–4 µm. Teleomorfos pertencem ao gênero *Davidiella* (BRAUN et al., 2003).

Nota: A baixa resolução de árvores filogenéticas baseadas apenas em sequências ITS é insuficiente para delimitar as diferentes espécies do gênero *Cladosporium* (BENSCH et al., 2012, 2015) . Assim, todos os registros foram agrupados como *Cladosporium*-complex. De acordo com Bensch et al. (2015), o gene actina é o mais adequado para a resolução das espécies de *Cladosporium*.

Figura 3. *Cladosporium*-complex. Colônias com dez dias de crescimento a 25 °C nos meios: CMA (a,d), MA (b,e) e PDA (c,f). g–i. conídios e conidióforos. Barra de escala = 10 µm.



Fonte: Elaborado pela autora.

Penidiellopsis
Família Teratosphaeriaceae

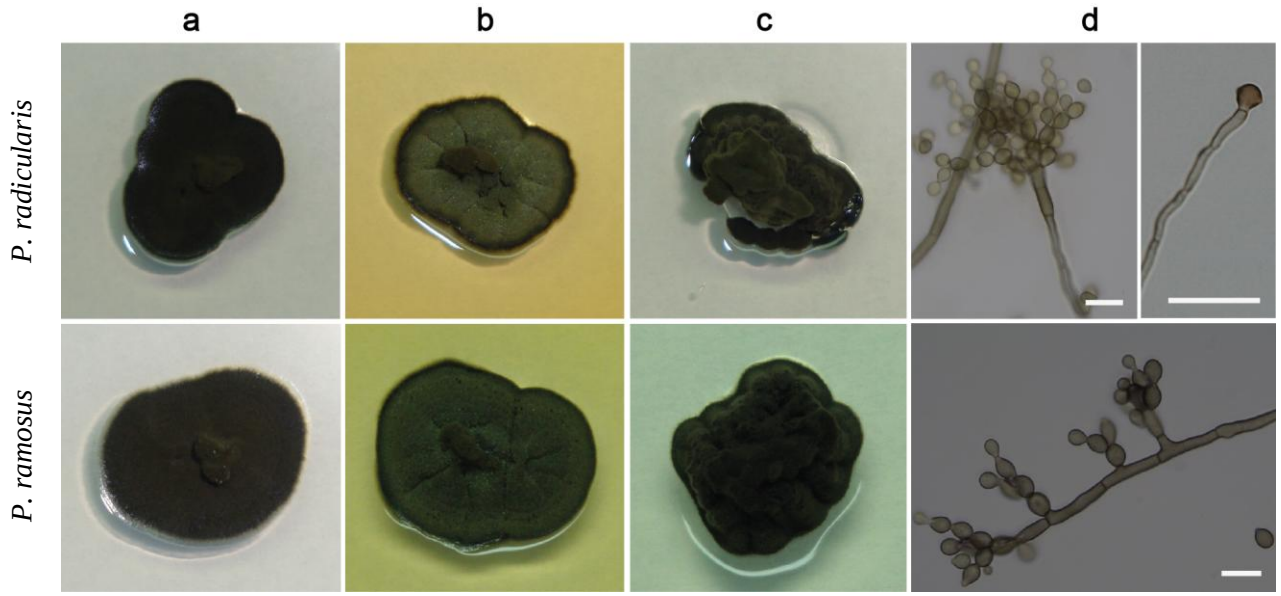
Habitats e distribuição: O gênero foi descrito recentemente (SANDOVAL-DENIS et al., 2016) a partir de uma infecção em unha. Possui apenas duas espécies conhecidas, *Penidiellopsis radiculares* e *P. ramosus*, ambas encontradas também no integumento de formigas cortadeiras de folhas (vide Capítulo 3).

Morfologia (Figura 1): Fungos anamorfos. Mais detalhes são apresentados no capítulo 3.

Penidiellopsis radicularis (linhagem AP 386, isolada do integumento de içá de *Atta capiguara* por Duarte et al. 2014) – Características das colônias após 21 dias a 25 °C: Colônia em CMA com 10 mm diam, plana com porção central velutinosa e coloração verde oliva escuro. Colônia em MA com 11.5 mm diam, verde acinzentada com micélio mais escuro no centro e margem, e superfície crenada. Colônia em PDA com 11 mm diam, pregueada com a porção central elevada e velutinosa, verde oliva escuro. Microcultivo em meio CMA após 21 dias a 25 °C: Conidióforos eretos, ramificados ou não, 25–53 × 3.5–4 µm. Conídios catenados em cadeias ramificadas, 0–1 septos, limoniformes, 4.5–6.5 × 3–4 µm. Clamidósporos terminais e intercalares. Teleomorfo desconhecido.

Penidiellopsis ramosus (linhagem AP 391, isolada do integumento de içá de *Atta capiguara* por Duarte et al. 2014) – Características das colônias após 21 dias a 25 °C: Colônia em CMA com 13 mm diam, plana com porção central velutinosa e coloração verde oliva escuro. Colônia em MA com 14 mm diam, verde acinzentada com micélio mais escuro no centro e margem, e superfície crenada. Colônia em PDA com 12 mm diam, pregueada com a porção central elevada e velutinosa, verde oliva escuro. Microcultivo em meio CMA após 21 dias a 25 °C: Conidióforos ascendentes para eretos, ramificados no ápice, 27–63.5 × 3–4 µm. Conídios catenados em cadeias ramificadas, asseptados, limoniformes para fusiformes, 4–7.5 × 3–4 µm. Clamidósporos não observados. Teleomorfo desconhecido.

Figura 4. Variações morfológicas em *Penidiellopsis*. Colônias com 21 dias de crescimento a 25 °C nos meios: CMA (a), MA (b) e PDA (c). d. conidióforos, conídios e clamidósporo. Barra de escala = 10 µm.



Fonte: Elaborado pela autora.

Ramichloridium

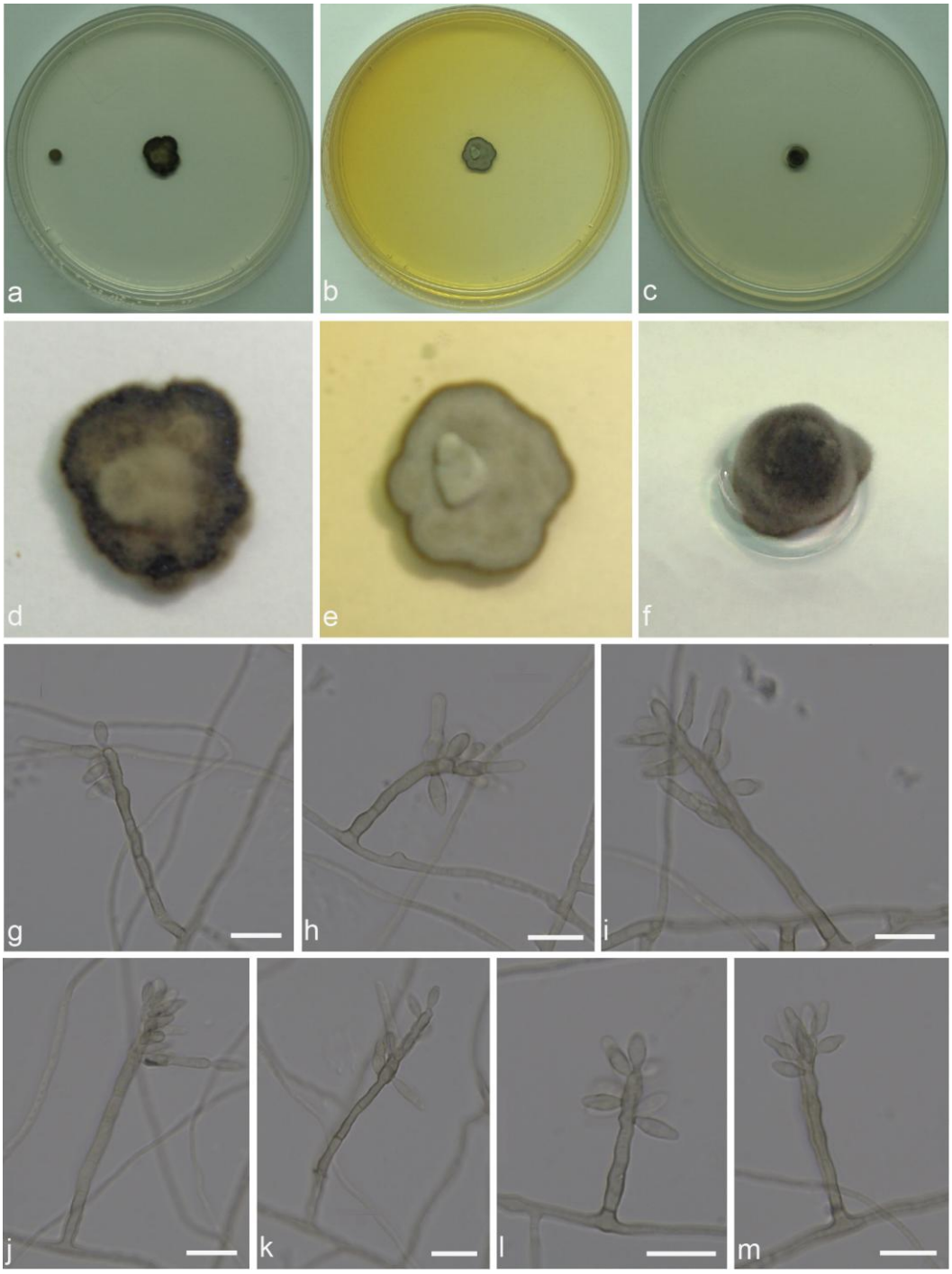
Família Mycosphaerellaceae

Habitats e distribuição: Espécies do gênero *Ramichloridium* formam um grupo anamórfico bastante heterogêneo cujos representantes podem ser sapróbios e patógenos de plantas e humanos (ARZANLOU et al., 2007). A espécie *R. brasilianum* foi recentemente descrita por Arzanlou et al. (2007) e até o momento foi encontrada apenas no solo da Reserva Ecológica de Juréia (SP) e no integumento de bitús e içás de *A. capiguara*. A patogenicidade dessa espécie ainda é desconhecida.

Morfologia (Figura 5): Fungos anamorfos. As linhagens DOC 287 e DOC 293, isoladas do integumento de bitú de *Atta capiguara* e pertencentes ao gênero *Ramichloridium*, foram analisadas. Características das colônias após 14 dias a 25 °C: Colônia em CMA com 12 mm diam, plana, velutinosa, coloração marrom claro com margem mais escura e levemente sinuada. Colônia em MA com 10 mm diam, plana, velutinosa, coloração cinza e margem levemente sinuada. Colônia em PDA com pouco crescimento, 7 mm diam, elevada e verde acinzentada. Microcultivo em meio CMA após 14 dias a 25 °C: Conidióforos não ramificados, eretos, crescimento simpodial, 21–54 × 1.5–2.5 µm. Conídios ampuliformes para fusiformes, 0–2 septos, 5–11 × 2–3 µm. Teleomorfo desconhecido.

Nota: A baixa similaridade da sequência ITS com o GenBank (97 %, n° de acesso EU041797), somado às diferenças morfológicas com *R. brasilianum*, descrita por Arzanlou et al. (2007), sugere que as linhagens isoladas das formigas (n=6) representem uma nova espécie.

Figura 5. *Ramichloridium* sp. Colônias com 14 dias de crescimento a 25 °C nos meios: CMA (a,d), MA (b,e) e PDA (c,f). g–m. conídios e conidióforos. Barra de escala = 10 µm.



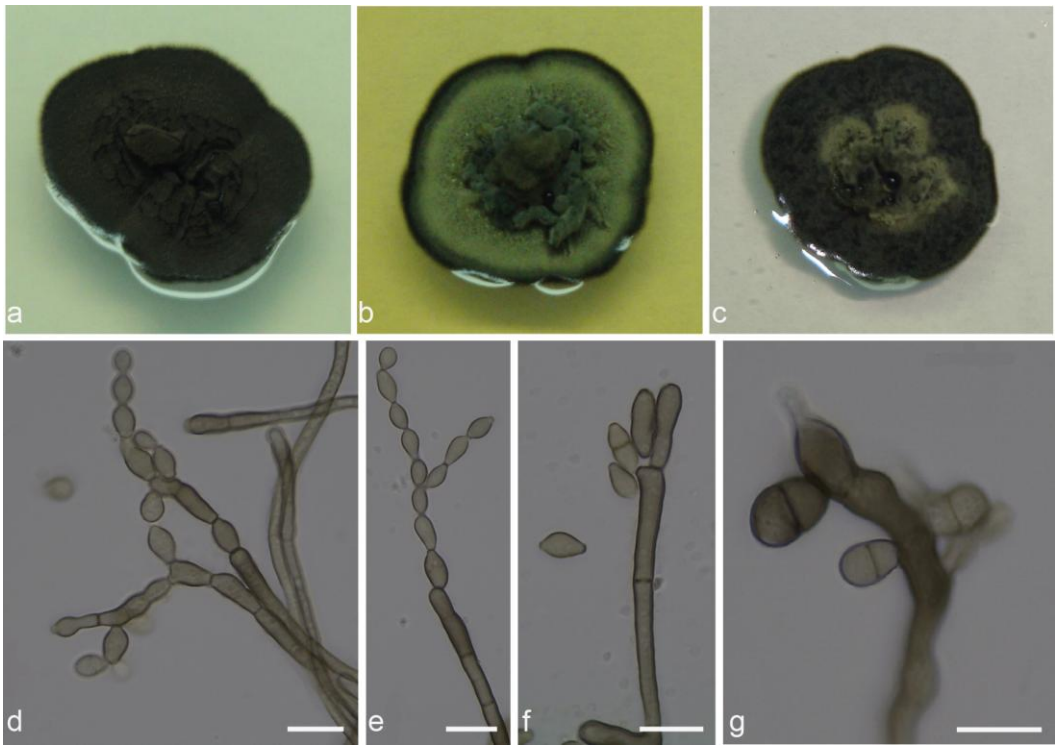
Fonte: Elaborado pela autora.

Simplicidiella
Família Teratosphaeriaceae

Habitats e distribuição: O gênero foi descrito recentemente (vide capítulo 3) e até o momento foi encontrado apenas no integumento de formigas cortadeiras de folhas, acomodando a espécie *S. nigra*.

Morfologia (Figura 6): Fungos anamorfos. A linhagem AP 416, isolada do integumento de içá de *Atta capiguara* por Duarte et al. (2014) e identificada como *S. nigra*, foi analisada. Características das colônias após 21 dias a 25 °C: Colônias em CMA com 14 mm diam, plana com porção central velutinosa, verde oliva escuro. Colônia em MA com 11 mm diam, plana com porção central velutinosa elevada, micélio verde oliva e margem escura. Colônia em PDA com 11 mm diam, porção central elevada com produção de exudato e margem escura. Microcultivo em meio CMA após 21 dias a 25 °C: Conidióforos eretos, solitários, pouco ramificados ou não ramificados, 27–47 × 3–3.5 µm. Conídios catenulados, 0–1 septos, lisos, elipsóides com hilo proeminente. Teleomorfo desconhecido. Mais detalhes são apresentados no capítulo 3.

Figura 6. *Simplicidiella nigra*. Colônias com 21 dias de crescimento a 25 °C nos meios: CMA (a), MA (b) e PDA (c). d–g. conidióforos e conídios. Barra de escala = 10 µm.



Fonte: Elaborado pela autora.

Toxicocladosporium
Família Cladosporiaceae

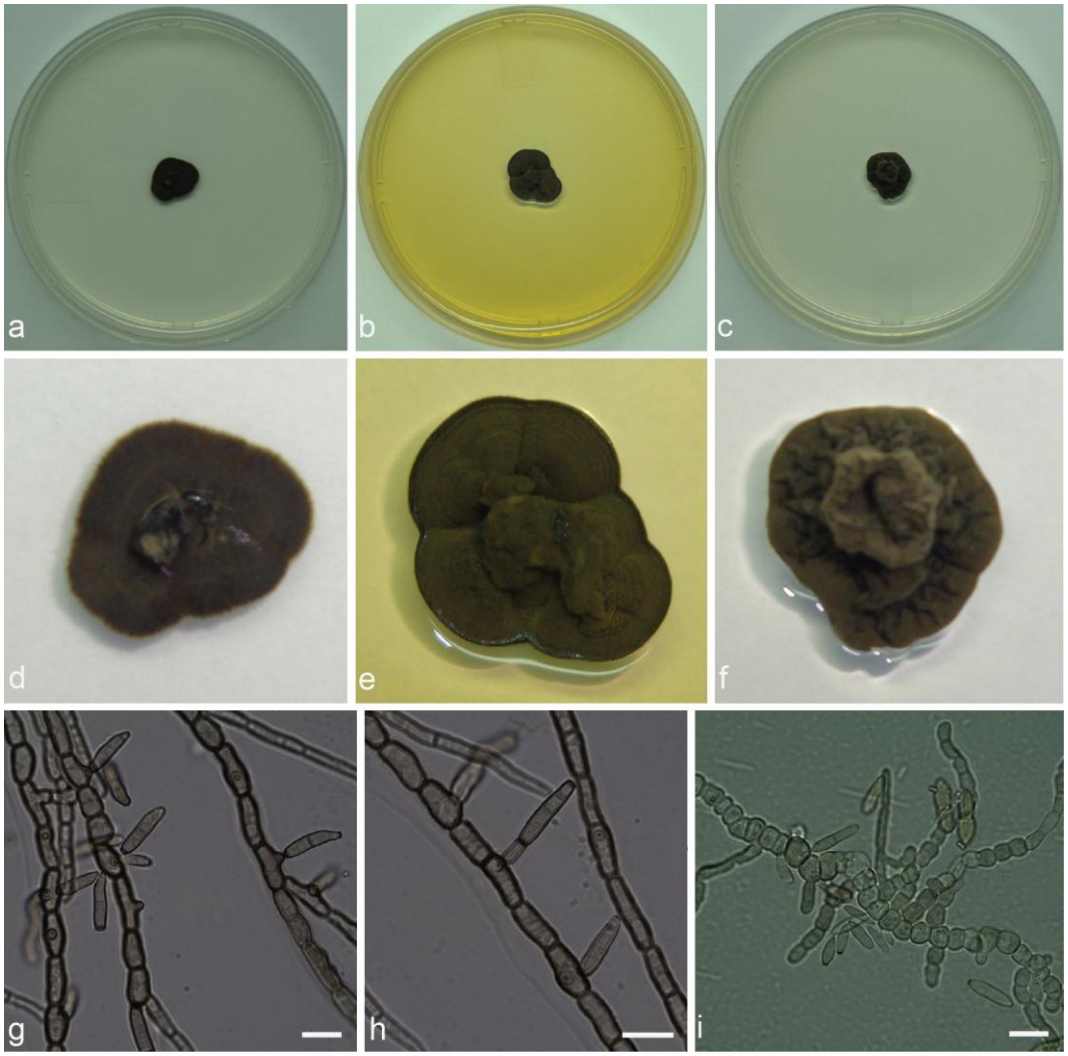
Habitats e distribuição: Fungos do gênero *Toxicocladosporium* ocorrem em diferentes habitats, como plantas (CROUS et al., 2009a), rochas vulcânicas (CONNELL; STAUDIGEL, 2013) e páginas de documentos históricos (MESQUITA et al., 2009).

Patogenicidade: Espécies como *T. banksiae* e *T. strelitziae* são fitopatógenos (CROUS et al., 2010, 2012). *Toxicocladosporium irritans* possui relatos de infecções em humanos (ZHANG et al., 2011; SANDOVAL-DENIS et al., 2015).

Morfologia (Figura 7): Fungos anamorfos. A linhagem DOC 344, isolada do integumento de bitú de *Atta capiguara* e pertencente ao gênero *Toxicocladosporium*, foi analisada. Características das colônias após 14 dias a 25 °C: Colônia em CMA com 14 mm diam, plana e lisa com coloração marrom escuro e produção de exudato translúcido. Colônia em MA com 16 mm diam, sulcada, pregueada na porção central e levemente elevada com coloração verde oliva. Colônia em PDA com 12 mm diam, porção central elevada e pregueada com coloração verde oliva. Microcultivo em meio CMA após 14 dias a 25 °C: Conidióforos reduzidos a células conidiogênicas. As cicatrizes após a liberação dos conídios são proeminentes, protuberantes e escuras. Conídios fusiformes, 0–1 septos, lisos, 7.5–20 × 2.5–4.5 µm. Teleomorfo desconhecido.

Nota: A baixa similaridade da sequência ITS com o GenBank (97 %, n° de acesso HQ599598), somado às diferenças morfológicas com *T. banksiae*, descrita por Crous et al. (2010), sugere que a linhagem isolada das formigas represente uma nova espécie.

Figura 7. *Toxicocladosporium* sp. Colônias com 14 dias de crescimento a 25 °C nos meios: CMA (a,d), MA (b,e) e PDA (c,f). g–i. células conidiogênicas e conídios. Barra de escala = 10 µm.



Fonte: Elaborado pela autora.

Xenopenidiella
Família Teratosphaeriaceae

Habitats e distribuição: Gênero recentemente descrito (QUAEDVLIEG et al., 2014) e muito pouco estudado. A descrição do gênero foi realizada com apenas um isolado sapróbio em serrapilheira e a espécie *X. rigidophora* foi proposta. O capítulo 3 dessa tese descreve outras seis espécies desse gênero, todas obtidas a partir do integumento de formigas cortadeiras de folhas.

Morfologia (Figura 8): Fungos anamorfos. Mais detalhes são apresentados no capítulo 3.

Xenopenidiella clavata (linhagem DOC 354, isolada do integumento de bitú de *Atta capiguara*) – Características das colônias após 21 dias a 25 °C: Colônia em CMA com 10 mm diam, plana com região central velutinosa e coloração verde oliva escuro. Colônia em MA com 11 mm diam, região central velutinosa levemente elevada com micélio verde e margem escura. Colônia em PDA com 10 mm diam, plana e velutinosa com coloração verde oliva escuro para marrom. Microcultivo em meio CMA após 21 dias a 25 °C: Conidióforos reduzidos a células conidiogênicas provenientes diretamente da hifa. Conídios 1–2 septados, clavados com ápice obtuso e base truncada, 8–15.5 × 3–4 µm. Teleomorfo desconhecido.

Xenopenidiella formica (linhagem AP 380, isolada do integumento de içá de *Atta capiguara* por Duarte et al. 2014) – Características das colônias após 21 dias a 25 °C: Colônia em CMA com 12 mm diam, plana e velutinosa com coloração verde oliva escuro. Colônia em MA com 12.5 mm diam, plana, região central velutinosa com micélio verde e margem escura. Colônia em PDA com 11 mm diam, região central velutinosa e elevada com coloração verde oliva. Microcultivo em meio CMA após 21 dias a 25 °C: Conidióforos eretos, solitários, pouco ramificados, 28.5–75 × 2–3.5 µm. Conídios com um septo, clavados com ápice obtuso e base truncada, 7–12 × 2.5–4 µm. Teleomorfo desconhecido.

Xenopenidiella inflata (linhagem 87N; isolada do integumento de bitú de *Atta laevigata* por Baron, 2014) – Características das colônias após 21 dias a 25 °C: Colônia em CMA com 12.5 mm diam, micélio velutinoso escuro e porção central elevada. Colônia em MA com 12 mm diam, velutinosa e sulcada com micélio verde acinzentado e margem escura. Colônia em PDA com 12.5 mm diam, região central elevada e esverdeada com margem escura e sulcada.

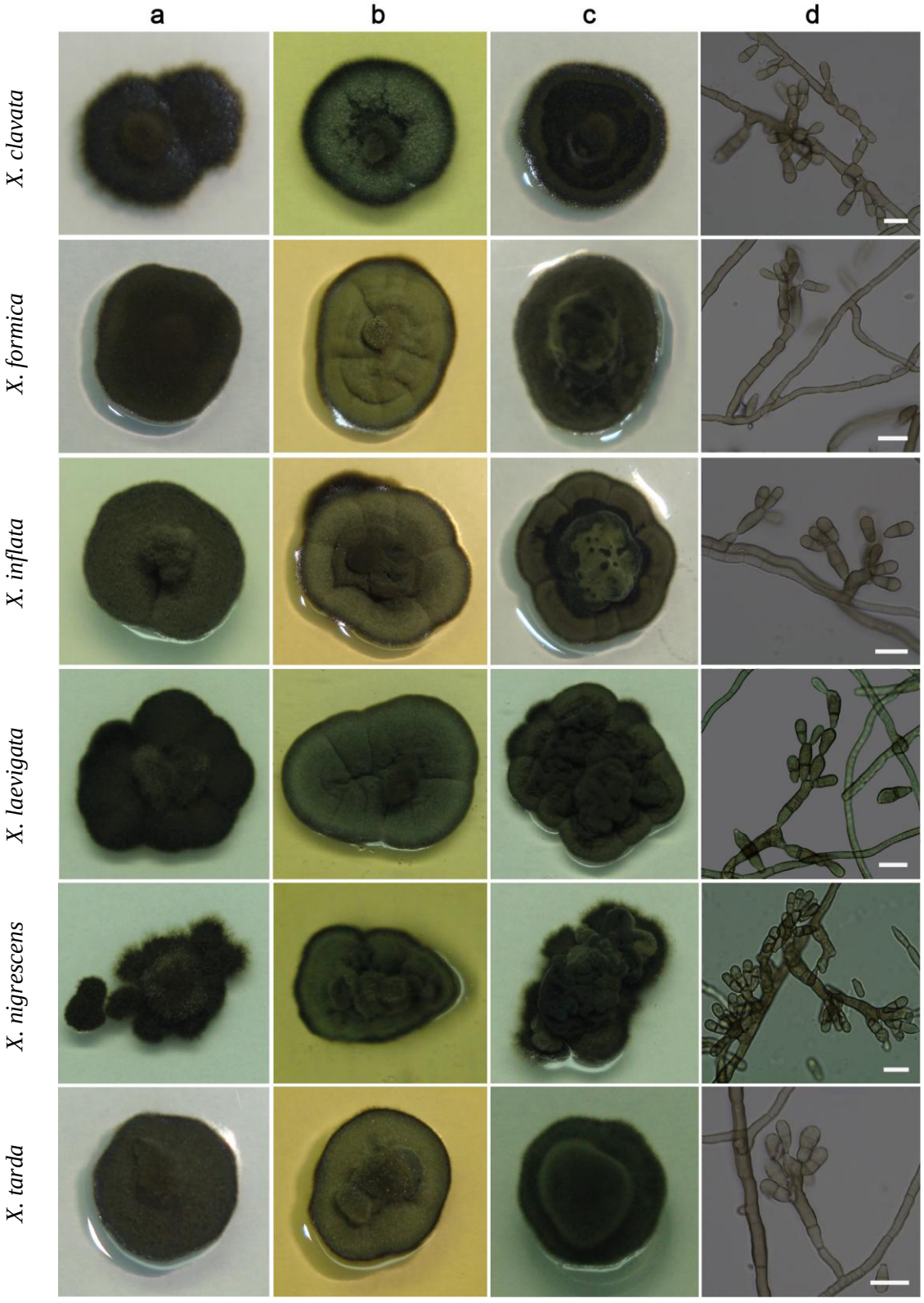
Microcultivo em meio CMA após 21 dias a 25 °C: Conidióforos reduzidos a células conidiogênicas. Conídios com um septo, clavados, constritos no septo, 7.5–10 × 3–4 µm. Teleomorfo desconhecido.

Xenopenidiella laevigata (linhagem 89N; isolada do integumento de içá de *Atta laevigata* por Baron, 2014) – Características das colônias após 21 dias a 25 °C: Colônia em CMA com 18 mm diam, micélio escuro velutinoso e porção central aérea. Colônia em MA com 19 mm diam, velutinosa e sulcada com micélio verde acinzentado e margem escura. Colônia em PDA com 18 mm diam, região central elevada e velutinosa. Microcultivo em meio CMA após 21 dias a 25 °C: Conidióforos lisos para finamente verrucosos, eretos com paredes espessas, 10–64 × 2–4.5 µm. Conídios com um septo, clavados, constritos no septo, 9.5–17.5 × 3–5 µm. Teleomorfo desconhecido.

Xenopenidiella nigrescens (linhagem DOC 356, isolada do integumento de bitú de *Atta capiguara*) – Características das colônias após 21 dias a 25 °C: Colônia em CMA com 14 mm diam, plana, velutinosa, porção central elevada e coloração verde oliva escuro. Colônia em MA com 13 mm diam, velutinosa e levemente pregueada com porção central elevada e micélio verde oliva. Colônia em PDA com 13 mm diam, altamente pregueada, com porção central elevada e coloração verde oliva escuro. Microcultivo em meio CMA após 21 dias a 25 °C: Conidióforos lisos para finamente verrucosos, eretos com paredes espessas, 7–79 × 3.5–4.5 µm. Conídios com um septo, clavados, constritos no septo, 9–13 × 3.5–4 µm. Teleomorfo desconhecido.

Xenopenidiella tarda (linhagem DOC 343, isolada do integumento de bitú de *Atta capiguara*) – Características das colônias após 21 dias a 25 °C: Colônia em CMA com 9 mm diam, plana e velutinosa com coloração verde oliva escuro. Colônia em MA com 9 mm diam, plana, porção central velutinosa e aérea, micélio verde oliva e margem escura. Colônia em PDA com 9 mm diam, porção central elevada verde acinzentada com margem escura. Microcultivo em meio CMA após 21 dias a 25 °C: Conidióforos ascendentes para eretos, solitários, pouco ramificados, 5.5–51 × 3–4 µm. Conídios com um septo, clavados, constritos no septo, 8–11.5 × 3–5 µm. Teleomorfo desconhecido.

Figura 8. Variações morfológicas de seis espécies de *Xenopenidiella*. Colônias com 21 dias de crescimento a 25 °C nos meios: CMA (a), MA (b) e PDA (c). d. conidióforos e conídios. Barra de escala = 10 µm.



Fonte: Elaborado pela autora.

ORDEM CHAETOTHYRIALES

Cladophialophora

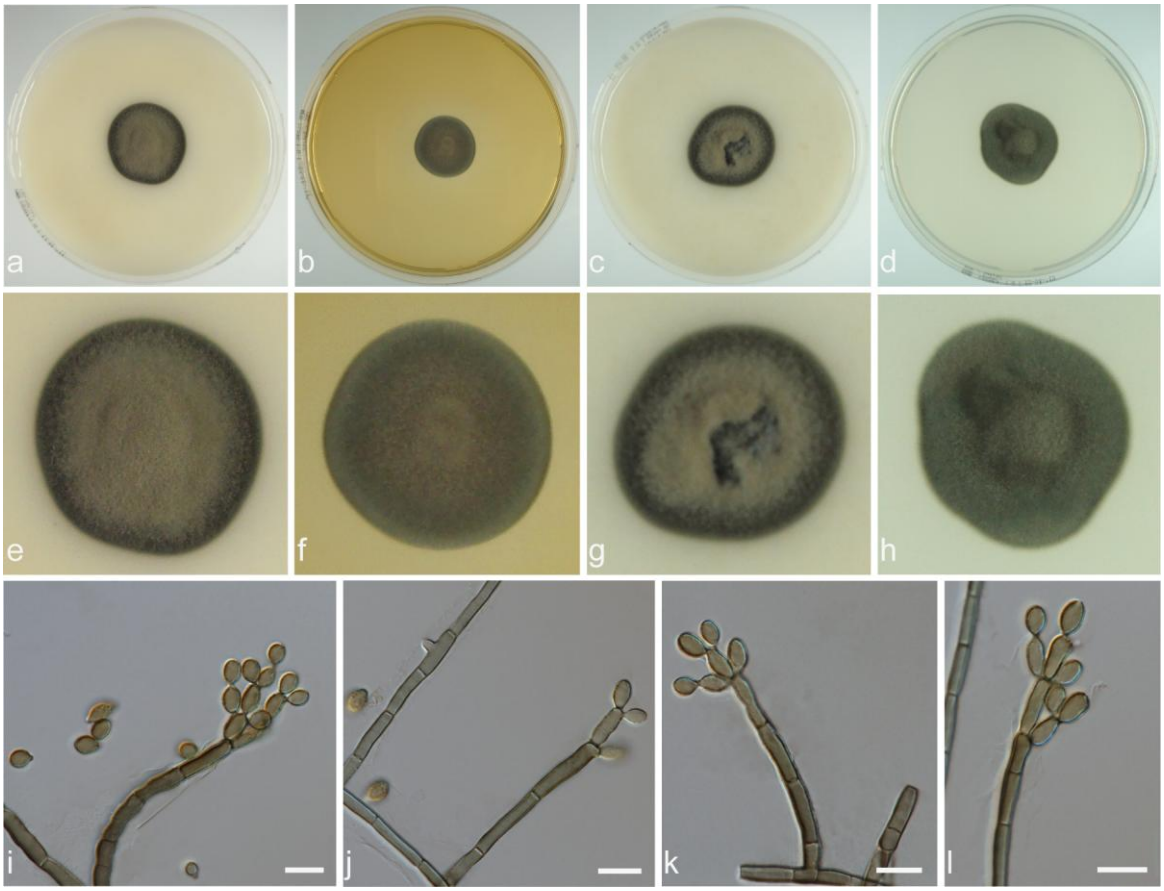
Família Herpotrichiellaceae

Habitats e distribuição: No ambiente, algumas espécies de *Cladophialophora* podem ser encontradas em associação com plantas (CROUS et al., 2007b), como *C. chaetospira* (BADALI et al., 2008), e túneis de diversas espécies de formigas (VOGLMAYR et al., 2011). Porém, são detectados com maior freqüência em casos clínicos de infecções (BADALI et al., 2008). Além disso, esses fungos estão presentes em ambientes contaminados com substâncias tóxicas; *C. psammophila* pode ser isolada de solos poluídos com benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX) (BADALI et al., 2011).

Patogenicidade: *C.hostae* e *C. proteae* são exemplos de fitopatógenos encontrados nesse gênero (CROUS et al., 2007b). Além disso, são frequentes em doenças humanas, desde infecções cutâneas até cerebrais (LI; de HOOG, 2009; de HOOG et al., 2007; BADALI et al., 2008). Dentre as espécies mais virulentas estão *C. bantiana* e *C. modesta* (HORRÉ; de HOOG, 1999; KANTARCIOGLU; de HOOG, 2004). A espécie *C. mycetomatis*, também encontrada no integumento de bitú de *A. laevigata* por Baron (2014), foi isolada e descrita a partir de um micetoma humano (BADALI et al., 2008). Todos isolados de *Cladophialophora* encontrados por Duarte et al. (2014) no integumento de formigas cortadeiras de folhas (n=12) representam novas espécies, cujo potencial patogênico ainda é desconhecido.

Morfologia (Figura 9): Fungos anamorfos. A linhagem AP 320, isolada do integumento de içá de *Atta laevigata* e identificada por Duarte et al. (2014) como *Cladophialophora* sp., foi analisada. Características das colônias após 14 dias a 25 °C: Colônia em CMA com 25 mm diam, plana, velutinosa, verde acinzentada com margem escura bem definida. Colônia em MA com 20 mm diam, plana e velutinosa com coloração acinzentada. Colônia em OA com 28 mm diam, plana, velutinosa, região central verde oliva e margem escura. Colônia em PDA com 27 mm diam, plana e velutinosa com coloração verde acinzentada. Microcultivo em meio CMA após 14 dias a 25 °C: Conidióforos semi-macronematosos, septados, ascendentes para eretos, 20–28 × 1.5–2 µm e terminais com ramoconídios 0–1 septados, 3.5–5.5 × 1.5–2 µm. Conídios asseptados, catenulados, limoniformes ou fusiformes, 3–5 × 2–3 µm. Teleomorfo desconhecido.

Figura 9. *Cladophialophora* sp. Colônias com 14 dias de crescimento a 25 °C nos meios: CMA (a,e), MA (b,f), AO (c,g) e PDA (d,h). i–l. conidióforo e conídios. Barra de escala = 10 µm.



Fonte: Elaborado pela autora.

Exophiala
Família Herpotrichiellaceae

Habitats e distribuição: *Exophiala* é um dos principais gêneros de leveduras negras e é conhecido principalmente por seu caráter patogênico. No ambiente, esses fungos podem ocorrer em água (tanto de torneira quanto de garrafa), solos, plantas e madeira em decomposição (SAMSON et al., 2010). Além disso, são frequentemente isolados em ambientes domésticos como banheiros (SUDHADHAM et al., 2008) e lava-louças (ZALAR et al., 2011). Algumas espécies, como *E. bergeri* e *E. xenobiotica*, possuem a habilidade de degradar hidrocarbonetos (de HOOG et al., 2006; SEYEDMOUSAVI et al., 2011).

Patogenicidade: Os fungos do gênero *Exophiala* são em sua maioria potenciais oportunistas ou patógenos (de HOOG et al., 2011). As espécies patogênicas mais relevantes são *E. dermatitidis* (SUDHADHAM et al., 2008), *E. spinifera* (de HOOG et al., 2003) e *E. asiatica* (LI et al., 2009). A pigmentação da parede celular e a capacidade de crescer a 37–40 °C são considerados importantes fatores de virulência nesse grupo. Embora menos conhecidas, algumas espécies deste gênero, como *E. capensis, E. encephalarti* e *E. placitae* (CROUS et al., 2007c; CROUS; GROENEWALD, 2010, 2011), são também potenciais fitopatógenos. Os isolados de *Exophiala* sp. encontrados por Duarte et al. (2014) no integumento de formigas cortadeiras de folhas (n=3) representam uma nova espécie cujo potencial patogênico ainda é desconhecido.

Morfologia (Figura 10): Fungos anamorfos e em sua maioria dimórficos, cujos teleomorfos pertencem ao gênero *Capronia* (de HOOG et al., 2001). Foram analisadas quatro espécies distintas:

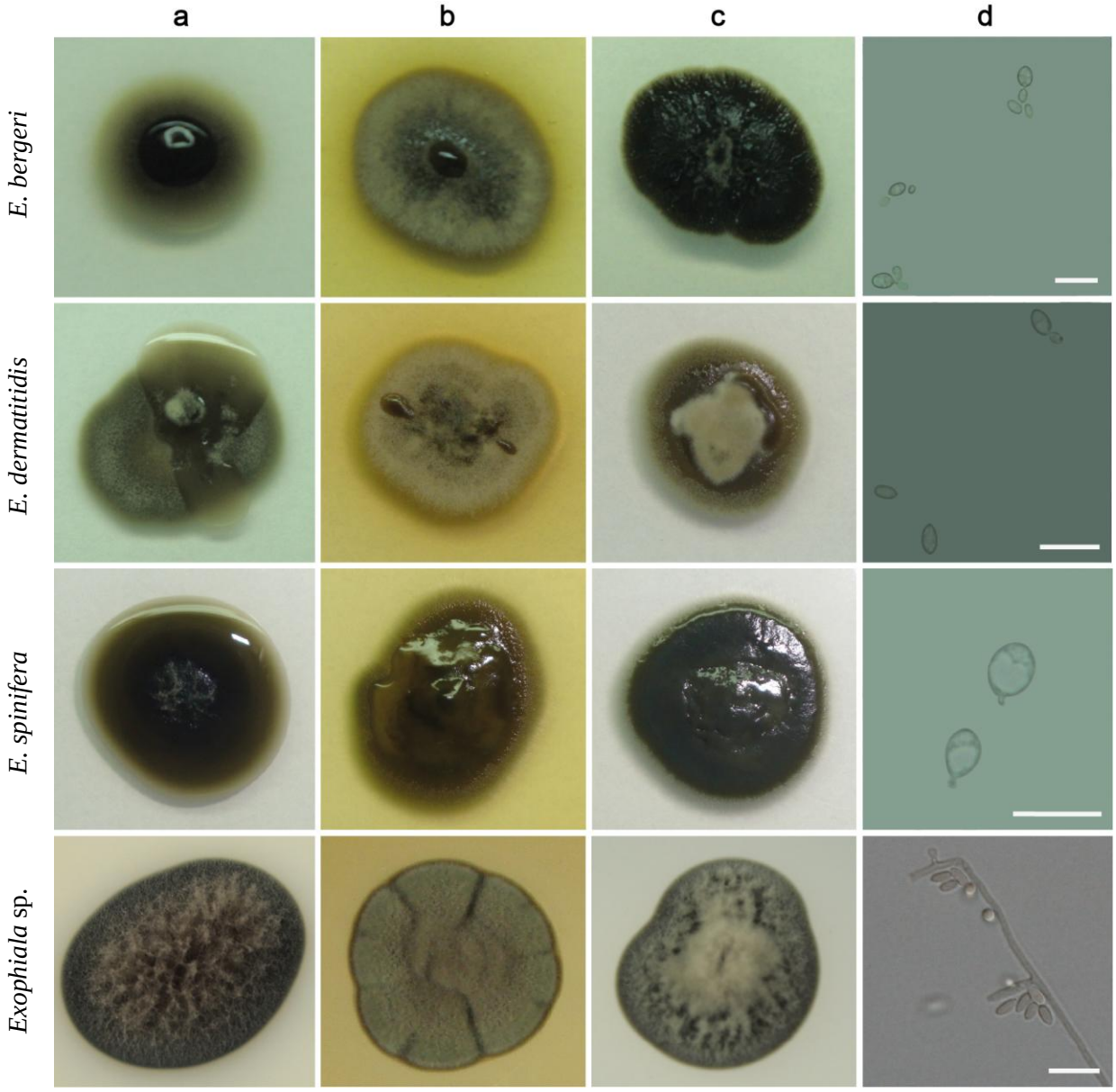
Exophiala bergeri (64N; isolada do integumento de içá de *Atta laevigata* e identificada por Baron et al. 2014) – Características das colônias após 14 dias a 25 °C: Colônia em CMA com 10 mm diam, dimórfica, plana, região central leveduriforme de aspecto mucoso e coloração escura, região periférica filamentosa com coloração marrom clara. Colônia em MA com 15 mm diam, plana e velutinosa com coloração marrom claro. Colônia em PDA com 13 mm diam, plana e velutinosa com coloração escura. Microscopia em meio CMA após 14 dias a 25 °C: Células ovóides com brotamento único, 3–8 × 2.5–4.5 µm.

Exophiala dermatitidis (AP 426; isolada de pellet de *Atta laevigata* e identificada por Duarte et al., 2014) – Características das colônias após dez dias a 25 °C: Colônia em CMA com 16 mm diam, dimórfica, plana, marrom claro, região leveduriforme de aspecto mucoso. Colônia em MA com 14 mm diam, plana e velutinosa com coloração acinzentada. Colônia em PDA com 12 mm diam, plana, dimórfica, região central filamentosa com coloração verde acinzentada, região periférica leveduriforme com coloração marrom. Microscopia em meio CMA após dez dias a 25 °C: Células elipsóides com brotamento único, 3.5–4.5 × 1.5–3 µm.

Exophiala spinifera (AP 128; isolada do integumento de içá de *Atta capiaguara* e identificada por Duarte, 2013) – Características das colônias após dez dias a 25 °C: Colônia em CMA com 18 mm diam, leveduriforme com aspecto mucoso e coloração escura. Colônia em MA com 17 mm diam, leveduriforme com coloração marrom clara. Colônia em PDA com 15 mm diam, leveduriforme com coloração escura. Não foi observada fase filamentosa nessa linhagem. Microscopia em meio CMA após dez dias a 25 °C: Células elipsóides ou globosas com brotamento único e cicatriz protuberante, 5.5–7 × 3.5–4.5 µm.

Exophiala sp. (AP 322; isolada do integumento de içá de *Atta capiguara* e identificada por Duarte et al., 2014) – Características das colônias após 14 dias a 25 °C: Colônia em CMA com 26 mm diam, lanosa, região central aérea elevada, marrom acinzentada com bordas escuras. Colônia em MA com 21 mm diam, plana, sulcada, velutinosa e verde acinzentada. Colônia em PDA com 20 mm diam, plana e velutinosa com coloração verde acinzentada. Não foi observada fase leveduriforme nessa linhagem. Microcultivo em meio CMA após 14 dias a 25 °C: Fiálides solitárias e fixadas diretamente nas hifas. Colarete conspícuo e ligeiramente mais escuro que o resto da fiálide. Conídios elipsóides, 3–4 × 2–2.5 µm.

Figura 10. Variações morfológicas de quatro espécies de *Exophiala*. Colônias nos meios: CMA (a), MA (b) e PDA (c). d. células germinativas e conídios. Barra de escala = 10 µm.



Fonte: Elaborado pela autora.

Phialophora
Família Herpotrichiellaceae

Habitats e distribuição: A maioria das espécies de *Phialophora* são sapróbias em solo, madeira e outros materiais vegetais (ZHUANG et al., 2010). Apesar disso, isolados de *Phialophora* têm sido encontrados em ambientes extremos como pó de mármore em cemitérios (CARETTA et al., 2006) e em geleiras da Antártica (GUNDE-CIMERMAN et al., 2005). Duas espécies novas de *Phialophora*, *P. attae* e *P. capiguarae*, foram descritas recentemente (ATTILI-ANGELIS et al., 2014) e encontradas até o momento apenas no integumento de formigas cortadeiras de folhas.

Patogenicidade: Espécies como *P. gregata*, são fitopatógenos especializados (GAMS, 2000), ocasionando doenças em culturas de soja. A patogenicidade em humanos é conhecida apenas para algumas espécies, como *P. verrucosa* (PARK et al., 2005; TONG et al., 2013). A patogenicidade das espécies novas encontradas em formigas ainda é desconhecida.

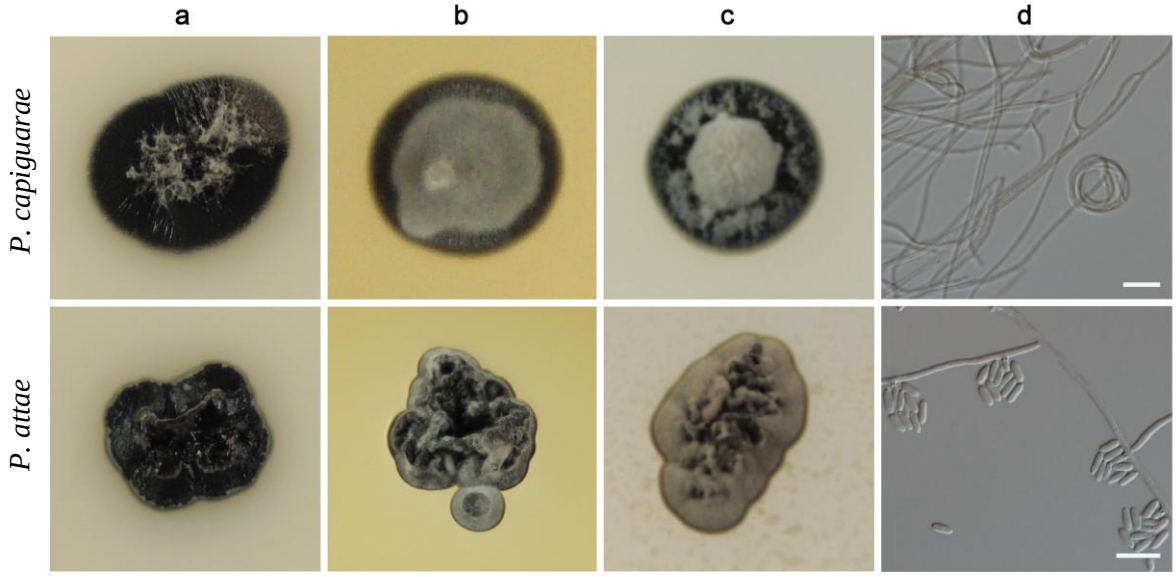
Morfologia (Figura 11): Fungos anamorfos. As linhagens AP 462 (*P. attae*), isolada do integumento de bitú de *Atta laevigata*, e AP 376 (*P. capiguarae*), isolada do integumento de içá de *Atta capiguara*, foram analisadas. Ambas linhagens foram isoladas por Duarte (2013) e identificadas por Attili-Angelis et al. (2014).

Phialophora attae – Características das colônias após 14 dias a 25 °C: Colônia em CMA com 10 mm diam, porção central elevada e pregueada com coloração cinza escuro. Colônia em MA com 13 mm diam, velutinosa, porção central elevada e pregueada com coloração cinza e micélio aéreo cinza claro. Colônia em PDA com 12 mm diam, velutinosa, porção central elevada e pregueada com coloração verde acinzentada. Microcultivo em meio CMA após 14 dias a 25 °C: Fiálides solitárias e fixadas diretamente nas hifas. Colarete conspícuo, ligeiramente mais escuro que o resto da fiálide, ampuliforme. Conídios elipsóides, 1.5–4. × 0.5–1.5 μm. Teleomorfo desconhecido.

Phialophora capiguarae – Características das colônias após 14 dias a 25 °C: Colônia em CMA com 15 mm diam, plana, cinza escuro com região central tufada com colaração cinza claro. Colônia em MA com 12 mm diam, região central velutinosa e cinza com margem plana e escura. Colônia em PDA com 14 mm diam, região central velutinosa, tufada e cinza com

margem escura. Apesar de apresentar micélio estéril no meio CMA após 14 dias a 25 °C, o trabalho de Attili-Angelis et al. (2014) apresenta a descrição das estruturas assexuadas. Teleomorfo desconhecido.

Figura 11. Variações morfológicas de duas espécies de *Phialophora*. Colônias com 14 dias de crescimento a 25 °C nos meios: CMA (a), MA (b), e PDA (c). d. hifa vegetativa com enrolamento e conídios. Barra de escala = 10 µm.



Fonte: Elaborado pela autora.

ORDEM DOTHIDEALES

Aureobasidium

Família Dothioraceae

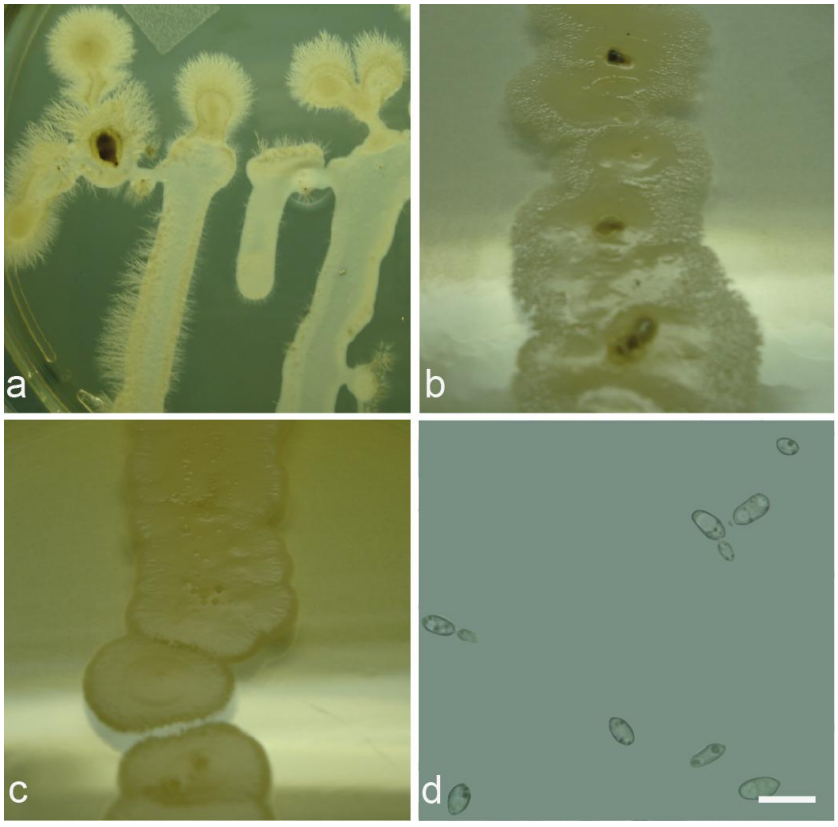
Habitats e distribuição: Fungos do gênero *Aureobasidium* são ubíquos e comumente isolados em ambientes osmóticos como em alimentos e folhas (de HOOG et al., 2001). Esses fungos também são encontrados em ambientes com condições inóspitas como águas hipersalinas (GUNDE-CIMERMAN et al., 2000) e poluídas (VADKERTIOVA et al., 1995), gelo glacial (BRANDA et al., 2010), lava-louças (ZALAR et al., 2011), superfície de pele (ZHANG et al., 2011) e tanques de combustível de avião (RAUCH et al., 2006). *Aureobasidium pullulans* é conhecido por sua importância biotecnológica devido à produção da pululana, um polissacarídeo com aplicação na medicina e indústria alimentícia (LEATHERS, 2003), por exemplo. Por outro lado, *A. leucospermi* foi descrito a partir de folhas de *Leucospermum* (CROUS et al., 2011). Isoladas com grande frequência no integumento de bitús de formigas cortadeiras de folhas, linhagens de *Aureobasidium* mostraram um perfil enzimático adequado à quebra do material vegetal nos jardins de fungos (ARCURI et al., 2014) e, portanto, supõe-se que possuam um papel significante na simbiose desses insetos.

Patogenicidade: *Aureobasidium* é considerado um fungo oportunista emergente, especialmente em pacientes imunocomprometidos (CHAN et al., 2011). Possui relatos em infecções pulmonares invasivas, pneumonia (McCULLERS et al., 2008), meningite (KUTLEŠA et al., 2012) e infecções cutâneas (JOSHI et al., 2010). Entretanto, as infecções ocasionadas por fungos do gênero *Aureobasidium* ocorrem, em sua maioria, por inoculações traumáticas (de HOOG et al., 2001).

Morfologia (Figura 12): Fungo anamorfo. A linhagem DOC 209, isolada do integumento de bitú de *Atta capiguara* e pertencente ao gênero *Aureobasidium*, foi analisada. Características das colônias após sete dias a 25 °C: Colônias nos meios MA e PDA com coloração creme e presença de filamentos nas extremidades. Colônia no meio YMA com coloração creme e aspecto cremoso. Microscopia em meio CMA após sete dias a 25 °C: Células elipsóides para fusiformes com brotamento único, 7–12 × 2.5–4.5 µm.

Nota: O sequenciamento da região D1/D2 LSU da linhagem DOC 209 revelou 100 % de similaridade com *A. pullulans* (GenBank FJ744598) e *A. leucospermi* (GenBank JN712553). Morfologicamente essa linhagem não apresenta semelhança com nenhuma das quatro variedades de *A. pullulans* existentes (ZALAR et al., 2008) nem com *A. leucospermi* (CROUS et al., 2011). Análises multilocus devem ser realizadas para definir a posição filogenética das linhagens obtidas do integumento das formigas.

Figura 12. *Aureobasidium* sp. Colônias com sete dias de crescimento a 25 °C nos meios: MA (a), PDA (b) e YMA (c). d. células germinativas após sete dias a 25 °C em CMA. Barra de escala = 10 µm.



Fonte: Elaborado pela autora

Kabatiella microsticta
Família Dothioraceae

Habitats e distribuição: Estudos sobre *Kabatiella microsticta* no ambiente são escassos e todos comprovam que a espécie está estritamente relacionada a plantas.

Patogenicidade: Fungo fitopatógeno (LEAHY; SCHUBERT, 1996; BAI et al., 2012; STRØMENG et al., 2015).

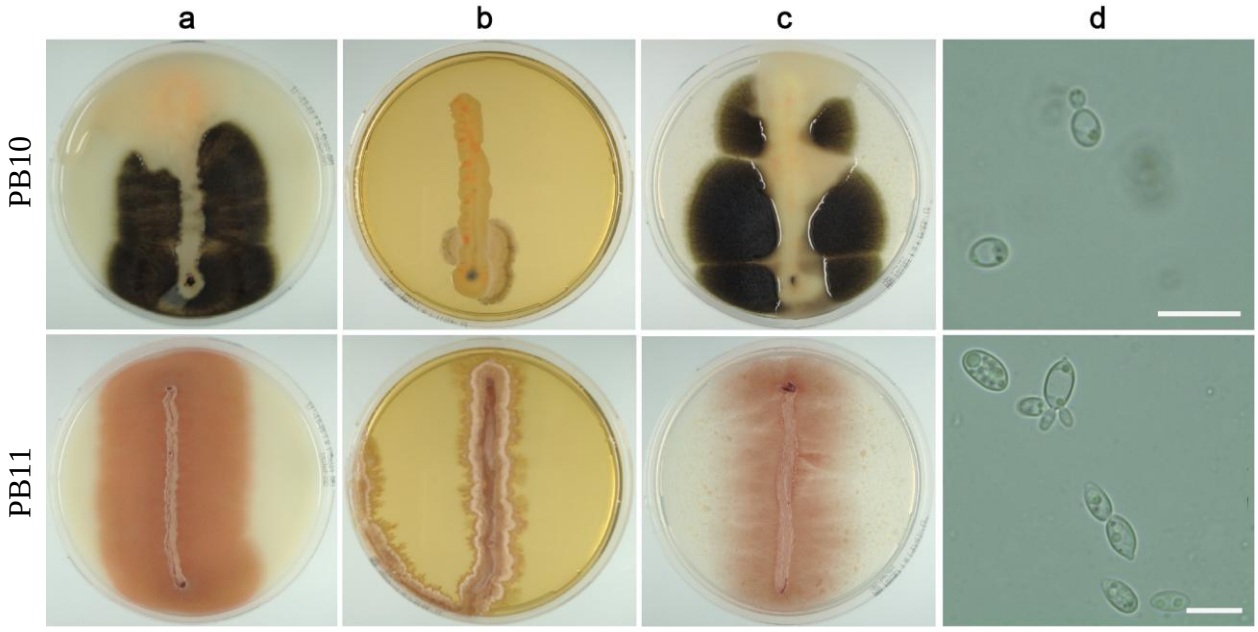
Morfologia (Figura 13): A espécie *K. microsticta* tem como basiônimo *Aureobasidium microstictum*. Fungo anamorfo. As linhagens PB 10 e PB 11, ambas isoladas do integumento de bitú de *Atta sexdens rubropilosa*, foram analisadas. A comparação das sequencias ITS no GenBank revelou que ambas são homólogas a *Kabatiella microsticta* EU167608 porém apresentam porcentagens de similaridade diferentes (PB 10 = 100 % e PB 11 = 98 %) e distinguem-se em 11 bases nucleotídicas.

Linhagem PB 10 – Características das colônias após 14 dias a 25 °C: Colônias nos meios CMA e PDA apresentam semelhante morfologia. Colônias dimórficas; região leveduriforme viscosa, efusa, coloração rosa para creme; região filamentosa concentrada perifericamente à região leveduriforme, micélio escuro e imerso no meio. Colônia em MA dimórfica, predominância da região leveduriforme com coloração rosa para creme, região filamentosa presente na extremidade da colônia com coloração marrom claro. Microscopia em meio CMA após sete dias a 25 °C: Células ovóides com brotamento único, 3.5–9 × 3–4 µm. Teleomorfo desconhecido.

Linhagem PB 11 – Características das colônias após 14 dias a 25 °C: Colônias nos meios CMA e PDA apresentam semelhante morfologia. Colônias dimórficas; região central leveduriforme com micélio periférico efuso e imerso no meio, coloração rosa claro que se torna negra após 21 dias. Colônia em MA dimórfica, com poucos filamentos laterais e coloração em várias tonalidades de rosa. Microscopia em meio CMA após sete dias a 25 °C: Células elipsóides com múltiplos brotamentos, 5–9.5 × 4–4.5 µm. Teleomorfo desconhecido.

Nota: As diferenças moleculares e morfológicas sugerem que as duas linhagens são espécies diferentes.

Figura 13. Variações morfológicas em *Kabatiella microsticta*. Colônias com 14 dias de crescimento a 25 °C nos meios: CMA (a), MA (b), e PDA (c). d. células germinativas após sete dias a 25 °C em CMA. Barra de escala = 10 µm.



Fonte: Elaborado pela autora.

ORDEM HELOTIALES

Dactylaria

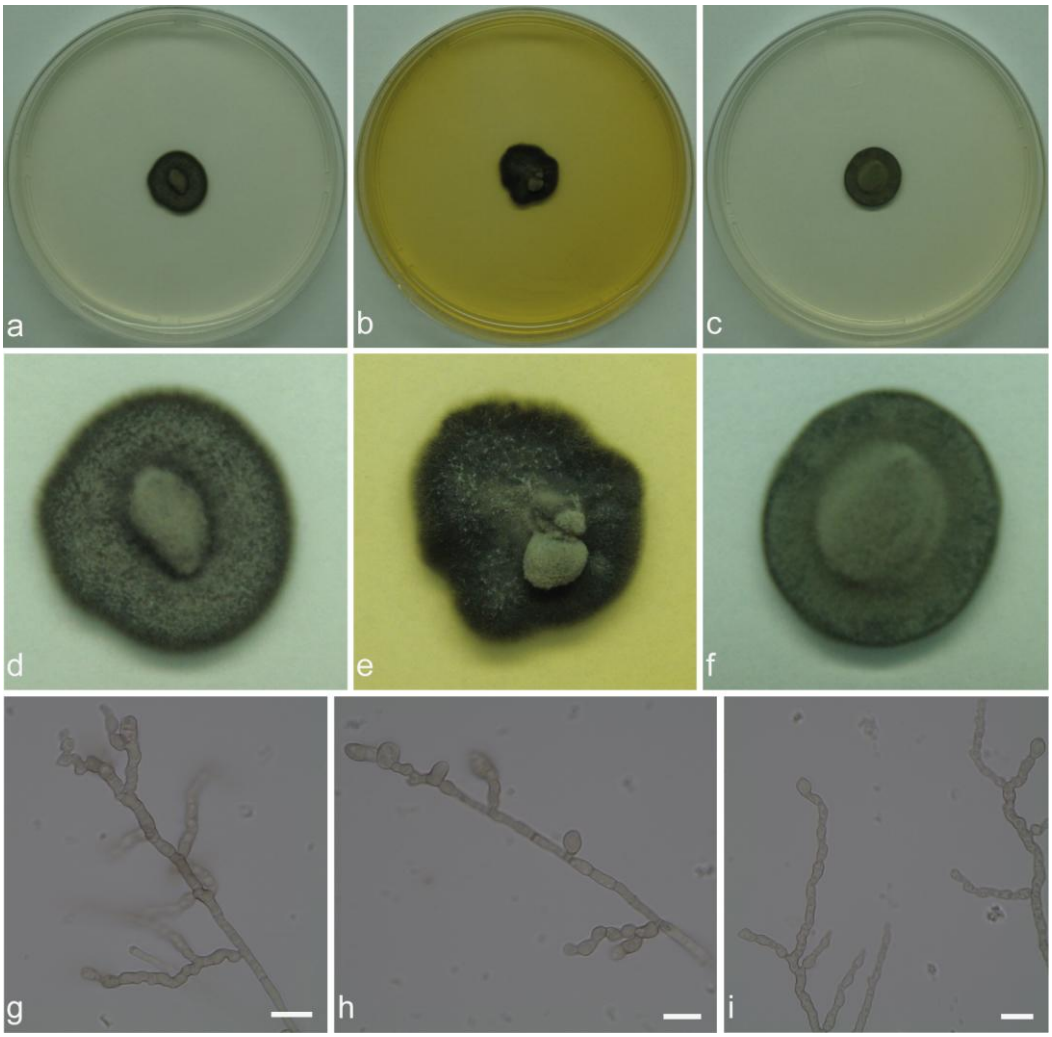
Família desconhecida

Habitats e distribuição: *Dactylaria* é um gênero grande e heterogêneo (PAULUS et al., 2003). As espécies ocorrem principalmente em vegetações submersas e em decomposição (CAI et al., 2002; PROMPUTTHA et al., 2002), madeira em decomposição e cascas (GOH; HYDE, 1997; TSUI et al., 1997; HYDE; GOH, 1998; GENÉ et al., 2000). Entretanto, o gênero também inclui fitopatógenos, agentes de infecções em animais, hiperparasitas fungícolas e nematófagos (GOH; HYDE, 1997; PAULUS et al., 2003). O fungo *D. higginsii* tem sido estudado para controle biológico herbicida de *Cyperus rotundus*, planta popularmente conhecida como tiririca e considerada uma praga agrícola (KADIR et al., 2000).

Patogenicidade: *Dactylaria higginsii* é um importante fungo fitopatógeno deste grupo e frequentemente é encontrado em plantas do gênero *Cyperus* (FARZANEH et al., 2009). A espécie *D. gallopava* é um agente patogênico com relatos em doenças pulmonares e do sistema nervoso central (KUBAK et al., 2009). Além disso, *D. gallopava* está cada vez mais presente em pacientes transplantados, sendo fatal em 50 % dos casos (MAZUR; JUDSON, 2001). As linhagens obtidas do integumento das formigas cortadeiras de folhas (n=2) são uma potencial espécie nova e por isso sua patogenicidade é desconhecida.

Morfologia (Figura 14): Fungos anamorfos. A linhagem DOC 289, isolada do integumento de bitú de *Atta capiguara* e identificada como *Dactylaria* sp., foi analisada. Características das colônias após dez dias a 25 °C: Colônia em CMA com 17 mm diam, plana e velutinosa com coloração verde oliva claro e margem escura. Colônia em MA com 15 mm diam, plana com porção central acinzentada e margem escura. Colônia em PDA com 16 mm diam, plana, velutinosa, porção central elevada e coloração verde acinzentada. Micélio estéril em CMA após dez dias a 25 °C. Teleomorfo desconhecido.

Figura 14. *Dactylaria* sp. Colônias com dez dias de crescimento a 25 °C nos meios: CMA (a,d), MA (b,e) e PDA (c,f). g–i. hifa vegetativa. Barra de escala = 10 µm.



Fonte: Elaborado pela autora.

ORDEM MAGNAPORTHALES

Pyriculariopsis

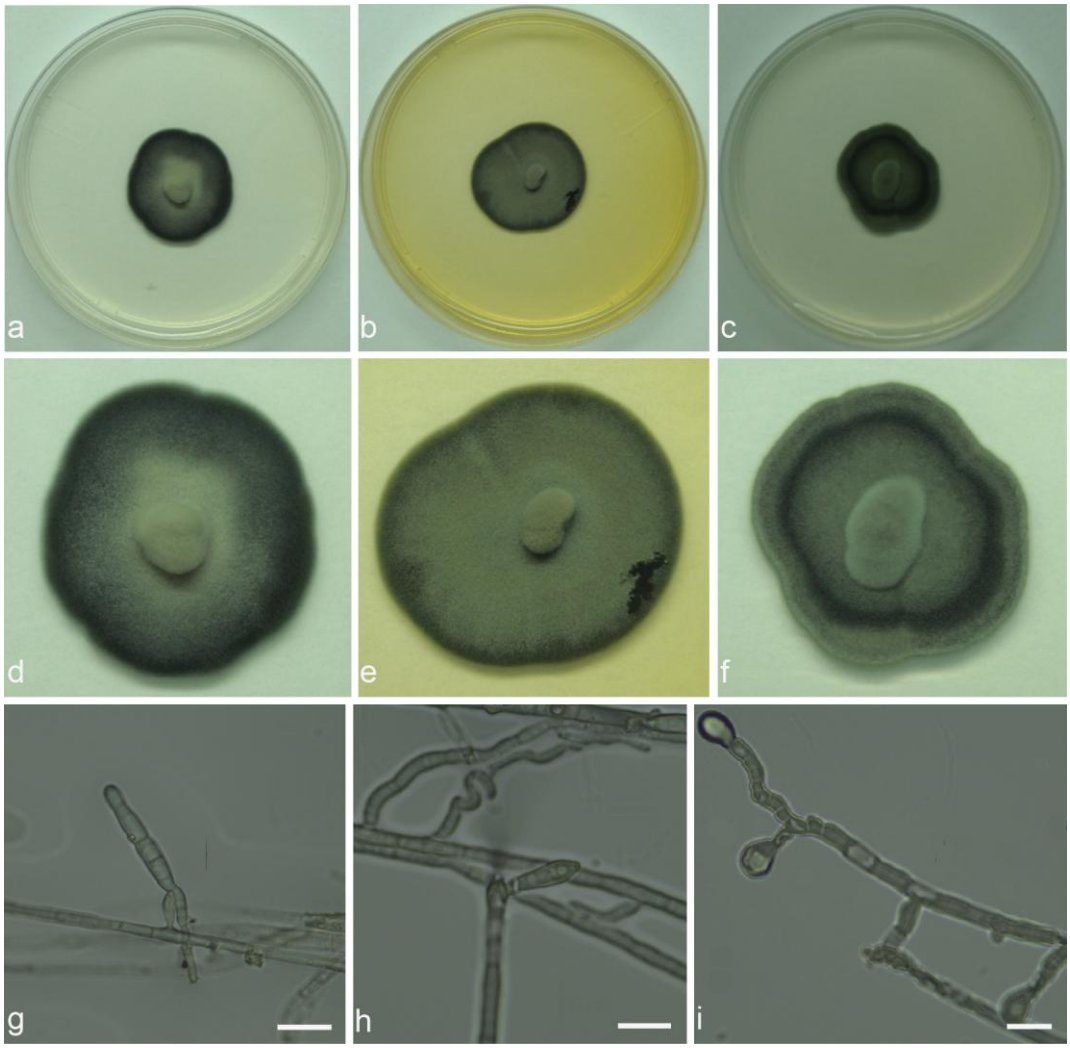
Família Magnaporthaceae

Habitats e distribuição: O gênero *Pyriculariopsis* foi criado para acomodar a espécie *P. parasitica* (ELLIS, 1971), segregada do gênero *Pyricularia* devido à ausência de septo separando os dentículos do conidióforo e sucessão conidial schizolitica (MATSUSHIMA, 1975). *Pyriculariopsis parasitica* é um fungo endofítico (PHOTITA et al., 2001) também encontrado na decomposição de folhas (SEEPHUEAK et al., 2010). As informações sobre a espécie são escassas devido ao baixo número de artigos e estudos na literatura.

Morfologia (Figura 15): Fungo anamórfico. A linhagem DOC 292, isolada do integumento de bitú de *Atta capiguara* e pertencente ao gênero *Pyriculariopsis*, foi analisada. Características das colônias após 15 dias a 25 °C: Colônia em CMA com 29 mm diam, plana com porção central elevada, variação gradual de tonalidades de cinza sendo o centro mais claro e a margem mais escura. Colônia em MA com 29 mm diam, plana e velutinosa com coloração verde acinzentada. Colônia em PDA com 28 mm diam, plana com porção central elevada, velutinosa com faixas circulares em diferentes tonalidades de cinza. Microcultivo em meio CMA após 15 dias a 25 °C: Baixa esporulação. Conídios emergentes diretamente de hifas indiferenciadas, solitários, 0–3 septos, obclavados, 14–23 × 3–4 μm. Clamidósporos terminais. Teleomorfo desconhecido.

Nota: A sequência de código AY265340 no GenBank, que mostrou a maior similaridade com a sequencia obtida para a linhagem DOC 292, foi depositada no banco de dados como *Pyricularia parasitica*. Porém, no trabalho original, a sequencia AY265340 é identificada como *Pyriculariopsis parasitica* (BUSSABAN et al., 2005). Além disso, as características morfológicas apresentadas acima diferem da descrição de *Pyriculariopsis parasitica* realizada por Klaubauf et al. (2014) e, somadas à baixa similaridade da sequência ITS com o GenBank (97 %, n° de acesso AY265340), as linhagens isoladas das formigas (n=3) podem representar uma nova espécie.

Figura 15. *Pyriculariopsis* sp. Colônias com 15 dias de crescimento a 25 °C nos meios: CMA (a,d), MA (b,e) e PDA (c,f). g, h. conídios. i. clamidósporos. Barra de escala = 10 µm.



Fonte: Elaborado pela autora.

ORDEM OPHIOSTOMATALES

Sporothrix schenckii

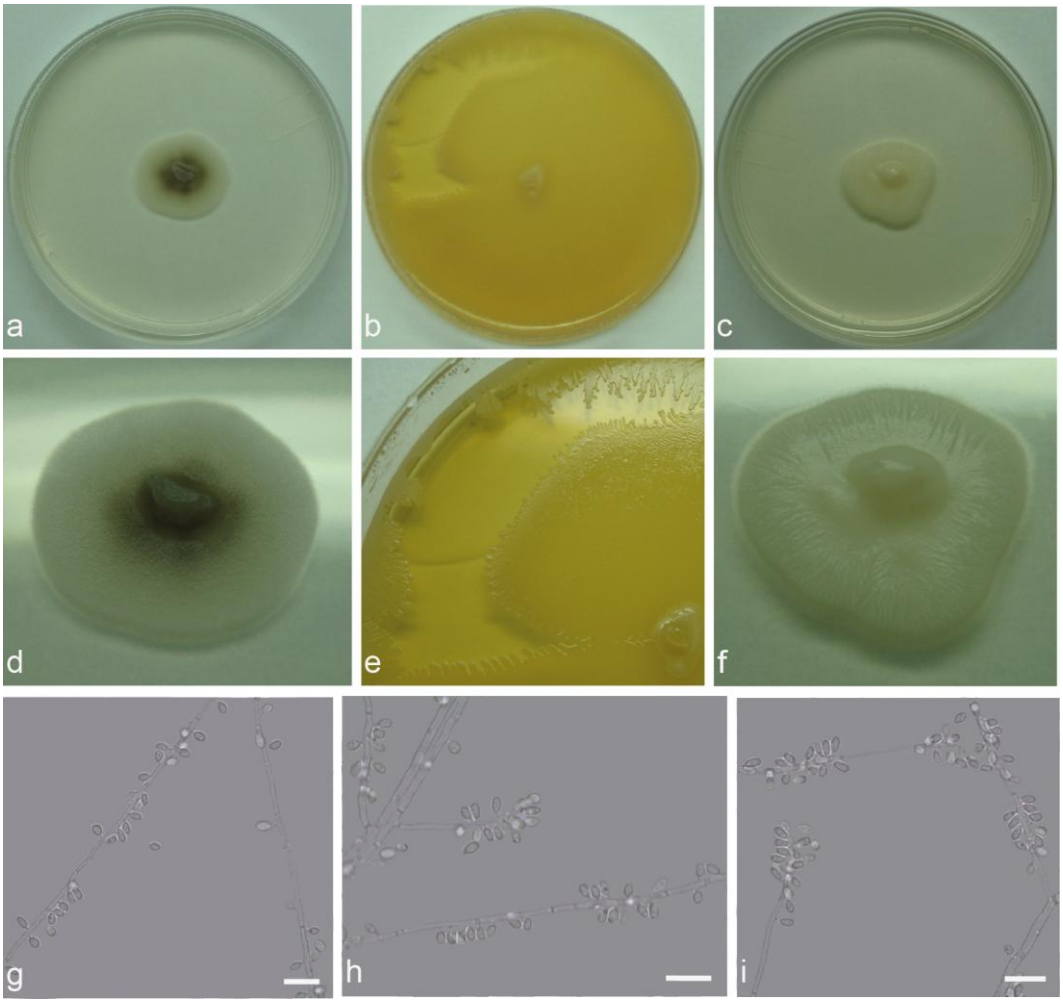
Família Ophiostomataceae

Habitats e distribuição: O fungo *Sporothrix schenckii* é amplamente distribuído na natureza e pode ser encontrado nos solos em associação com material vegetal em decomposição, plantas e água (LOPES-BEZERRA et al., 2006; MARIMON et al., 2007).

Patogenicidade: *Sporothrix schenckii* é um fungo dimórfico responsável por infecções denominadas esporotricoses. Apesar de ser encontrada mundialmente, essa infecção é mais comum em áreas tropicais e subtropicais (MARIMON et al., 2006) e ocorre através da inoculação traumática de materiais colonizados pelo fungo ou através da inalação de esporos (da ROSA et al., 2005). Embora afete tanto humanos quanto animais, gatos são mais vulneráveis a desenvolver essa micose (PEREIRA et al., 2011). Ao longo das duas últimas décadas, o Brasil tem passado por uma epidemia de esporotricose devido às transmissões zoonóticas através dos gatos (RODRIGUES et al., 2013).

Morfologia (Figura 16): Fungo anamorfo. A linhagem DOC 147, isolada do integumento de bitú de *Atta laevigata* e identificada como *S. schenckii*, foi analisada. Características das colônias após dez dias a 25 °C: Colônia em CMA com 25 mm diam, plana, lisa, margem branca e região central marrom claro. Colônia em MA difusa por toda a placa, plana, lisa, branca opalescente com margem irregular e sinuada. Colônia em PDA com 25 mm diam, plana e lisa com coloração creme e margem sulcada. Apesar da aparência hialina das colônias, diferentes concentrações de pH, temperatura e carboidratos induzem a produção de melanina (ALMEIDA-PAES et al., 2009). Microcultivo em meio CMA após dez dias a 25 °C: Células conidiogênicas oriundas de hifas indiferenciadas formando conídios por crescimento simpodial em dentículos pequenos e agrupados. Conídios asseptados e obovóides com 2.5–4.5 × 1.5–2.5 µm. Teleomorfo filogeneticamente relacionado ao gênero *Ophiostoma* (de MEYER et al., 2008).

Figura 16. *Sporothrix schenckii*. Colônias com dez dias de crescimento a 25 °C nos meios: CMA (a,d), MA (b,e) e PDA (c,f). g–i. conidiogênese e conídios. Barra de escala = 10 µm.



Fonte: Elaborado pela autora.

ORDEM PLEOSPORALES

Alternaria

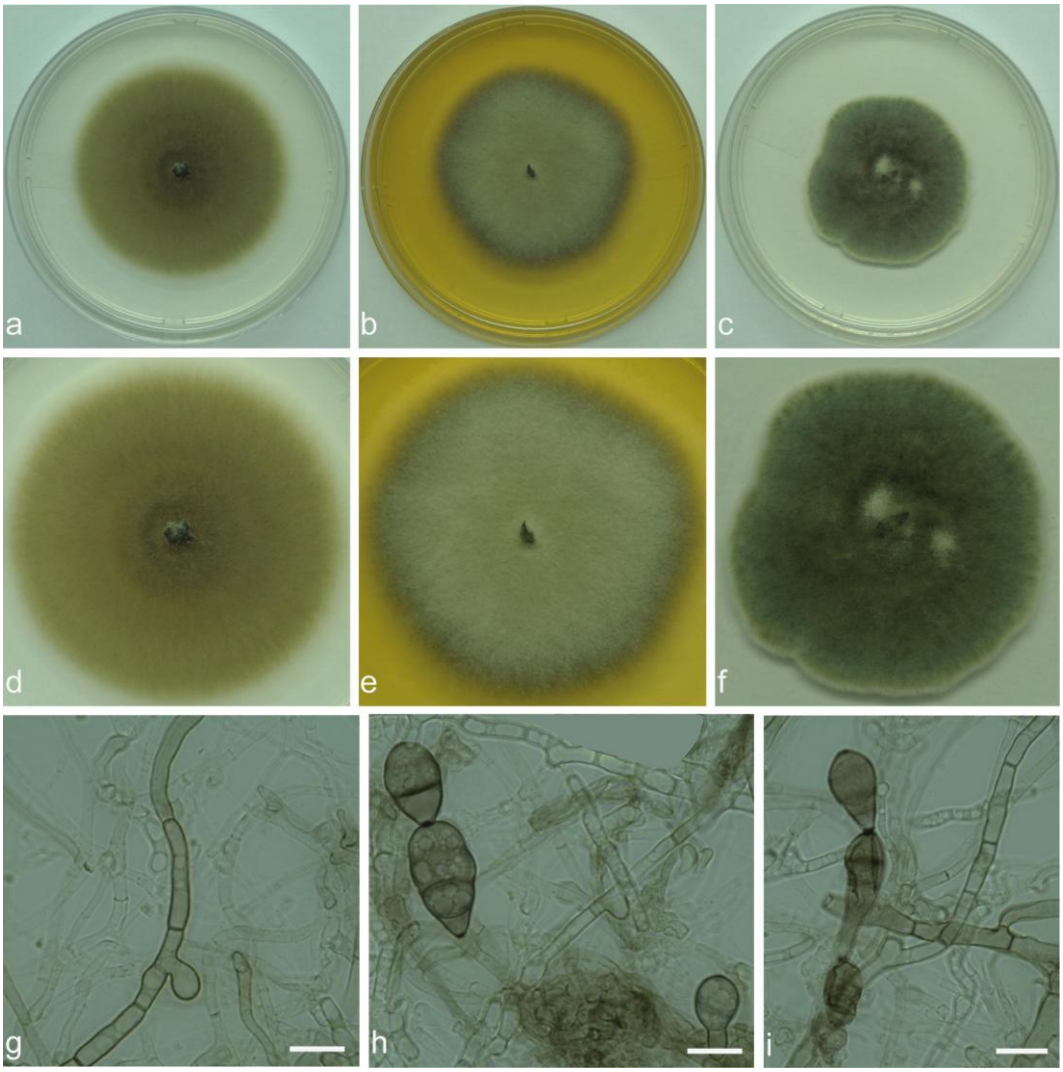
Família Pleosporaceae

Habitats e distribuição: Espécies do gênero *Alternaria* são cosmopolitas (SAMSON et al., 2010) e colonizam diferentes ecossistemas, incluindo ambientes extremos como solos no deserto (STERFLINGER et al., 2012), áreas radioativamente contaminadas (DIGHTON et al., 2008) e águas hipersalinas (MOUBASHER et al., 2013). Entretanto, a maioria das espécies são saprófitas e frequentemente encontradas em materiais vegetais (CROUS et al., 2009b).

Patogenicidade: O gênero contêm diversas espécies fitopatogênicas (CROUS et al., 2009b) que causam grandes perdas econômicas à agricultura (WOUDENBERG et al., 2013). Algumas espécies produzem metabólitos secundários tóxicos, como a produção de toxinas AAL por *A. arborescens* (ANDERSEN et al., 2002). Além disso, espécies como *A. alternata* e *A. tenuissima*, são consideradas patógenos emergentes em hospedeiros imunocomprometidos, ocasionando micoses (sub)cutâneas (de HOOG et al., 2001; PEREIRO Jr et al., 2004; ROBERTSHAW; HIGGINS, 2005).

Morfologia (Figura 17): Fungos anamorfos. A linhagem FAH 36, isolada do integumento de soldade de *Atta laevigata* e identificada como *A. arborescens* por Guedes et al. (2012), foi analisada. Características das colônias após sete dias a 25 °C: Colônia em CMA com 58 mm diam, difusa com micélio imerso e coloração verde oliva. Colônia em MA com 50 mm diam, plana e velutinosa com coloração cinza. Colônia em PDA com 43 mm diam, plana e velutinosa com coloração verde acinzentada. Microcultivo em meio CMA após sete dias a 25 °C: Pouca esporulação. Conídios catenulados com septos longitudinais (transversais não observados), obipiriforme, levemente áspero a verrucoso, septos escuros, 11–16 × 4.5–9 µm. Teleomorfo desconhecido.

Figura 17. *Alternaria arborescens*. Colônias com sete dias de crescimento a 25 °C nos meios: CMA (a,d), MA (b,e) e PDA (c,f). g. formação de conidióforo. h,i. conídios. Barra de escala = 10 µm.



Fonte: Elaborado pela autora.

Bipolaris-Cochliobolus-Curvularia complex
Família Pleosporaceae

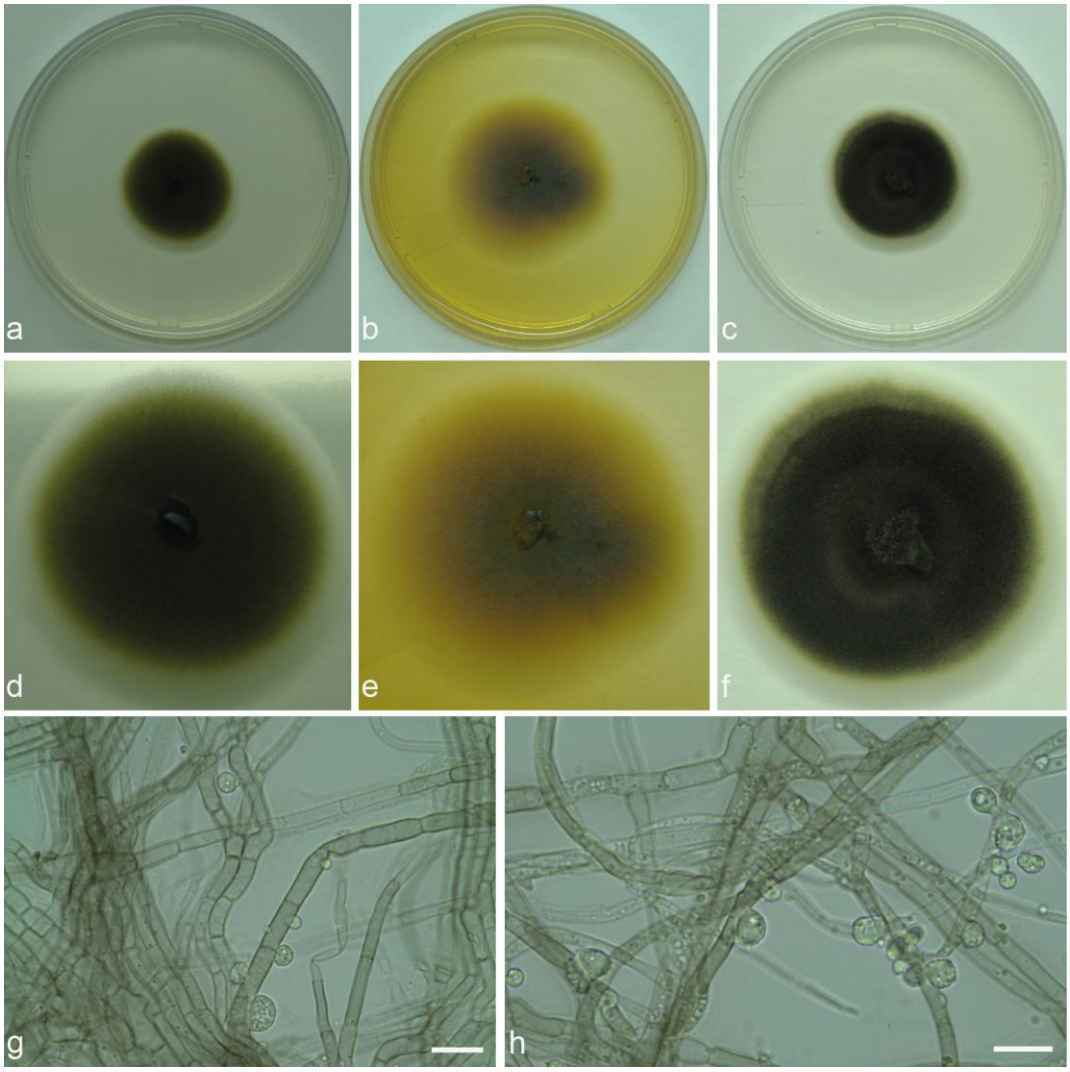
Bipolaris

Habitats e distribuição: *Bipolaris* é um grande gênero de fungos dematiáceos com mais de 100 espécies, sendo a maioria delas sapróbias e patógenas de plantas (da CUNHA et al., 2012). Adicionalmente, *B. eleusines* tem sido estudado como possível candidato bioherbicida no controle de capim-arroz, uma planta daninha que infesta as lavouras de arroz (PINTO et al., 2008; ZHANG et al., 2014).

Patogenicidade: Quase todas as espécies de *Bipolaris* são fitopatógenas, principalmente de plantas da família Poaceae (MANAMGODA et al., 2014). Importantes espécies, como *B. sorokiniana*, tem causado grande epidemias em importantes culturas como trigo e cevada (KUMAR et al., 2002). Ocasionalmente são encontradas em humanos, principalmente ocasionando sinusites alérgicas (de HOOG et al., 2001).

Morfologia (Figura 18): Fungos anamorfos. A linhagem FAH 15, isolada do integumento de soldade de *Atta laevigata* e identificada como *Bipolaris sorokiniana* por Guedes et al. (2012), foi analisada. Características das colônias após sete dias a 25 °C: Colônia em CMA com 28 mm diam, plana com micélio imerso e coloração verde oliva. Colônia em MA com 42 mm diam, plana com micélio imerso e coloração marrom alaranjada. Colônia em PDA com 32 mm diam, plana e velutinosa com coloração verde oliva escuro. Micélio estéril no meio CMA após sete dias a 25 °C. Teleomorfo desconhecido.

Figura 18. *Bipolaris sorokiniana*. Colônias com sete dias de crescimento a 25 °C nos meios: CMA (a,d), MA (b,e) e PDA (c,f). g–h. hifa vegetativa. Barra de escala = 10 µm.



Fonte: Elaborado pela autora.

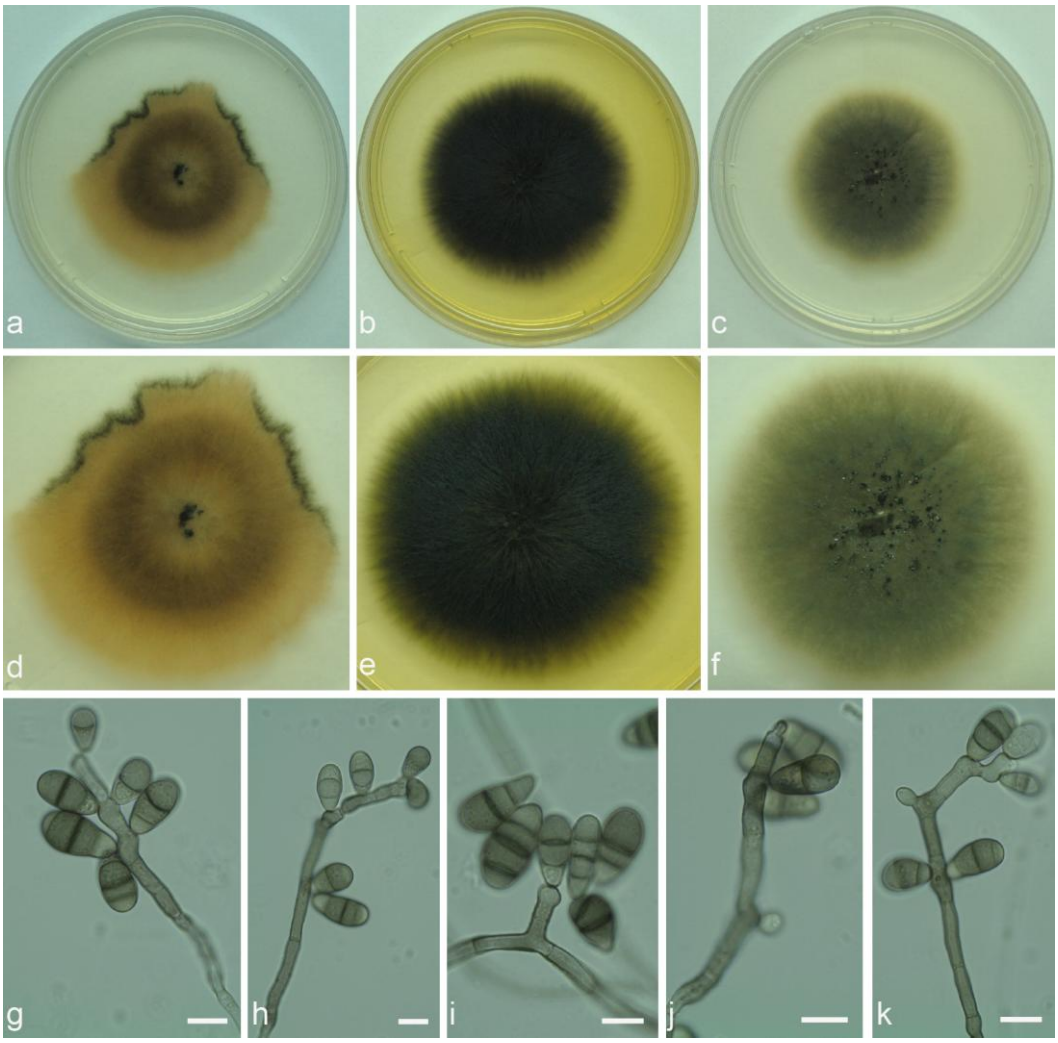
Cochliobolus

Habitats e distribuição: Espécies de *Cochliobolus*, com seus anamorfos situados nos gêneros *Bipolaris* e *Curvularia*, são importantes fungos fitopatógenos associados com mais de 60 gêneros de hospedeiros (SIVANESAN, 1987; AGRIOS, 2005; MANAMGODA et al., 2011). No ambiente, além de ser encontrado no integumento de formigas cortadeiras de folhas (MANTOVANI, 2013; BARON, 2014), o fungo *Cochliobolus* sp. também já foi isolado de esponjas marinhas (PAZ et al., 2010).

Patogenicidade: Espécies fitopatogênicas deste gênero têm causado grandes epidemias em sistemas de agricultura como arroz, trigo e milho (SIVANESAN, 1987; SCHEFFER, 1997; BERBEE et al., 1999). De acordo com Joshi e colaboradores (2004), a perda total de produção ocasionada por *C. sativus* varia de 20 % a 80 % e perdas de até 100 % podem ocorrer em condições severas. Apesar de não possuir relatos de casos clínicos, os estados assexuais de *Cochliobolus* (*Bipolaris* e *Curvularia*) são responsáveis por causar infecções como feohifomicose (KOSHI et al., 1987; COSTA et al., 1991) e úlcera de córnea (ANANDI et al., 1988).

Morfologia (Figura 19): Fungos teleomorfos. A linhagem AP 160, isolada de pellet de *Atta capiguara* e identificada como *Cochliobolus lunatus* por Duarte (2013), foi analisada. Características das colônias após sete dias a 25 °C: Colônia em CMA com 54 mm diam, plana com micélio imerso, coloração alaranjada e margem verde oliva escuro. Colônia em MA com 56 mm diam, plana com micélio imerso e coloração verde oliva escuro. Colônia em PDA com 45 mm diam, plana com micélio verde acinzentado e produção de exudatos escuros. Microcultivo em meio CMA após sete dias a 25 °C: Conidióforos eretos, 14–110 × 2.5–4 µm, com células conidiogênicas terminais e crescimento simpodial. Conídios elipsóides, ligeiramente curvados, 2–4 septos, 11–20 × 7.5–9 µm. Anamorfo *Curvularia lunata*.

Figura 19. *Cochliobolus lunatus* / *Curvularia lunata*. Colônias com sete dias de crescimento a 25 °C nos meios: CMA (a,d), MA (b,e) e PDA (c,f). g–h. conidióforos e conídios. Barra de escala = 10 µm.



Fonte: Elaborado pela autora.

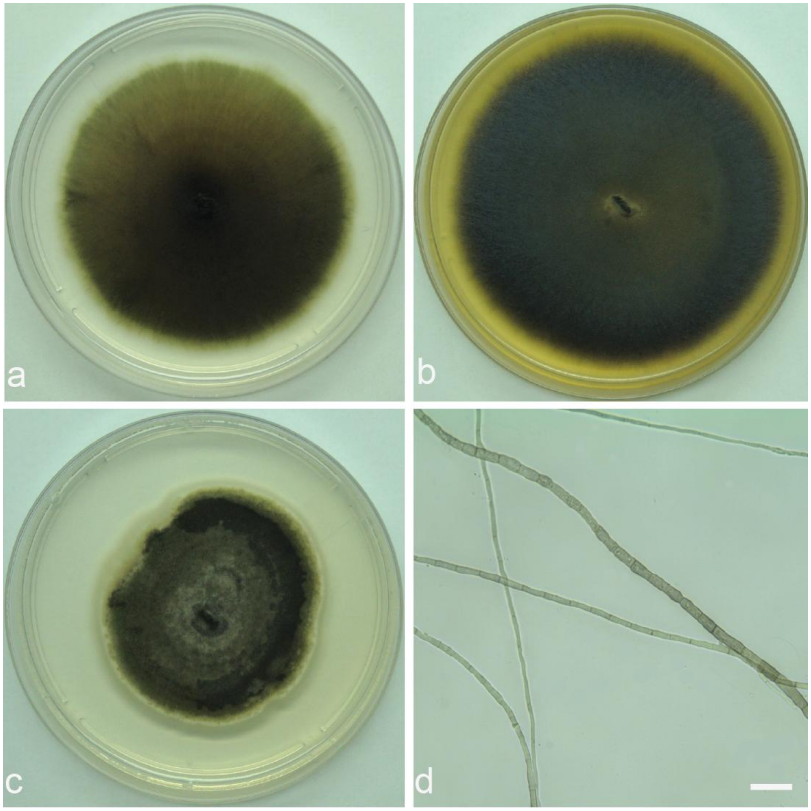
Curvularia

Habitats e distribuição: Espécies de *Curvularia* estão amplamente distribuídas e podem ser isoladas do solo e plantas, com uma preferência pelos trópicos e climas mais quentes (SAMSON et al., 2010). Esses fungos são particularmente comuns como sapróbios e patógenos de gramíneas (de HOOG et al., 2001).

Patogenicidade: O gênero compreende fungos fitopatógenos, como *C. lunata* (ROCHA et al., 2004), *C. oryzae* (SUNPAPAO et al., 2014) e *C. trifolii* (ALMAGUER et al., 2013). Algumas espécies cosmopolitas são ocasionalmente encontradas em gado, raramente em humanos, e em ambos os casos causam sinusites alérgicas crônicas e não-específicas, às vezes com envolvimento cerebral (de HOOG et al., 2001).

Morfologia (Figura 20): Fungos anamorfos. A linhagem FAH 40, isolada do integumento de soldade de *Atta laevigata* e identificada como *Curvularia trifolii* por Guedes et al. (2012), foi analisada. Características das colônias após 14 dias a 25 °C: Colônia em CMA com 68 mm diam, plana com micélio imerso e coloração verde oliva. Colônia em MA com 76 mm diam, plana com micélio imerso e coloração marrom escura. Colônia em PDA com 53 mm diam, plana e velutinosacom coloração verde oliva acinzentada. Micélio estéril no meio CMA após 14 dias a 25 °C. Teleomorfo desconhecido.

Figura 20. *Curvularia trifolii*. Colônias com 14 dias de crescimento a 25 °C nos meios: CMA (a), MA (b) e PDA (c). d. hifa vegetativa. Barra de escala = 20 µm.



Fonte: Elaborado pela autora.

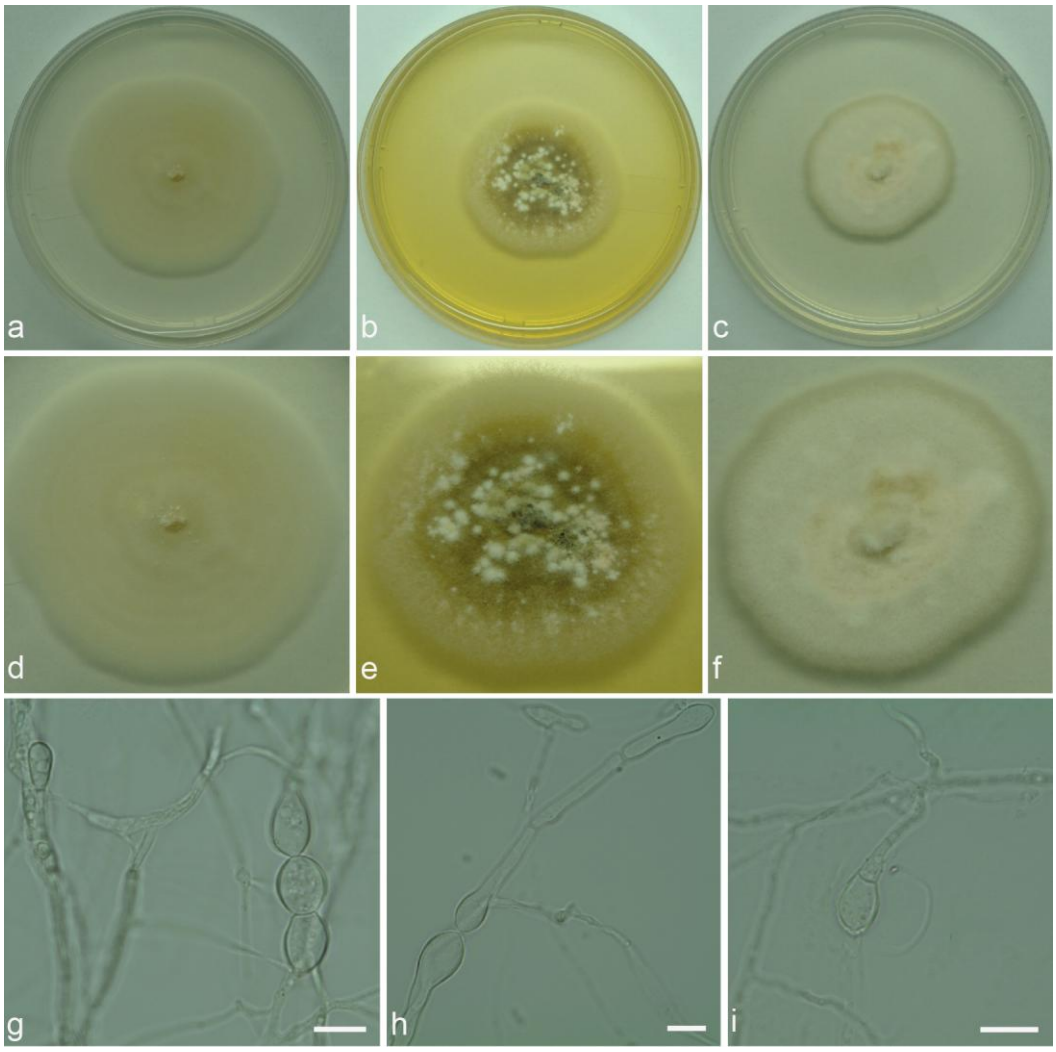
Coniothyrium
Família Leptosphaeriaceae

Habitats e distribuição: Fungos do gênero *Coniothyrium* estão amplamente dispersos e são comumente isolados de diferentes habitats (VERKLEY et al., 2004), como sedimentos marinhos (BUBNOVA, 2010) e áreas contaminadas com produtos agrícolas tóxicos (IRAM et al., 2011). O grupo também compreende espécies endofíticas de cactus (SURYANARAYANAN et al., 2005) e ulmeiros (TOMITA, 2003). Recentemente, estes fungos tem sido estudados como agentes de biocontrole (WHIPPS et al., 2008; McQUILKEN; CHALTON, 2009), biorremediação (SILVA et al., 2003a, b), e produtores de antibiótico (SEEPHONKAI et al., 2002; ELSEBAI et al., 2011).

Patogenicidade: Fungos do gênero *Coniothyrium* são conhecidos fitopatógenos como, por exemplo, *C. zuluense* em *Eucalyptus* (WINGFIELD et al., 1996; ROUX et al., 2002). Também possuem relatos de casos clínicos, ocasionando infecções cutâneas em pacientes imunocomprometidos ou transplantados (BALAJEE et al., 2007; GORDON et al., 2012).

Morfologia (Figura 21): Fungos anamorfos. A linhagem DOC 332, isolada do integumento de bitú de *Atta capiguara* e identificada como *Coniothyrium* sp., foi analisada. Características das colônias após sete dias a 25 °C: Colônia em CMA com 55 mm diam, plana e hialina com pequena produção de exudatos translúcidos na porção central. Colônia em MA com 40 mm diam, plana, velutinosa, coloração marrom clara e margem branca, pequena produção de exudatos translúcidos na porção central. A melanização é mais evidente no meio MA. Colônia em PDA com 40 mm diam, plana, velutinosa e hialina. Micélio estéril no meio CMA após sete dias a 25 °C. Teleomorfo desconhecido.

Figura 21. *Coniothyrium* sp. Colônias com sete dias de crescimento a 25 °C nos meios: CMA (a,d), MA (b,e) e PDA (c,f). g–i. hifa vegetativa. Barra de escala = 10 µm.



Fonte: Elaborado pela autora.

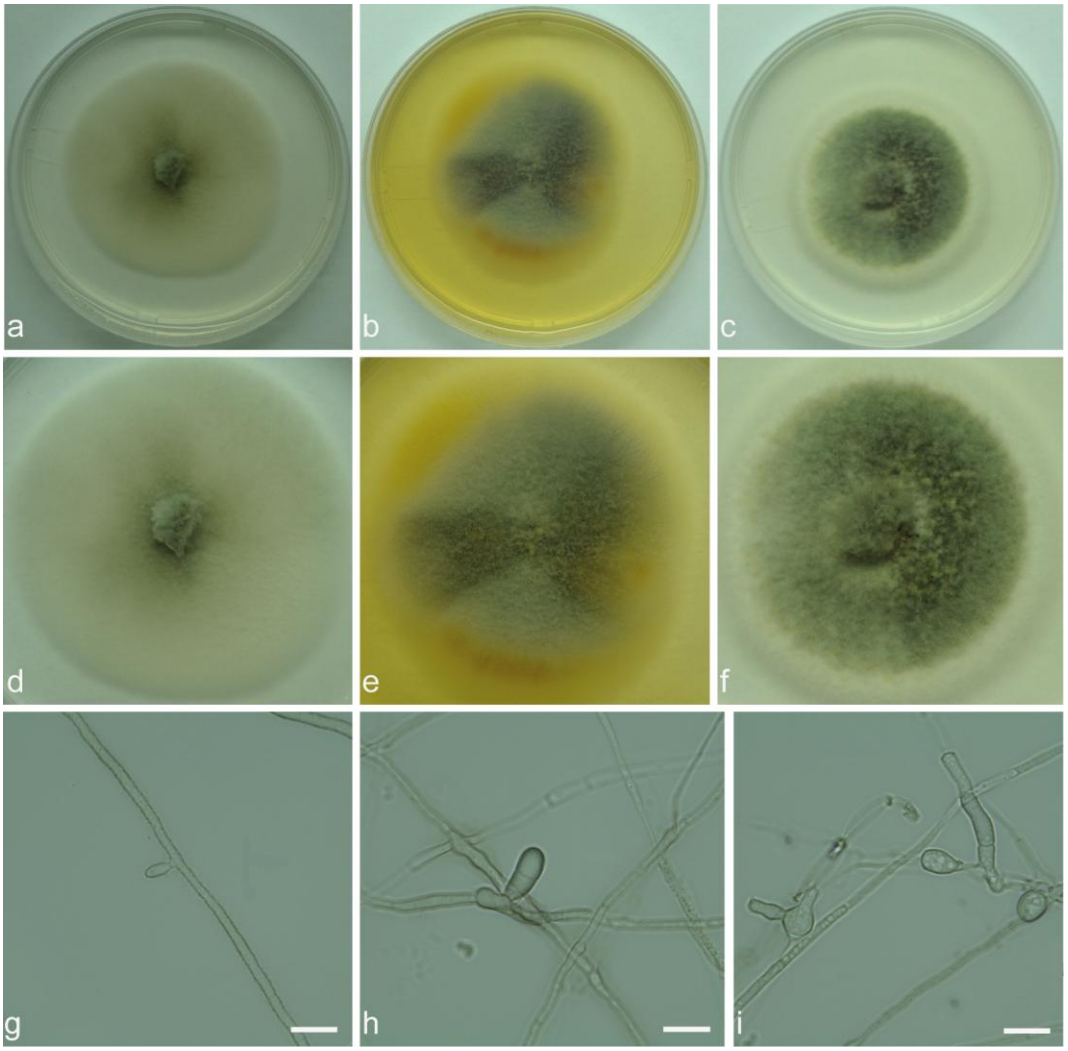
Microsphaeropsis arundinis
Família Montagnulaceae

Habitats e distribuição: Espécies de *Microsphaeropsis* são comumente encontradas como sapróbios (CARISSE; BERNIER, 2002), endofíticos (HORMAZABAL et al., 2005) e patógenos de plantas. No meio ambiente estes fungos são ubíquos em solo e água (PENDLE et al., 2004). A espécie *M. arundinis* pode ser encontrada também em esponjas marinhas (PASSARINI et al., 2015). Além disso, Luo et al. (2013) reportou a existência de compostos antimicrobianos em *M. arundinis* capazes de inibir *Staphylococcus aureus*.

Patogenicidade: *Microsphaeropsis arundinis* é fitopatógeno de gramíneas (KLUGER et al., 2004) e patógeno de humanos, causando infecções cutâneas em pacientes imunocomprometidos (HALL et al., 2009; CRAWFORD et al., 2015), e em gatos (KROCKENBERGER et al., 2010).

Morfologia (Figura 22): Fungos anamorfos. A linhagem DOC 43, isolada do integumento de bitú de *Atta capiguara* e identificada como *M. arundinis*, foi analisada. Características das colônias após dez dias a 25 °C: Colônia em CMA com 58 mm diam, plana e velutinosa com coloração hialina e centro marrom claro. Colônia em MA com 55 mm diam, plana, velutinosa, porção central acinzentada e margem imersa no meio. Colônia em PDA com 53 mm diam, plana, cotonosa, porção central verde acinzentada e margem hialina. Micélio estéril no meio CMA após dez dias a 25 °C. Teleomorfo desconhecido.

Figura 22. *Microsphaeropsis arundinis*. Colônias com dez dias de crescimento a 25 °C nos meios: CMA (a,d), MA (b,e) e PDA (c,f). g–i. hifa vegetativa. Barra de escala = 10 µm.



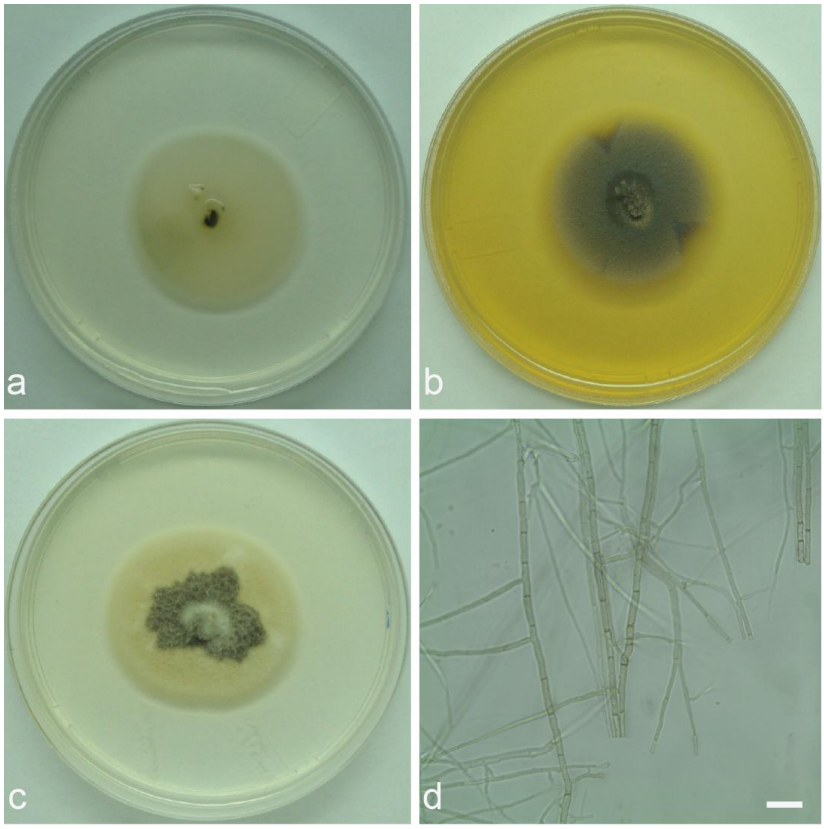
Fonte: Elaborado pela autora.

Paraphaeosphaeria
Família Phaeosphaeriaceae

Habitats e distribuição: Em sua maioria, as espécies do gênero *Paraphaeosphaeria* são associadas a plantas (CÂMARA et al., 2001), como o fungo endofítico *P. nolinae* em hastes de *Artemisia annua* (GE et al., 2006). Esse grupo de fungos é encontrado em uma ampla variedade de dicotiledôneas e monocotiledôneas, porém é particularmente comum em plantas da família Agavaceae (CHECA et al., 2002). *Paraphaeosphaeria quadriseptata* é também associada à rizosfera de cactos do gênero *Schlumbergera* (WIJERATNE et al., 2006). Além da associação com plantas, existe um registro de *Paraphaeosphaeria* sp. isolada de ambiente marinho capaz de produzir compostos antimicrobianos (TSUDA et al., 2003).

Morfologia (Figura 23): Fungos anamorfos. A linhagem DOC 312, isolada do integumento de bitú de *Atta capiguara* e identificada como *Paraphaeosphaeria* sp., foi analisada. Características das colônias após dez dias a 25 °C: Colônia em CMA com 40 mm diam, plana, lisa e hialina. Colônia em MA com 45 mm diam, plana e lisa com coloração cinza escuro. Colônia em PDA com 45 mm diam, plana, cotonosa, porção central verde acinzentada e margem hialina. Micélio estéril no meio CMA após dez dias a 25 °C. Teleomorfo desconhecido.

Figura 23. *Paraphaeosphaeria* sp. Colônias com dez dias de crescimento a 25 °C nos meios: CMA (a), MA (b) e PDA (c). d. hifa vegetativa. Barra de escala = 20 µm.



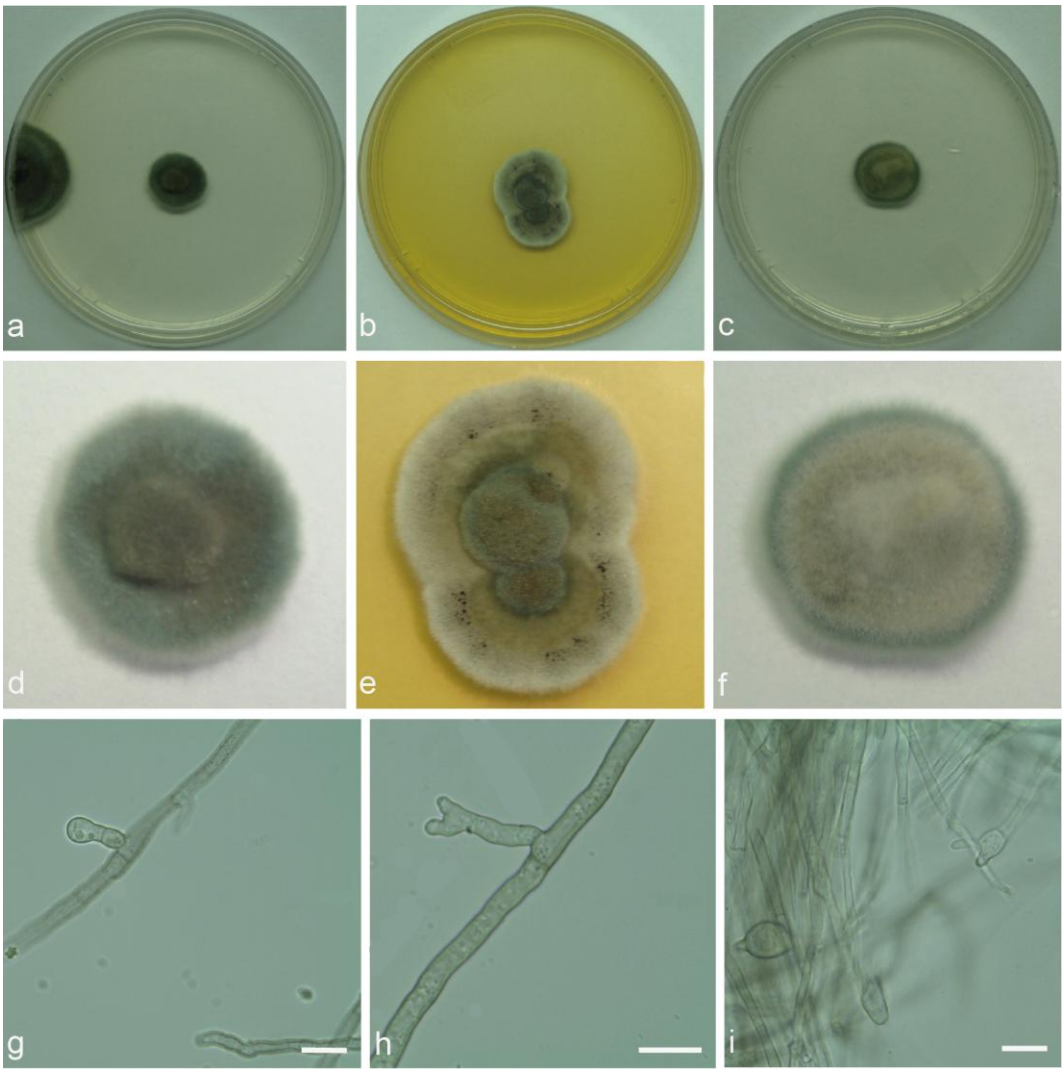
Fonte: Elaborado pela autora.

Tetraploa sasicola
Família Massarinaceae

Habitats e distribuição: O gênero *Tetraplosphaeria* foi descrito por Tanaka et al. (2009) para acomodar o estado sexual de *Tetraploa*. No entanto, Rossman et al. (2015) recomenda que o nome *Tetraplosphaeria* seja alterado para *Tetraploa* pois o trabalho de Tanaka et al. (2009) mostrou que *Tetraplosphaeria sasicola* possui um agrupamento muito próximo a espécie-tipo *Tetraploa aristata*. Como *Tetraploa* compreende 20 nomes, enquanto *Tetraplosphaeria* possui apenas quatro, *Tetraploa* tem prioridade. Os trabalhos com este grupo de fungos ainda são escassos e até o momento *Tetraploa sasicola* só havia sido encontrada em plantas. A presença em formigas-cortadeiras mostra a possibilidade de colonização de diferentes habitats.

Morfologia (Figura 24): Fungo teleomorfo de *Tetraploa ellisii*. A linhagem DOC 175, isolada do integumento de bitú de *Atta capiguara* e identificada como *T. sasicola*, foi analisada. Características das colônias após dez dias a 25 °C: Colônia em CMA com 17 mm diam, plana e velutinosa com coloração verde oliva. Colônia em MA com 20 mm diam, plana e cotonosa com coloração verde acinzentada. Colônia em PDA com 17 mm diam, plana, cotonosa, porção central verde oliva e margem verde escura. Micélio estéril no meio CMA após dez dias a 25 °C.

Figura 24. *Tetraploa sasicola*. Colônias com dez dias de crescimento a 25 °C nos meios: CMA (a), MA (b) e PDA (c). d. hifa vegetativa. Barra de escala = 10 µm.



Fonte: Elaborado pela autora.

ORDEM VENTURIALES

Ochroconis

Família Sympoventuriaceae

Habitats e distribuição: No meio ambiente, espécies de *Ochroconis* são frequentemente encontradas em solo e material vegetal em decomposição (GRANDI; GUSMÃO, 2002). Além disso, podem ser encontrados em plantas aquáticas (ORLOWSKA et al., 2004) e parede de cavernas (MARTIN-SANCHEZ et al., 2012). Devido a sua capacidade em tolerar baixo pH e extremas temperaturas (MACHOUART et al., 2014), fungos deste gênero também colonizam lava-louças e banheiros (NOBUO; NIICHIRO, 2008; XIN; de HOOG, 2010). Duas novas espécies de *Ochroconis*, isoladas do integumento de formigas cortadeiras de folhas, foram recentemente descritas: *O. sexualis* (SAMERPITAK et al., 2014), também encontrado em material laboratorial na África do Sul, e *O. globalis* (SAMERPITAK et al., 2015), isolado também de banheiros na Alemanha.

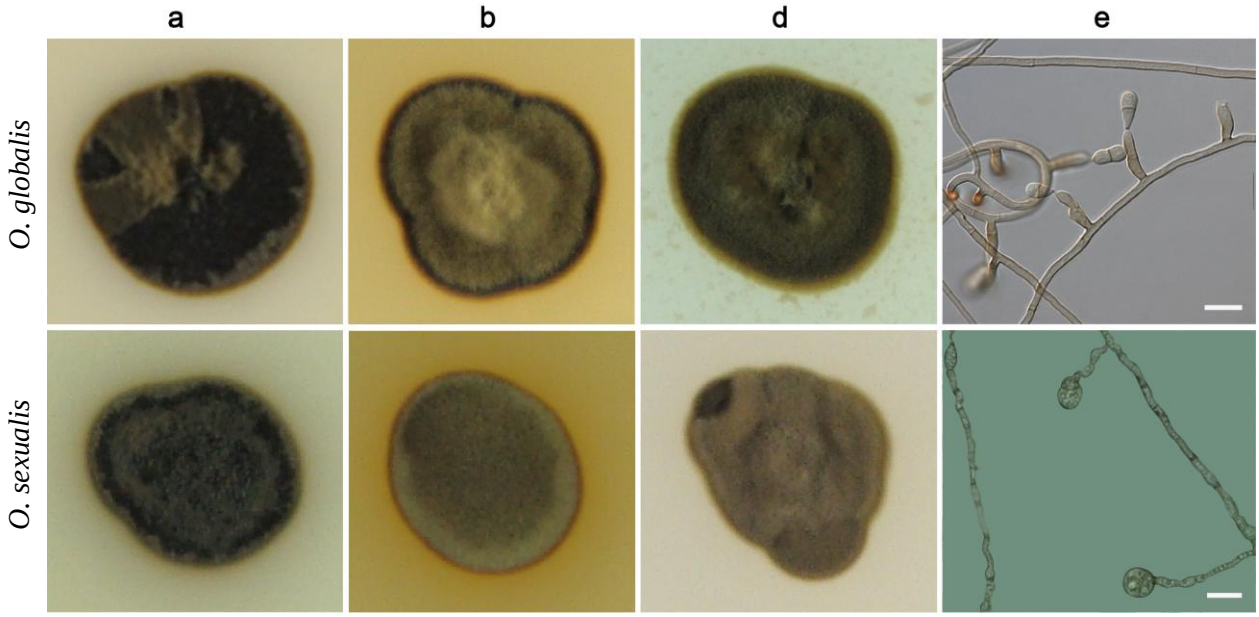
Patogenicidade: As espécies *O. humicola* e *O. tshawytschae* são ocasionalmente encontrados em infecções sistêmicas em peixes (AJELLO et al., 1977), tartarugas (WEITZMAN et al., 1985), gatos (VANSTEENHOUSE et al., 1988) e cachorros (SINGH et al., 2006). Por outro lado, *Ochroconis gallopava* é agente de importantes infecções em humanos (GE et al., 2012; MERIDEN et al., 2012). A patogenicidade das espécies descritas a partir do integumento das formigas ainda é desconhecida.

Morfologia (Figura 25): Fungos anamorfos. As linhagens AP 171 (*O. globalis*) e AP 297 (*O. sexualis*), ambas isoladas do integumento de içá de *Atta capiguara*, foram analisadas.

Ochroconis globalis – Características das colônias após 14 dias a 25 °C: Colônia em CMA com 22 mm diam, plana, velutinosa, verde oliva com regiões mais escuras, margem marrom e definida. Colônia em MA com 22 mm diam, plana, velutinosa, porção central mais elevada, verde oliva com margem escura. Colônia em PDA com 24 mm diam, plana, velutinosa, verde oliva e margem mais clara. Microcultivo em meio CMA após 14 dias a 25 °C: Conidióforos laterais, eretos ou flexuosos, 1–2 septos, 5.5–25 × 1–1.5 μm. Conídios elipsóides, levemente apiculados na base, 1 septo, 7–11 × 2.5–4 μm. Teleomorfo desconhecido.

Ochroconis sexualis – Características das colônias após 14 dias a 25 °C: Colônia em CMA com 13 mm diam, plana e velutinosa com coloração marrom. Colônia em MA com 12 mm diam, plana, velutinosa, verde acinzentada, produção de pigmento alaranjado no meio de cultivo. Colônia em PDA com 15 mm diam, plana e velutinosa com coloração verde oliva claro. Micélio estéril no meio CMA porém com presença de clamidósporos. Samerpitak et al. (2014) encontrou uma linhagem teleomorfa de *O. sexualis*, representando o primeiro *Ochroconis* produtor de células sexuais.

Figura 25. Variações morfológicas de duas espécies de *Ochroconis*. Colônias com 14 dias de crescimento a 25 °C nos meios: CMA (a), MA (b), e PDA (c). d. conidióforos, conídios e clamidósporos. Barra de escala = 10 µm.



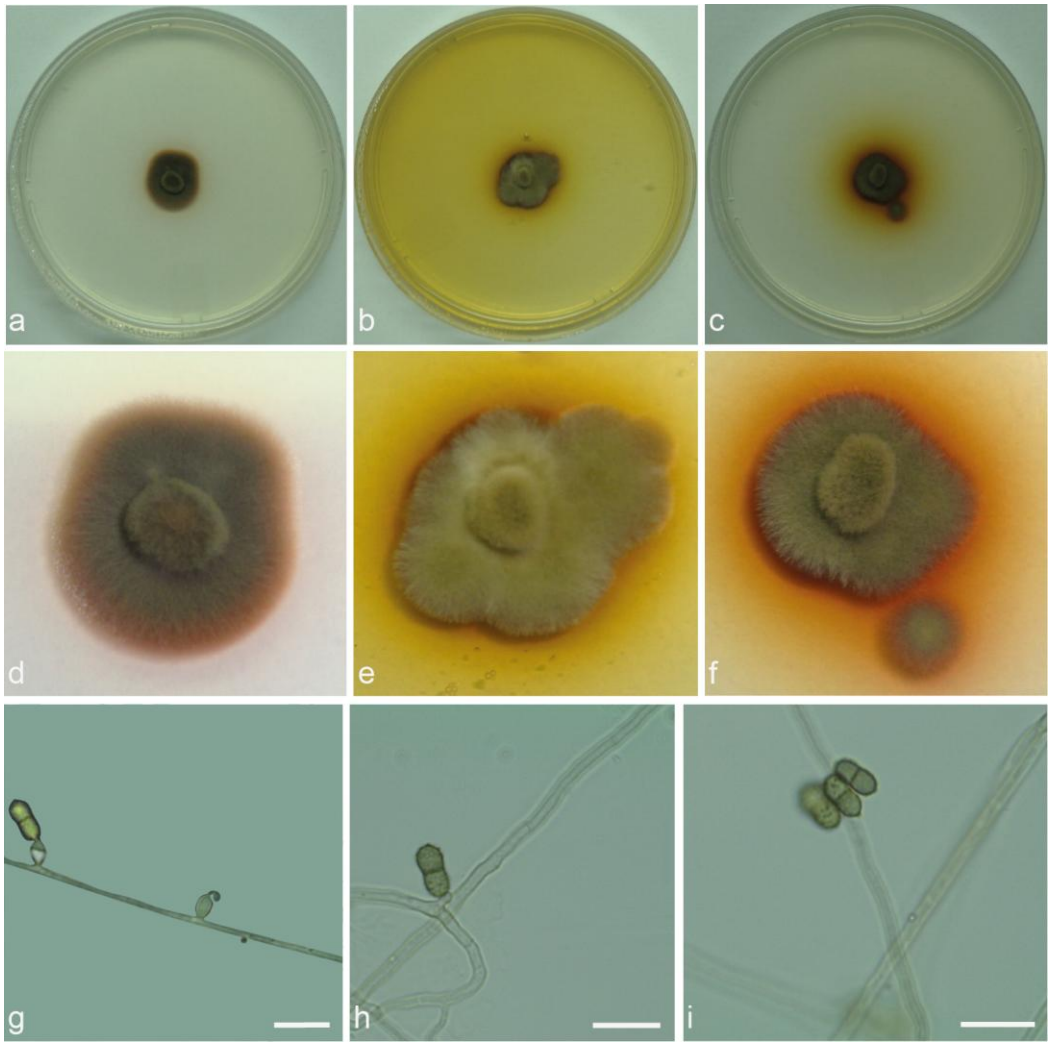
Fonte: Elaborado pela autora.

Verruconis verruculosa
Família Sympoventuriaceae

Habitats e distribuição: O gênero *Verruconis* foi proposto recentemente por Samerpitak et al. (2014). A espécie *Verruconis verruculosa* tem como basiônimo *Scolecobasidium verruculosum*. No ambiente o fungo *V. verruculosa* é encontrado em ninhos de cormorão (KUTORGA et al., 2013) e solo (WU; ZHANG, 2008; SAMERPITAK et al., 2014).

Morfologia (Figura 26): Fungos anamorfos. A linhagem 58N, isolada do integumento de bitú de *Atta laevigata* e identificada como *V. verruculosa* por Baron (2014), foi analisada. Características das colônias após sete dias a 25 °C: Semelhante morfologia nos meios CMA, MA e PDA (15, 16 e 14 mm diam, respectivamente); colônias planas e velutinosas com micélio verde oliva. Pigmento alaranjado no meio MA e avermelhado no meio PDA. Microcultivo em meio CMA após sete dias a 25 °C: Conidióforos simples, pouco diferenciados e não ramificados, 3.5–7.5 × 2–3. Conídios oblongos, 1 septo, constritos no septo, equinulados, 7–12 × 2.5–4 μm. Teleomorfo desconhecido.

Figura 26. *Verruconis verruculosa*. Colônias com sete dias de crescimento a 25 °C nos meios: CMA (a,d), MA (b,e) e PDA (c,f). g–i. hifa vegetativa. Barra de escala = 10 µm.



Fonte: Elaborado pela autora.

2.6 Considerações finais

Os resultados desse trabalho mostram que os fungos negros são muito abundantes no integumento de formigas cortadeiras de folhas. Embora fungos do gênero *Phialophora* tenham sido classificados como simbiontes das formigas Attini (LITTLE; CURRIE, 2007), baseado em isolamentos feitos apenas em formigas do gênero *Apterostigma*, a mesma conclusão não pode ser estabelecida para o gênero *Atta*.

O papel dos fungos negros na simbiose das formigas ainda é desconhecido, mas, baseando-se em sua ecologia, algumas inferências podem ser feitas. Como pôde ser observado na revisão dos principais táxons isolados do integumento das formigas cortadeiras de folhas, boa parte dos isolados mantêm relações com plantas, seja como epífitas, endofíticos ou fitopatógenos. Assim, provavelmente são transportados para o interior dos ninhos juntamente com o material vegetal que é utilizado para o cultivo do fungo mutualista.

Fungos negros da ordem Chaetothyriales, como *Cladophialophora* e *Exophiala*, podem sobreviver no integumento das formigas cortadeiras de folhas devido à sua habilidade singular de usar hidrocarbonetos como fonte de carbono (SATOW et al., 2008; ZHAO et al., 2010; ATTILI-ANGELIS et al., 2014). Sabe-se que as formigas produzem uma ampla diversidade de compostos orgânicos que podem favorecer seletivamente o crescimento de fungos Chaetothyriales (VOGLMAYR et al., 2011).

Por outro lado, fungos negros oportunistas como *Sporothrix schenckii*, podem utilizar as formigas como veículo dispersor no ambiente e, assim, serem apenas transientes nos ninhos desses insetos.

Dois temas, praticamente inexplorados até o momento, devem ser melhor estudados para compreender a presença dos fungos negros no integumento das formigas: i) potencial enzimático desses isolados. O trabalho de Mendes et al. (2012) demonstrou que leveduras presentes nos jardins de fungo são capazes de utilizar compostos tóxicos presentes nos ninhos, contribuindo para a estabilidade da colônia; ii) relações com outros micro-organismos simbiontes das formigas. Fungos do gênero *Aureobasidium*, isolados de ninhos de *Atta sexdens*, são capazes de produzir toxinas que inibem o crescimento de outras leveduras (CARREIRO et al., 2002). Assim, é possível que os fungos negros produzam metabólitos que inibam outros fungos parasitas, auxiliando as formigas no controle de micro-organismos indesejados.

Os estudos sobre a relação dos fungos negros com as formigas Attini ainda são iniciais e podem revelar interessantes aspectos sobre a ecologia e interações entre os diversos micro-organismos presentes nos ninhos dessas formigas.

Fungos hialinos e leveduras

Apesar de não serem o objetivo desse estudo, aproximadamente 130 fungos hialinos e 18 leveduras também foram isolados das coletas de 2012 e 2013. As linhagens encontram-se depositadas na Central de Recursos Microbianos (UNESP, Rio Claro) e poderão fazer parte de futuros estudos. Uma prévia identificação de alguns isolados revelou a presença dos fungos hialinos *Purpureocillium lilacinus*, *Trichoderma harzianum* e *Penicillium*. Os táxons de leveduras encontrados foram *Cryptococcus laurentii*, *Erythrobasidium hasegawianum*, *Meyerozyma caribbica*, *Pseudozyma jejuensis*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Trichosporon montevideense*.

Referências

ABBAS, S. Q.; IFTKHAR, T.; NIAZ, M.; IFTIKHAR, N.; AYESHA, R.; ABBAS, A. A new species of *Catenulostroma* on *Azadirachta indica* from Pakistan. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v.45, p.119–121, 2013.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed. Amsterdam: Academic, 2005.

AJELLO, L.; McGINNIS, M. R.; CAMPER, J. An outbreak of phaeohyphomycosis in rainbow trout caused by *Scolecobasidium humicola*. **Mycopathologia**, Den Haag, v.62, p.15–22, 1977.

ALMAGUER, M.; ROJAS, T. I.; DOBAL, V.; BATISTA, A.; AIRA, M. J. Effect of temperature on growth and germination of conidia in *Curvularia* and *Bipolaris* species isolated from the air. **Aerobiologia**, Amsterdam, v.29, n.1, p.13–20, 2013.

ALMEIDA-PAES, R.; FRASES, S.; MONTEIRO, P. C. F.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; NOSANCHUK, J. D. Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. **Microbes and Infection**, Paris, v.11, n.5, p.554–562, 2009.

ANANDI, V.; SURYAWANSHI, N. B.; KOSHI, G.; PADHYE, A. A.; AJELLO, L. Corneal ulcer caused by *Bipolaris hawaiiensis*. **Medical Mycology**, Oxford, v.26, p.301–306, 1988.

ANDERSEN, B.; KRØGER, E.; ROBERTS, R. G. Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species-groups. **Mycological Research**, Cambridge, v.106, n.2, p.170–182, 2002.

APTROOT, A. *Mycosphaerella* and its anamorphs: 2. Conspectus of *Mycosphaerella*. **CBS Biodiversity Series**, Utrecht, v.5, p.1–231, 2006.

ARCURI, S. L.; PAGNOCCA, F. C.; MELO W. G. P.; NAGAMOTO, N. S.; KOMURA, D. L.; RODRIGUES, A. Yeasts found on an ephemeral reproductive caste of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.106, p.475–487, 2014.

ARZANLOU, M.; GROENEWALD, J. Z.; GAMS, W.; BRAUN, U.; SHIN, H. D.; CROUS, P. W. Phylogenetic and morphotaxonomic revision of *Ramichloridium* and allied genera. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.58, p.57–93, 2007.

ATTILI-ANGELIS, D.; DUARTE, A. P. M.; PAGNOCCA, F. C.; Nagamoto, N. S.; de Vries, M.; Stielow, J. B.; de Hoog, G. S. Novel *Phialophora* species from leaf-cutting ants (tribe Attini). **Fungal Diversity**, Dordrecht, v.65, p.65–75, 2014.

AUGUSTIN, J. O.; GROENEWALD, J. Z.; NASCIMENTO, R. J.; MIZUBUTI, E. S. G.; BARRETO, R. W.; ELLIOT, S. L.; EVANS H. C. Yet more "weeds" in the garden: Fungal novelties from nests of leaf-cutting ants. **PLoS ONE**, v.8, n.12, p.e82265, 2013.

BADALI, H.; GUEIDAN, C.; NAJAFZADEH, M. J.; BONIFAZ, A.; VAN DEN ENDE, A. H.; de HOOG, G. S. Biodiversity of the genus *Cladophialophora*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.61, p.175–191, 2008.

BADALI, H.; PRENAFETA-BOLDU, F. X.; GUARRO, J.; KLAASSEN, C. H.; MEIS, J. F.; de HOOG, G. S. *Cladophialophora psammophila*, a novel species of Chaetothyriales with a potential use in the bioremediation of volatile aromatic hydrocarbons. **Fungal biology**, Oxford, v.115, p.1019–1029, 2011.

BAI, Q. R.; HAN, S.; XIE, Y. Y. First Report of daylily leaf streak caused by *Kabatiella microsticta* in China. **Plant Disease**, Saint Paul, v.96, n.10, p.1579, 2012.

BAKHSHI, M.; ARZANLOU, M.; BABAI-AHARI, A.; GROENEWALD, J. Z.; BRAUN, U.; CROUS, P. W. Application of the consolidated species concept to *Cercospora* spp. from Iran. **Persoonia**, Utrecht, v.34, p.65–86, 2015.

BALAJEE, S. A.; SIGLER, L.; BRANDT, M. E. DNA and the classical way: Identification of medically important molds in the 21st century. **Medical Mycology**, Oxford, v.45, p.475–490, 2007.

BARON, N. C. **Identificação e caracterização de fungos melanizados com potencial de degradação de tolueno**. 2014. 113 f. Dissertação - (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2014.

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

BENSCH, K.; BRAUN, U.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. The genus *Cladosporium*. **Studies in Mycology**, v.72, p.1–401, 2012.

BENSCH, K.; GROENEWALD, J. Z.; BRAUN, U.; DIJKSTERHUIS, J.; de JESÚS YÁÑEZ-MORALES, M.; CROUS, P. W. Common but different: The expanding realm of *Cladosporium*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.82, p.23–74, 2015.

BERBEE, M. L.; PIRSEYEDI, M.; HUBBARD, S. *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. **Mycologia**, New York, v.91, p.964–977, 1999.

BIGI, M. F. M. A.; TORKOMIAN, V. L. V.; de GROOTE, S. T. C. S.; HEBLING, M. J.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; da SILVA, M. F. Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) and ricinine against the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus*. **Pest Management Science**, Sussex, v.60, n.9, p.933–938, 2004.

BRANDA, E.; TURCHETTI, B.; DIOLAIUTI, G.; PECCI, M.; SMIRAGLIA, C.; BUZZINI, P. Yeast and yeast-like diversity in the southernmost glacier of Europe (Calderone Glacier, Apennines, Italy). **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.72, p.354–369, 2010.

BRANDÃO, C.R.F.; MAYHÉ-NUNES, A.J.; SANHUDO, C.E.D. Taxonomia e filogenia das formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T.M.C. (Ed) **Formigas-cortadeiras**: da bioecologia ao manejo. Viçosa, MG: Editora UFV, 2011.

BRAUN, U.; CROUS, P. W.; DUGAN, F.; GROENEWALD, J. Z.; de HOOG, G. S. Phylogeny and taxonomy of *Cladosporium*-like hyphomycetes, including *Davidiella* gen. nov., the teleomorph of *Cladosporium* s. str. **Mycological Progress**, Tübingen, v.2, n.1, p.3–18, 2003.

BUBNOVA, E. N. Fungal diversity in bottom sediments of the Kara Sea. **Botanica Marina**, Hamburg, v.53, p.595–600, 2010.

BUSSABAN, B.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; SEELANAN, T.; PARK, D. C.; McKENZIE, E. H.; HYDE, K. D. Molecular and morphological characterization of *Pyricularia* and allied genera. **Mycologia**, New York, v.97, n.5, p.1002–1011, 2005.

CAFARO, M.J.; POULSEN, M.; LITTLE, A.E.F.; PRICE, S. L.; GERARDO, N. M.; WONG, B.; STUART, A. E.; LARGET, B.; ABBOT, P.; CURRIE, C. R. Specificity in the symbiotic association between fungus-growing ants and protective *Pseudonocardia* bacteria. **Proceedings of the Royal Society B**, London, v.278, n.1713, p.1814–1822, 2011.

CAI, L.; TSUI, C.K.M.; ZHANG, K.; HYDE, K. D. Aquatic fungi from Lake Fuxian. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v.9, p.57–70, 2002.

CÂMARA, M. P. S.; PALM, M. E.; van BERKUM, P.; STEWART, E. L. Systematics of *Paraphaeosphaeria*: a molecular and morphological approach. **Mycological Research**, Cambridge, v.105, n.1, p.41–56, 2001.

CAMPOLINA, S. S.; CALIGIORNE, R. B.; REZENDE-SILVA, S.; HAHN, R. C.; de HOOG, G. S. A skin infection mimicking chromoblastomycosis by a Capnodialean fungus. **Medical Mycology**, Oxford, v.47, p.81–85, 2009.

CARETTA, G.; TOSI, S.; PIONTELLI, E.; de HOOG, G. S. *Phialophora sessilis*, a lithobiont fungus. **Mycotaxon**, Ithaca, v.95, p.281–284, 2006.

CARISSE, O.; BERNIER, J. *Microsphaeropsis ochracea* sp. nov. associated with dead apple leaves. **Mycologia**, New York, v.94, n.2, p.297–301, 2002.

CARLOS, A.A.; RODRIGUES, A.; FORTI, L.C.; PASSADOR, M.M.; SIERRA, J.F. Filamentous fungi in *Atta sexdens rubropilosa* colonies after treatment with different bait formulations. **Journal of Applied Entomology**, Germany, v.135, p.326–331, 2011.

CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI Jr, M.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J.; MIDDELHOVEN, W. J. Occurrence of killer yeasts in leaf-cutting ant nests. **Folia Microbiologica**, Praga, v.47, n.3, p.259–262, 2002.

CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI Jr, M.; LACHANCE, M. A.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J.; RUIVO, C. C.; ROSA, C. A. *Sympodiomyces attinorum* sp.nov., a yeast species associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.54, n.5, p.1891–1894, 2004.

CHAN, G. F.; PUAD M. S. A.; CHIN C. F.; RASHID, N. A. Emergence of *Aureobasidium pullulans* as human fungal pathogen and molecular assay for future medical diagnosis. **Folia Microbiologica**, Praga, v.56, p.459–467, 2011.

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.1691–1694, 1994.

CHECA, J.; RAMALEY, A. W.; PALM-HERNÁNDEZ, M. E., CÂMARA, M. P. S. *Paraphaeosphaeria barrii*, a new species on *Yucca schidigera* from Mexico. **Mycological Research**, Cambridge, v.106, n.3, p.375–379, 2002.

CONNELL, L.; STAUDIGEL, H. Fungal diversity in a Dark Oligotrophic Volcanic Ecosystem (DOVE) on Mount Erebus, Antarctica. **Biology**, Basel, v.2, p.798–809, 2013.

COSTA, A. R.; PORTO, E.; TABUTI, A. H.; LACAZ, C. S.; SAKAI-VALENTE, N. Y.; MARANHÃO, W. M.; RODRIGUES, M. C. Subcutaneous pheaohyphomycocis caused by *Bipolaris hawaiiensis*. A case report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.33, p.74–79, 1991.

CRAWFORD, S. J.; CHEN, S. C. -A.; HALLIDAY, C.; RANGAN, G. K.; GOTTLIEB, T.; REID, A. B. *Microsphaeropsis arundinis* skin and soft tissue infection in renal transplant recipients: three case reports and a review of the literature. **Transplant Infectious Disease**, Boston, v.17, n.6, p.915–920, 2015.

CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z.; GROENEWALD, M.; CALDWELL, P.; BRAUN, U.; HARRINGTON, T. C. Species of *Cercospora* associated with grey leaf spot of maize. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.55, p.89–197, 2006.

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

CROUS, P. W.; SCHUBERT, K.; BRAUN, U.; de HOOG, G. S.; HOCKING, A. D.; SHIN, H. D.; GROENEWALD, J. Z. Opportunistic, human-pathogenic species in the Herpotrichiellaceae are phenotypically similar to saprobic or phytopathogenic species in the Venturiaceae. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.58, p.185–217, 2007b.

CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z.; SUMMERELL, B. *Exophiala placitae*. **Fungal Planet**, Utrecht, n.17, 2007c.

CROUS, P. W.; WINGFIELD, M. J.; GROENEWALD, J. Z. Niche sharing reflects a poorly understood biodiversity phenomenon. **Persoonia**, Utrecht, v.22, p.83–94, 2009a.

CROUS, P. W.; VERKLEY, G. J. M.; GROENEWALD, J. Z.; SAMSON, R. A. **CBS Laboratory Manual Series 1**: Fungal Biodiversity. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2009b.

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

CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z. *Exophiala encephalarti*. Fungal Planet 58. **Persoonia**, Utrecht, v.25, p.136–137, 2010.

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

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

CROUS, P. W.; SUMMERELL, B. A.; SWART, L.; DENMAN, S.; TAYLOR, J. E.; BEZUIDENHOUT, C.M.; PALM, M. E.; MARINCOWITZ, S.; GROENEWALD, J. Z. Fungal pathogens of Proteaceae. **Persoonia**, Utrecht, v.27, p.20–45, 2011.

CROUS, P. W.; SHIVAS, R. G.; WINGFIELD, M. J. et al. Fungal Planet description sheets: 128-153. **Persoonia**, Utrecht, v.29, p.146–201, 2012.

CROUS, P. W.; BRAUN, U.; HUNTER, G. C.; WINGFIELD, M. J.; VERKLEY, G. J.; SHIN, H. D.; NAKASHIMA, C.; GROENEWALD, J. Z. Phylogenetic lineages in *Pseudocercospora*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.75, p.37–114, 2013.

CROUS, P. W.; HAWKSWORTH, D. L.; WINGFIELD, M. J. Identifying and naming plant-pathogenic fungi: Past, present, and future. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.53, p.247–267, 2015.

CURRIE, C.R.; SCOTT, J.A.; SUMMERBELL, R.C.; MALLOCH, D. Fungus-growing ants use antibioticproducing bacteria to control garden parasites. **Nature**, v.398, p.701–704, 1999a.

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

CURRIE, C. R.; STUART, A. E. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.268, n.1471, p.1033–1039, 2001.

da CUNHA, K. C.; SUTTON, D. A.; FOTHERGILL, A. W.; CANO, J.; GENÉ, J.; MADRID, H.; de HOOG, G. S.; CROUS, P. W.; GUARRO, J. Diversity of *Bipolaris* species in clinical samples in the United States and their antifungal susceptibility profiles. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.50, n.12, p.4061–4066, 2012.

da ROSA, A. C.; SCROFERNEKER, M. L.; VETTORATO, R.; GERVINI, R. L.; VETTORATO, G.; WEBER, A. Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. **Journal of the American Academy of Dermatology**, Saint Louis, v.52, p.451–459, 2005.

de HOOG, G.S.; QUEIROZ-TELLES, F.; HAASE, G.; FERNANDEZ-ZEPPENFELDT, G.; ATTILI-ANGELIS, D.; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H.; 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**, Oxford, v.38, p.243–250, 2000.

de HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M. J. **Atlas of clinical fungi.** 2. ed. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2001.

de HOOG, G. S.; VICENTE, V.; CALIGIORNE, R. B.; KANTARCIOGLU, S.; TINTELNOT, K.; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H.; HAASE, G. Species diversity and polymorphism in the *Exophiala spinifera* clade containing opportunistic black yeast-like fungi. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, n.10, p.4767–4778, 2003.

de HOOG, G.S.; ZENG, J.S.; HARRAK, M. J.; SUTTON, D. A. *Exophiala xenobiotica* sp. nov., an opportunistic black yeast inhabiting environments rich in hydrocarbons. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.90, n.3, p.257–268, 2006.

de HOOG, G. S.; NISHIKAKU, A. S.; FERNÁNDEZ ZEPPENFELDT, G.; PADÍN-GONZÁLEZ, C.; BURGER, E.; BADALI, H.; RICHARD-YEGRES, N.; VAN DEN ENDE, A. H. Molecular analysis and pathogenicity of the *Cladophialophora carrionii* complex, with the description of a novel species. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.58, p.219–234, 2007.

de HOOG, G. S.; VICENTE, V. A.; NAJAFZADEH, M. J.; HARRAK, M. J.; BADALI, H.; SEYEDMOUSAVI, S. Waterborne *Exophiala* species causing disease in cold-blooded animals. **Persoonia**, Utrecht, v.27, p.46–72, 2011.

de MEYER, E. M.; de BEER, Z. W.; SUMMERBELL, R. C.; MOHARRAM, A. M.; de HOOG, G. S.; VISMER, H. F.; WINGFIELD, M. J. Taxonomy and phylogeny of new wood- and soil-inhabiting *Sporothrix* species in the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. **Mycologia**, New York, v.100, n.4, p.647–661, 2008.

DELLA LUCIA, T.M.C.; SOUZA, D.J. Importância e história de vida das formigas cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T.M.C. (Ed) Formigas-cortadeiras: da bioecologia ao manejo. Viçosa, MG: Editora UFV, 2011.

DIEHL-FLEIG, E.; LABRES, M.E.V. Fungi isolated from leaf-cutting ants *Atta sexdens piriventris* and *Acromyrmex heyeri* (Hymenoptera-Formicidae): *Mucor* effects on *Beauveria bassiana* entomopathogen. **Ciência e Cultura**, Campinas, v.45, n.2, p.142-144, 1993.

DIGHTON, J.; TUGAY, T.; ZHDANOVA, N. Fungi and ionizing radiation from radionuclides. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.281, n.2, p.109–120, 2008.

DUARTE, AP.M. **Fungos negros isolados de Atta spp.**: diversidade e fatores de virulência. 2013. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP. 2013.

DUARTE, A.P.M.; ATTILI-ANGELIS, D.; BARON, N.C.; FORTI, L. C.; PAGNOCCA, F. C. Leaf-cutting ants: an unexpected microenvironment holding human opportunistic black fungi. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.106, n.3, p.465–73, 2014.

DUGAN, F. M.; SCHUBERT, K.; BRAUN, U. Check-list of *Cladosporium* names. **Schlechtendalia**, Halle, v.11, p.1–103, 2004.

ELLIS, M. B. **Dematiaceous hyphomycetes**. Surrey: CMI, Kew, 1971.

ELSEBAI, M. F.; KEHRAUS, S.; LINDEQUIST, U.; SASSE, F.; SHAABAN, S.; GÜTSCHOW, M.; JOSTEN, M.; SAHL, H. G.; KÖNIG, G. M. Antimicrobial phenalenone derivatives from the marine-derived fungus *Coniothyrium* cereale. **Organic & Biomolecular Chemistry**, Cambridge, v.9, p.802–808, 2011.

FARZANEH, M.; JAVAN-NIKKHAH, M.; FOTOURIFAR, K. B.; MOJENI, K. H. Fungi associated with leaf spots of nutsedge plants (*Cyperus* spp.) in north of Iran. **Rostaniha**, Tehran, v.10, n.1, p.35–37, 2009.

FERNÁNDEZ-MARÍN, H.; ZIMMERMAN, J.K.; REHNER, S.A.; WCISLO, W. T. Active use of the metapleural glands by ants in crontolling fungal infection. **Proceedingof the Royal Society of London, Series B**, London, v.273, n.1594, p.1689–1695, 2006.

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

FOLGARAIT, P.; GOROSITO, N.; POULSEN, M.; CURRIE, C. R. Preliminary in vitro insights into the use of natural fungal pathogens of leaf-cutting ants as biocontrol agents. **Current Microbiology**, New York, v.63, p.250, 2011.

FRANK, J.; CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z.; OERTEL, B.; HYDE, K. D.; PHENGSINTHAM, P.; SCHROERS, H. J. *Microcyclospora* and *Microcyclosporella*: novel genera accommodating epiphytic fungi causing sooty blotch on apple. **Persoonia**, Utrecht, v. 24, p.93–105, 2010.

GAMS, W. *Phialophora* and some similar morphologically little-differentiated anamorphs of divergent ascomycetes. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.45, p.187–199, 2000.

GE, H. M.; SONG, Y. C.; CHEN, J. R.; HU, S.; WU, J. Y.; TAN, R. X. Paranolin: a new xanthene-based metabolite from *Paraphaeosphaeria nolinae*. **Helvetica Chimica Acta**, Basel, v.89, p.502–506, 2006.

GE, Y. P.; LV, G. X.; SHEN, Y. N.; LI, M.; DENG, S. W.; de HOOG, G. S.; SAMERPITAK, K.; LIU, W. D. First report of subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Ochroconis tshawytschae* in an immunocompetent patient. **Medical Mycology**, Oxford, v.50, p.637–640, 2012.

GENÉ, J.; MERCADO-SIERRA, A.; GUARRO, J. *Dactylaria cazorlii* and *Hansfordia catalonica*, two new hyphomycetes from litter in Spain. **Mycological Research**, Cambridge, v.104, p.1404–1407, 2000.

GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G.; de HOOG, G.S. Variability and molecular diagnostics of the neurotropic species *Cladophialophora bantiana*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.43, p.151–162, 1999.

GESSLER, N. N.; EGOROVA, A. S.; BELOZERSKAYA, T. A. Melanin Pigments of Fungi under Extreme Environmental Conditions (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v.50, n.2, p.105–113, 2014.

GOETSCH, V.W.; STOPPEL, R. Die Pilze der Blattschneiderameisen.**Naturwissenschaften**, Germany, v.28, p.764–765, 1940.

GOH, T.K.; HYDE, K. D. A revision of *Dactylaria*, with description of *D. tunicata* sp. nov. from submerged wood in Australia. **Mycological Research**, Cambridge, v.101, p.1265–1272, 1997.

GOODWIN, S. B.; DUNKLE, L. D.; ZISMANN, V. L. Phylogenetic analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. **Phytopathology**, Saint Paul, v.91, n.7, p.648–658, 2001.

GORDON, R. A.; SUTTON, D. A.; THOMPSON, E. H.; SHRIKANTH, V.; VERKLEY, G. J.; STIELOW, J. B.; MAYS, R.; OLESKE, D.; MORRISON, L. K.; LAPOLLA, W. J.; GALFIONE, S.; TYRING, S.; SAMATHANAM, C. A.; FU, J.; WICKES, B. L.; MULANOVICH, V.; WANGER, A.; ARIAS, C. A. Cutaneous phaeohyphomycosis caused by *Paraconiothyrium cyclothyrioides*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.50, n.3795–3798, 2012.

GOSTINČAR, C.; GRUBE, M.; GUNDE-CIMERMAN, N. Evolution of fungal pathogens in domestic environments? **Fungal Biology**, UK, v.115, p.1008–1018, 2011.

GRANDI, R. A. P.; GUSMÃO, L. F. P. Decomposing hyphomycetes on leaf litter of *Tibouchina pulchra* Cogn. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.25, p.79–87, 2002.

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

GÜMRAL, R.; TÜMGÖR, A.; SARAÇLI, M. A.; YILDIRAN, S. T.; ILKIT, M.; de HOOG, G. S. Black yeast diversity on creosoted railway sleepers changes with ambient climatic conditions. **Microbial Ecology**, New York, v.68, n.4, p.699–707, 2014.

GUNDE-CIMERMAN, N.; ZALAR, P.; de HOOG, G. S.; PLEMENITAŠ, A. Hypersaline Waters in salterns - natural ecological niches for halophilic black yeasts. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.32, p.235–240, 2000.

GUNDE-CIMERMAN, N.; BUTINAR, L.; SONJAK, S.; Turk, M.; URŠIČ, V.; ZALAR, P.; PLEMENITAŠ, A. Halotoleranty and halophilic fungi from coastal environments in the arctics. In: GUNDE-CIMERMAN, N.; OREN, A.; PLEMENITAŠ, A. (Eds.). **Adaptation to life at high salt concentrations in Archaea, Bacterya and Eucaria**. Springer: The Netherlads, 2005, p.398–423.

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

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

HALL, M.; KEELING, J.; BRUMBLE, L. *Microsphaeropsis arundinis*: Case report of cutaneous infection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, Saint Louis, v.60, n.3, p.AB115, 2009.

HAWKSWORTH, D. L. Global species numbers of fungi: are tropical studies and molecular approaches contributing to a more robust estimate? **Biodiversity and Conservation**, London, v.21, p.2425–2433, 2012.

HIBBETT, D. S.; TAYLOR, J. W. Fungal systematics: is a new age of enlightenment at hand? **Nature Reviews Microbiology**, London, v.11, p.129–133, 2013.

HOFFMANN, P. *Cryopreservation of fungi*. World Federation of Culture Collections. Technical Information Sheet No. 5. NESCO/ WFCC/Education Committee, 1989.

HÖLKER, U.; BEND, J.; PRACHT, R.; TETSCH, L.; MÜLLER, T.; HÖFER, M.; de HOOG, G. S. *Hortaea acidophila*, a new acid-tolerant black yeast from lignite. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.86, n.4, p.287–294, 2004.

HORMAZABAL, E.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; ASTUDILLO, L.; RODRÍGUEZ, J.; THEODULOZ, C. Metabolites from *Microsphaeropsis olivacea*, an endophytic fungus of *Pilgerodendron uviferum*. **Zeitschrift für Naturforschung**, Tubingen, v.60c, p.11–21, 2005.

HORRÉ, R.; de HOOG, G. S. Primary cerebral infections by melanized fungi: a review. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.43, p.176–193, 1999.

HUGHES, W.O.H.; THOMSEN, L.; EILENBERG, J.; BOOMSMA, J.J. Diversity of entomopathogenic fungi near leaf-cutting ant nests in a neotropical forest, with particular

reference to *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, USA, v.85, n.1, p.46–53, 2004.

HUGHES, D.P.; EVANS, H.C.; HYWEL-JONES, N.; BOOMSMA, J.J.; ARMITAGE, S.A.O. Novel fungal disease in complex leaf-cutting ant societies. **Ecological Entomology**, UK, v.34, n.2, p.214–220, 2009.

HYDE, K. D.; GOH, T. K. Fungi on submerged wood in Lake Barrine, north Queensland, Australia. **Mycological Research**, Cambridge, v.102, p.739–749, 1998.

IRAM, S.; AHMAD, I.; NASIR, K.; AKHTAR, S. Study of fungi from the contaminated soils of peri-urban agricultural areas. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v.43, n.4, p.2225–2230, 2011.

JOSHI, A. K.; CHAND, R.; KUMAR, S.; SINGH, R. P. Leaf tip necrosis: a phenotypic marker associated with resistance to spot blotch disease in wheat. **Crop Science**, Madison, v.44, p.792–796, 2004.

JOSHI, A.; SINGH, R.; SHAH, M. S.; UMESH, S.; KHATTRY, N. Subcutaneous mycosis and fungemia by *Aureobasidium pullulans*: a rare pathogenic fungus in a post allogeneic BM transplant patient. **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke, v.45, p.203–204, 2010.

KADIR, J. B.; CHARUDATTAN, R.; STALL, W. M.; BRECKE, B. J. Field efficacy of *Dactylaria higginsii* as a bioherbicide for the control of purple nutsedge (*Cyperus rotundus*). **Weed Technology**, Champaign, v.14, p.1–6, 2000.

KANTARCLOGLU, A. S.; de HOOG, G. S. Infections of the central nervous system by melanized fungi: a review of cases presented between 1999 and 2004. **Mycoses**, Berlin, v.47, p.4–13, 2004.

KIMBER, R. B. E.; PAULL, J. G. Identification and genetics of resistance to cercospora leaf spot (*Cercospora zonata*) in faba bean (*Vicia faba*). **Euphytica**, Wageningen, v.177, n.3, p.419–429, 2011.

KLAUBAUF, S.; THARREAU, D.; FOURNIER, E.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W.; de VRIES, R. P.; LEBRUN, M. H. Resolving the polyphyletic nature of *Pyricularia* (Pyriculariaceae). **Studies in Mycology**, Utrecht, v.79, p.85–120, 2014.

KLUGER, E. K.; DELLA TORRE, P. K.; MARTIN, P.; KROCKENBERGER, M. B.; MALIK, R. Concurrent *Fusarium chlamydosporum* and *Microsphaeropsis arundinis* infections in a cat. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.6, n.4, p.271–277, 2004.

KOSHI, G.; AANADI, V.; KURIEN, M.; KIRUBAKARAN, M. G.; PADHYE, A. A.; AJELLO, L. Nasal phaeohyphomycosis caused by *Bipolaris hawaiiensis*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Oxford, v.25, p.397–402, 1987.

KREISEL, H. Pilze aus pilzgärten von *Atta insularis* in Kuba. **Z Allg Mikrobiol**, Berlin, v.12, n.8, p.643-654, 1972.

KROCKENBERGER, M. B.; MARTIN, P.; HALLIDAY, C.; ROTHWELL, T. L.; CLARKE, K.; MALIK, R. Localised *Microsphaeropsis arundinis* infection of the subcutis of a cat. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, Thousand Oaks, v.12, p.231–236, 2010.

KRUYS, Å.; ERIKSSON, O. E.; WEDIN, M. Phylogenetic relationships of coprophilous Pleosporales (Dothideomycetes, Ascomycota), and the classification of some bitunicate taxa of unknown position. **Mycological Research**, Cambridge, v.110, p.527–536, 2006.

KUBAK, B. M.; HUPRIKAR, S. S.; the AST Infectious Diseases Community of Practice. Emerging & rare fungal infections in solid organ transplant recipients. **American Journal of Transplantation**, Durham, v.9, p.208–226, 2009.

KUMAR, J.; SCHÄFER, P.; HÜCKELHOVEN, R.; LANGEN, G.; BALTRUSCHAT, H.; STEIN, E.; NAGARAJAN, S.; KOGEL, K. H. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control. **Molecular plant pathology**, London, v.3, n.4, p.185–195, 2002.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.73, n.4, p.331–371, 1998.

KUTLEŠA, M.; MLINARIĆ-MISSONI, E.; HATVANI, L.; VONCINA, D.; SIMON, S.; LEPUR, D.; BARSŠIC, B. Chronic fungal meningitis caused by *Aureobasidium proteae*. **Diagnostic Microbiology & Infectious Disease**, New York, v.73, n.3, p.271–272, 2012.

KUTORGA, E.; IRŠĖNAITĖ, R.; IZNOVA, T.; KASPARAVICIUS, j.; MARKOVSKAJA, S.; MOTIEJUNAITE, J. Species diversity and composition of fungal communities in a Scots pine forest affected by the great cormorant colony. **Acta Mycologica**, Warszawa, v.48, n.2, p.173–188, 2013.

LEAHY, R. M.; SCHUBERT, T. S. Daylily leaf streak. **Plant Pathology Circular**, Florida, v.376, p.1–3, 1996.

LEATHERS, T. D. Biotechnological production and applications of pullulan. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.62, p.468–473, 2003.

LI, D. M.; de HOOG, G. S. Cerebral phaeohyphomycosis-a cure at what lengths? **The Lancet Infectious Diseases**, London, v.9, p.376–83, 2009.

LI, D. M.; LI, R. Y.; de HOOG, G. S.; WANG, Y. X.; WANG, D. L. *Exophiala asiatica*, a new species from a fatal case in China. **Medical Mycology**, Oxford, v.47, n.1, p.101–109, 2009.

LIAN, X.; de HOOG, G. S. Indoor wet cells harbour melanized agents of cutaneous infection. **Medical Mycology**, Oxford, v.48, p.622–628, 2010.

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.

LITTLE, A.E.; CURRIE, C.R. Black yeast symbionts compromise the efficiency of antibiotic defenses in fungus-growing ants. **Ecology**, Washington, v.89, p.1216–1222, 2008.

LOPES-BEZERRA, L. M.; SCHUBACH, A.; COSTA, R. O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.78, n.2, p.293–308, 2006.

LUCIANO, H.M.; DIEHL-FLEIG, E.; SILVA, M.E. Organismos associados a uma colônia de *Acromyrmex heyeri* (Hymenoptera: Formicidae) mantida em laboratório. **Acta Biologica Leopoldensia**, São Leopoldo, v.17, n.2, p.47-56, 1995.

LUO, J.; LIU, X.; LI, E.; GUO, L.; CHE, Y. Arundinols A−C and Arundinones A and B from the Plant Endophytic Fungus *Microsphaeropsis arundinis*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.76, p.107–112, 2013.

MACHOUART, M.; SAMERPITAK, K.; de HOOG, G.S.; GUEIDAN, C. A multigene phylogeny reveals that *Ochroconis* belongs to the family Sympoventuriaceae (Venturiales, Dothideomycetes). **Fungal Diversity**, Dordrecht, v.65, n.1, p.77–88, 2014.

MANAMGODA, D. S.; CAI, L.; BAHKALI, A. H.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K. D. *Cochliobolus*: an overview and current status of species. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v.51, p.3–42, 2011.

MANAMGODA, D. S.; ROSSMAN, A. Y.; CASTLEBURY, L. A.; CROUS, P. W.; MADRID, H.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K. D. The genus *Bipolaris*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.79, p.221–288, 2014.

MANTOVANI, J. D. **Descrição da diversidade de fungos associados a formigas Attini por método independente de cultivo**. 2013. 60 f. Dissertação - (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2013.

MARIMON, R.; GENÉ, J.; CANO, J.; TRILLES, L.; DOS SANTOS LAZÉRA, M.; GUARRO, J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, p.3251–3256, 2006.

MARIMON, R.; CANO, J.; GENÉ, J.; SUTTON, D. A.; KAWASAKI, M.; GUARRO, J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, p.3198–3206, 2007.

MARTIN-SANCHEZ, P. M.; NOVÁKOVÁ, A.; BASTIAN, F.; ALABOUVETTE, C.; SAIZ-JIMENEZ, C. Two new species of the genus *Ochroconis*, *O. lascauxensis* and *O. anomala* isolated from black stains in Lascaux Cave, France. **Fungal biology**, Oxford, v.116, p.574–589, 2012.

MASIULIONIS, V. E.; CABELLO, M. N.; SEIFERT, K. A.; RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F. C. *Escovopsis trichodermoides* sp. nov., isolated from a nest of the lower attine ant *Mycocepurus goeldii*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.107, n.3, p.731–740, 2015.

MASIULIONIS, V. E.; PAGNOCCA, F. C. *Wickerhamomyces spegazzinii* sp. nov., a new ascomycetous yeast isolated from the fungus garden of *Acromyrmex lundii* nest (Hymenoptera: Formicidae) from Santa Fe, Argentina. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, 2016.

MAZUR, J. E.; JUDSON, M. A. A case report of a *Dactylaria* fungal infection in a lung transplant patient. **Chest**, Chicago, v.119, n.2, p.651–653, 2001.

MATSUSHIMA, T. **Icones microfungorum a Matsushima lectorum**. Published by the author: Kobe, Japan, 1975.

McCULLERS, M. K.; YOUNG, J.; DIAZ, P. *Aureobasidium* pulmonary infection in an elderly woman with *Mycobacterium avium* complex. **Chest**, Chicago, v.134, n.4, p. c51001–c51001, 2008.

McQUILKEN, M. P.; CHALTON, D. Potential for biocontrol of sclerotinia rot of carrot with foliar sprays of Contans® WG (*Coniothyrium minitans*). **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v.19, n.2, p.229–235, 2009.

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

MEIRELLES, L. A.; MONTOYA, Q. V.; SOLOMON, S. E.; RODRIGUES, A. New light on the systematics of fungi associated with attine ant gardens and the description of *Escovopsis kreiselii* sp. nov. **PLoS ONE**, California, v.10, n.1, p.e0112067, 2015.

MELATI, R. B. **Ocorrência de fungos negros em ambientes domésticos**. 2015. 39f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2015.

MELO, W. G. P.; ARCURI, S. L.; RODRIGUES, A.; MORAIS, P. B.; MEIRELLES, L. A.; PAGNOCCA, F. C. *Starmerella aceti* f.a., sp. nov., an ascomycetous yeast species isolated from fungus garden of the leafcutter ant *Acromyrmex balzani*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.64, p.1428–1433, 2014.

MENDES, T. D.; RODRIGUES, A.; DAYO-OWOYEMI, I.; MARSON, F. A.; PAGNOCCA, F. C. Generation of nutrients and detoxification: Possible roles of yeasts in leaf-cutting ant nests. **Insects**, Basel, v.3, p.228–245, 2012.

MERIDEN, Z.; MARR, K. A.; LEDERMAN, H. M.; ILLEI, P. B.; VILLA, K.; RIEDEL, S.; CARROLL, K. C.; ZHANG, S. X. *Ochroconis gallopava* infection in a patient with chronic granulomatous disease: case report and review of the literature. **Medical Mycology**, Oxford, v.50, p.883–889, 2012.

MESQUITA, N.; PORTUGAL, A.; VIDEIRA, S.; RODRÍGUEZ-ECHEVERRÍA, S.; BANDEIRA, A. M. L.; SANTOS, M. J. A.; FREITAS, H. Fungal diversity in ancient documents. A case study on the Archive of the University of Coimbra. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v.63, p.626–629, 2009.

MIDDELHOVEN, W. J.; FONSECA, A.; CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C. *Cryptococcus haglerorum*, sp. nov., na anamorphic basidiomycetous yeast isolated from nests of the leafcutting ant *Atta sexdens*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.83, p.167–174, 2003.

MÖLLER, A. Die Pilzgärten einiger südamerikanischer Ameisen. **Bot Mitt Trop**, Germany, v.6, p.1–27, 1893.

MONTOYA, Q. V.; MEIRELLES, L. A.; CHAVERRI, P.; RODRIGUES, A. Unraveling *Trichoderma* species in the attine ant environment: description of three new taxa. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, 2016.

MOREIRA, S. M.; RODRIGUES, A.; FORTI, L. C.; NAGAMOTO, N. S. Absence of the parasite *Escovopsis* in fungus garden pellets carried by gynes of *Atta sexdens*. **Sociobiology**, Feira de Santana, v.62, n.1, p.34–38, 2015.

MORIO, F.; LE BERRE, J.-Y.; GARCIA-HERMOSO, D.; NAJAFZADEH, M. J.; de HOOG, G. S.; BENARD, L.; MICHAU, C. Phaeohyphomycosis due to *Exophiala xenobiotica* as a cause of fungal arthritis in an HIV-infected patient. **Medical Mycology**, Oxford, v.50, n.5, p.513–517, 2012.

MOUBASHER, A. H.; ISMAIL, M. A.; HUSSEIN, N. A.; GOUDA, H. A. A. Terrestrial fungi tolerating the hypersaline water of Wadi El-Natrun Lakes, Egypt. **Journal of Basic & Applied Mycology, Egypt**, Assiut, v.4, p.47–58, 2013.

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

MUCHOVEJ, J.J.; DELLA LUCIA, T.M.; MUCHOVEJ, R.M.C. *Leucoagaricus weberi* sp.nov. from a live nest of leaf-cutting ants. **Mycological Research**, USA, v.95, n.11, p.1308-1311, 1991.

NOBUO, H.; NIICHIRO, A. Characteristics of recent fungal contamination in bathrooms. **Journal of Urban Living Health Association**, Kita-ku, v.52, p.98–106, 2008.

NONNENMANN, M. W.; CORONADO, G.; THOMPSON, B.; GRIFFITH, W. C.; HANSON, J. D.; VESPER, S.; FAUSTMAN, E. M. Utilizing pyrosequencing and quantitative PCR to characterize fungal populations among house dust samples. **Journal of Environmental Monitoring**, Cambridge, v.14, p.2038, 2012.

O'BRIEN, B. L.; PARRENT, J. L.; JACKSON, J. A.; MONCALVO, J. M.; VILGALYS, R. Fungal community analysis by largescale sequencing of environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.71, p.5544–5550, 2005.

ORLOWSKA, M.; LENGIEWICZ, I.; SUSZYCKA, M. Hyphomycetes developing on water plants and bulrushes in fish ponds. **Polish Journal of Environmental Studies**, Olsztyn, v.13, p.703–707, 2004.

ORTIZ, A.; ORDUZ, S. In vitro evaluation of *Trichoderma* and *Gliocladium* antagonism against the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. **Mycopathologia**, Den Haag, v.150, n.2, p.53–60, 2001.

PAGNOCCA, F. C.; VICTOR, S. R.; BUENO, F. C.; CRISÓSTOMO, F. R.; CASTRAL, T. C.; FERNANDES, J. B.; CORRÊA, A. G.; BUENO, O. C.; BACCI Jr, M.; HEBLING, M. J. A.; VIEIRA, P. C.; da SILVA, F. G. F. Synthetic amides toxic to the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* L. and its symbiotic fungus. **Agricultural and Forest Entomology**, Penicuik, v.8, p.17–23, 2006.

PAGNOCCA, F.C.; RODRIGUES, A.; NAGAMOTO, N.S.; BACCI Jr, M. Yeast and filamentous fungi carried by the gynes of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, Praga, v.94, p.517–526, 2008.

PAGNOCCA, F. C.; LEGASPE, M. F. C; RODRIGUES, A.; RUIVO, 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**, Reading, v.60, p.1454–1459, 2010.

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

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

PARK, S. -G.; OH, S. -H.; SUH, S. -B.; LEE, K. H.; CHUNG, K. Y. A case of chromoblastomycosis with an unusual clinical manifestation caused by *Phialophora verrucosa* on an unexposed area: treatment with a combination of amphotericin B and 5-flucytosine. **British Journal of Dermatology**, Oxford, v.152, n.3, p.560–564, 2005.

PASSARINI, M. R.; MIQUELETTO, P. B.; de OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D. Molecular diversity of fungal and bacterial communities in the marine sponge *Dragmacidon reticulatum*. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v.55, n.2, p.207–220, 2015.

PAULUS, B.; GADEK, P.; HYDE, K. D. Two new species of *Dactylaria* (anamorphic fungi) and an update of species in *Dactylaria* sensu lato. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v.14, p.143–156, 2003.

PAZ, Z.; ZELAZOWSKA, M. K.; DRUZHININA, I. S.; AVESKAMP, M. M.; SHNAIDERMAN, A.; ALUMA, Y.; CARMELI, S.; ILAN, M.; YARDEN, O. Diversity and potential antifungal properties of fungi associated with a Mediterranean sponge. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v.42, p.17–26, 2010.

PENDLE, S.; WEEKS, K.; PRIEST, M.; GILL, A.; HUDSON, B.; KOTSIOU, G.; PRITCHARD, R. Phaehyphomycotic soft tissue infections caused by the Coelomycetous fungus *Microsphaeropsis arundis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.42, p.5315–5319, 2004.

PEREIRA, S. A.; MENEZES, R. C.; GREMIÃO, I. D. F.; SILVA, J. N.; HONSE, C. O.; FIGUEIREDO, F. B.; da SILVA, D. T.; KITADA, A. A.; dos REIS, E. G.; SCHUBACH, T. M. Sensitivity of cytopathological examination in the diagnosis of feline sporotrichosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, Thousand Oaks, v.13, p.220–223, 2011.

PEREIRO Jr, M.; FERREIRÓS, M. P.; de HOOG, G. S.; TORIBIO, J. Cutaneous infection caused by *Alternaria* in patients receiving tacrolimus. **Medical Mycology**, Oxford, v.42, n.3, p.277–282, 2004.

PHOTITA, W.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; HYDE, K. D. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. **Mycological Research**, Cambridge, v.105, n.12, p.1508–1513, 2001.

PINTO, J. J. O.; GALON, L.; DAL MAGRO, T.; PROCÓPIO, S. O.; CONCENÇO, G.; PINHO, C. F. V; FERREIRA, E. A. Controle de Capim-Arroz (*Echinochloa* spp.) em função de métodos de manejo na cultura do arroz irrigado. **Planta daninha**, Rio de Janeiro, v.26, n.4, p.767–777, 2008.

PRENAFETA-BOLDÚ, F.X.; SUMMERBELL, R.C.; de HOOG, G.S. Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard. **FEMS Microbiology Reviews**, USA, v.30, p.109– 130, 2006.

PROMPUTTHA, L.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; McKENZIE, E. H. C.; HYDE, K. D. Fungal succession on senescent leaves of *Manglietia garrettii* in Doi Suthep-Pui National Park, northern Thailand. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v.10, p.89–100, 2002.

QUAEDVLIEG, W.; BINDER, M.; GROENEWALD, J. Z.; SUMMERELL, B. A.; CARNEGIE, A. J.; BURGESS, T. I.; CROUS, P. W. Introducing the Consolidated Species Concept to resolve species in the Teratosphaeriaceae. **Persoonia**, Utrech, v.33, p.1–40, 2014.

RAUCH, M. E.; GRAEF, H. W.; ROZENZHAK, S. M.; JONES, S. E.; BLECKMANN, C. A.; KRUGER, R. L.; NAIK, R. R.; STONE, M. O. Characterization of microbial contamination in United States Air Force aviation fuel tanks. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v.33, p.29–36, 2006.

REIS, B. M. S.; SILVA, A.; ALVAREZ, M. R.; OLIVEIRA, T. B.; RODRIGUES, A. Fungal communities in gardens of the leafcutter ant *Atta cephalotes* in forest and cabruca agrosystems of southern Bahia State (Brazil). **Fungal Biology**, Oxford, v.119, p.1170–1178, 2015.

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

RIBEIRO, M.M.R.; AMARAL, K.D.; SEIDE, V.E.; SOUZA, B.M.R.; DELLA LUCIA, T.M.C.; KASUYA, M.C.M.; SOUZA, D.J. de. Diversity of fungi associated with *Atta bisphaerica* (Hymenoptera: Formicidae): the activity of *Aspergillus ochraceus* and *Beauveria bassiana*. **Psyche**, Cairo, v.2012, p.6, 2012.

ROBERTSHAW, H.; HIGGINS, E. Cutaneous infection with *Alternaria tenuissima* in an immunocompromised patient. **British Journal of Dermatology**, Oxford, v.153, n.5, p.1047–1049, 2005.

ROCHA, F. B.; PEREIRA, O. L.; BARRETO, R. W. First report of *Curvularia lunata* on *Zoysia japonica* (Poaceae) in Brazil. **Australasian Plant Pathology**, Murdoch, v.33, n.4, p.601–602, 2004.

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

RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O.C.; PENNING, L.H.; BACCI Jr, M. Assessment of microfungi in fungus gardens free of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera:Formicidae). **Sociobiology**, Chico, v.46, n.2, p.329–334, 2005b.

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

RODRIGUES, A.; SILVA, A.; BACCI Jr, M.; FORTI, L.C.; PAGNOCCA, F.C. Filamentous fungi found on froundress queens of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Applied Entomolohy**, Germany, v.134, p.342–345, 2010.

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

RODRIGUES, A. M.; TEIXEIRA, M. M.; de HOOG, G. S.; SCHUBACH, T. M.; PEREIRA, S. A.; FERNANDES, G. F.; BEZERRA, L. M.; FELIPE, M. S.; de CAMARGO, Z. P. Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, California, v.7, n.6, p.e2281, 2013.

ROSSMAN, A. Y.; CROUS, P. W.; HYDE, K. D. et al. Recommended names for pleomorphic genera in Dothideomycetes. **IMA Fungus**, Surrey, v.6, n.2, p.507–523, 2015.

ROUX, J.; WINGFIELD, M. J.; CIBRIÁN, D. First report of *Coniothyrium* canker of *Eucalyptus* in Mexico. **Plant Pathology**, Gangnamgu, v.51, n.3, p.382, 2002.

SAMERPITAK, K.; VAN der LINDE, E.; CHOI, H. -J.; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G.; MACHOUART, M.; GUEIDAN, C.; de HOOG, G. S. Taxonomy of *Ochroconis*, genus including opportunistic pathogens on humans and animals. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v.65, n.1, p.89–126, 2014.

SAMERPITAK, K.; DUARTE, A. P. M.; ATTILI-ANGELIS, D.; PAGNOCCA, F. C.; HEINRICHS, G.; RIJS, A. J. M. M.; ALFJORDEN, A.; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G.; MENKEN, S. B. J.; de HOOG, G. S. A new species of the oligotrophic genus *Ochroconis* (Sympoventuriaceae). **Mycological Progress**, Tübingen, v.14, p.6, 2015.

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

SAMSON, R. A.; HOUBRAKEN, J.; THRANE, U.; FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B. **CBS Laboratory Manual Series 2**: Food and Indoor Fungi. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2010.

SANDOVAL-DENIS, M.; SUTTON, D. A.; MARTIN-VICENTE, A.; CANO-LIRA, J. F.; WIEDERHOLD, N.; GUARRO, J.; GENÉ, J. *Cladosporium* species recovered from clinical samples in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.53, n.9, p.2990–3000, 2015.

SANDOVAL-DENIS, M.; GENÉ, J.; SUTTON, D. A.; GUARRO, J. *Penidiellopsis radicularis*. Fungal Planet description sheets: 400–468. **Persoonia**, Utrecht, v.36, p.316-458, 2016.

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

SCHEFFER, R. P. **The nature of disease in plants**. New York: Cambridge University Press, 1997.

SCHMIT, J. P.; MUELEER, G. M. An estimate of the lower limit of fungal diversity. **Biodiversity and Conservation**, London, v.16, p.99–111, 2007.

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

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

SEEPHONKAI, P.; ISAKA, M.; KITTAKOOP, P.; PALITTAPONGARNPIM, P.; KAMCHONWONGPAISAN, S.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. Evaluation of antimycobacterial, antiplasmodial and cytotoxic activities of preussomerins isolated from the lichenicolous fungus *Microsphaeropsis* sp BCC 3050. **Planta Medica**, Stuttgart, v.68, p.45–48, 2002.

SEEPHUEAK, P.; PETCHARAT, V.; PHONGPAICHIT, S. Fungi associated with leaf litter of para rubber (*Hevea brasiliensis*). **Mycology: An International Journal on Fungal Biology**, China, v.3, n.2, p.132–146, 2010.

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

SELBMANN, L.; ISOLA, D.; EGIDI, E.; ZUCCONI, L.; GUEIDAN, C.; de HOOG, G. S.; ONOFRI, S. Mountain tips as reservoirs for new rock-fungal entities: *Saxomyces* gen. nov. and four new species from the Alps. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v.65, n.1, p.167–182, 2014.

SEYEDMOUSAVI, S.; BADALI, H.; CHLEBICKI, A.; ZHAO, J.; PRENAFETA-BOLDÚ, F. X.; de HOOG, G. S. *Exophiala sideris*, a novel black yeast isolated from environments polluted with toxic alkyl benzenes and arsenic. **Fungal Biology**, Oxford, v.115, n.10, p.1030–1037, 2011.

SILVA, M. da; UMBUZEIRO, G. A.; PFENNING, L. H.; CANHOS, V. P.; ESPOSITO, E. Filamentous fungi isolated from estuarine sediments contaminated with industrial discharges. **Soil & Sediment Contamination**, Boca Raton, v.12, p.345–356, 2003a.

SILVA, M. da; CERNIGLIA, C. E.; POTHULURI, J. V.; CANHOS, V. P.; ESPOSITO, E. Screening filamentous fungi isolated from estuarine sediments for the ability to oxidize polycyclic aromatic hydrocarbons. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v.19, p.399–405, 2003b.

SINGH, K.; FLOOD, J.; WELSH, R. D.; WYCKOFF, J. H.; SNIDER, T. A.; SUTTON, D. A. Fatal systemic phaeohyphomycosis caused by *Ochroconis gallopavum* in a dog (*Canis familaris*). **Veterinary Pathology**, Washington, v.43, p.988–992, 2006.

SIVANESAN, A. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. **Mycological Papers**, v.158, p.1–261, 1987.

STERFLINGER, K.; TESEI, D.; ZAKHAROVA K. Fungi in hot and cold deserts with particular reference to microcolonial fungi. **Fungal ecology**, Amsterdam, v.5, p.453–462, 2012.

STRØMENG, G. M.; BRURBERG, M. B.; VIKE, E.; TALGØ, V. First report of daylily leaf streak caused by *Kabatiella microsticta* on *Hemerocallis* spp. in Norway. **Plant Health Progress**, Saint Paul, 2015.

SUDHADHAM, M.; PRAKITSIN, S.; SIVICHAI, S.; CHAIYARAT, R.; DORRESTEIN, G. M.; MENKEN, S. B.; de HOOG, G. S. The neurotropic black yeast *Exophiala dermatitidis* has a possible origin in the tropical rain forest. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.61, p.145–155, 2008.

SUNPAPAO, A.; KITTIMORAKUL, J.; PORNSURIYA, C. Disease Note: Identification of *Curvularia oryzae* as cause of leaf spot disease on oil palm seedlings in nurseries of Thailand. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v.42, n.4, p.529–533, 2014.

SURYANARAYANAN, T. S.; WITTLINGER, S. K.; FAETH, S. H. Endophytic fungi associated with cacti in Arizona. **Mycological Research**, Cambridge, v.109, n.5, p.635–639, 2005.

TANAKA, K.; HIRAYAMA, K.; YONEZAWA, H.; HATAKEYAMA, S.; HARADA, Y.; SANO, T.; SHIROUZU, T.; HOSOYA, T. Molecular taxonomy of bambusicolous fungi: Tetraplosphaeriaceae, a new pleosporalean family with *Tetraploa*-like anamorphs, and notes on the phylogeny of selected species from bamboo. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.64, p.175–209, 2009.

TAO, G.; LIU, Z. Y.; HYDE, K. D.; LIU, X. Z.; YU, Z. N. Whole rDNA analysis reveals novel and endophytic fungi in *Bletilla ochracea* (Orchidaceae). **Fungal Diversity**, Dordrecht, v.33, p.101–122, 2008.

THAHN, V.N. *Lipomyces orientalis* sp. nov., a yeast species isolated from soil in Vietnam. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.56, p.2009–2013, 2006.

THANH, V.N.; HIEN, D.D.; THOM, T.T. *Moniliella byzovii* sp. nov., a chlamydospore-forming black yeast isolated from flowers. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.63, p.1192–1196, 2013.

TOMITA, F. Endophytes in Southeast Asia and Japan: their taxonomic diversity and potential applications. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v.14, p.187–204, 2003.

TONG, Z.; CHEN, S. C. –A.; CHEN, L.; DONG, B.; LI, R.; HU, Z.; JIANG, P.; LI, D.; DUAN, Y. Generalized subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Phialophora verrucosa*: Report of a case and review of literature. **Mycopathologia**, Den Haag, v.175, n.3, p.301–306, 2013.

TSUDA, M.; MUGISHIMA, T.; KOMATSU, K.; SONE, T.; TANAKA, M.; MIKAMI, Y.; KOBAYASHI, J. Modiolides A and B, two new 10-membered macrolides from a marinederived fungus. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.66, p.412–415, 2003.

TSUI, K. M.; GOH, T. K.; HYDE, K. D. A new species of *Dactylaria* from Hong Kong. **Sydowia**, Horn, v.49, p.182–186, 1997.

VADKERTIOVA, R.; SLAVIKOVA, E. Killer activity of yeasts isolated from the water environment. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.41, p.759–766, 1995.

VANSTEENHOUSE, J. L.; PADHYE, A. A.; AJELLO, L.Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Scolecobasidium humicola* in a cat. **Mycopathologia**, Den Haag, v.102, p.123–127, 1988.

VAN BAEL S.A.; FERNÁNDEZ-MARÍN, H.; VALENCIA, M.C.; ROJAS, E. I.; WCISLO, W. T.; HERRE, E. A. Two fungal symbioses collide: endophytic fungi are not welcome in leaf-cutting ant gardens. **Proceedings of the Royal Society of London**, **Series B**, London, v.276, n.1666, p.2419–2426, 2009.

VERKLEY, G. J. M.; da SILVA, M.; WICKLOW, D. T.; CROUS, P. W. *Paraconiothyrium*, a new genus to accommodate the mycoparasite *Coniothyrium minitans*, anamorphs of *Paraphaeosphaeria*, and four new species. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.50, p.323–335, 2004.

VOGLMAYR, H.; MAYER, V.; MASCHWITZ, U.; MOOG, J.; DJIETO-LORDON, C.; BLATRIX, R. The diversity of ant-associated black yeasts: insights into a newly discovered world of symbiotic interactions. **Fungal biology**, Oxford, v.115, p.1077–1091, 2011.

XIN, L.; de HOOG, G. S. Indoor wet cells harbour melanized agents of cutaneous infection. **Medical Mycology**, Oxford, v.48, p.622–628, 2010.

WEBER, N. A. The fungus-culturing behavior of ants. **American Zoologist**, Thousand Oaks, v.12, p.577–587, 1972.

WEILAND, J.; KOCH, G. Sugarbeet leaf spot disease (*Cercospora beticola* Sacc.). **Molecular Plant Pathology**, London, v.5, p.157–166, 2004.

WEITZMAN, I.; ROSENTHAL, S. A.; SHUPACK, J. L. A comparison between *Dactylaria gallopava* and *Scolecobasidium humicola*: first report of an infection in a tortoise caused by *S. humicola*. **Sabouraudia**, Oxfordshire, v.23, p.287–293, 1985.

WHIPPS, J. M.; SREENIVASAPRASAD, S.; MUTHUMEENAKSHI, S.; ROGERS, C. W.; CHALLEN, M. P. Use of *Coniothyrium minitans* as a biocontrol agent and some molecular aspects of sclerotial mycoparasitism. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.121, p.323, 2008.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; WHITE, T.; SNINSKY, J.J. (Ed) **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, p.315–322, 1990.

WIJERATNE, E. M. K.; PARANAGAMA, P. A.; GUNATILAKA, A. A. L. Five new isocoumarins from Sonoran desert plant-associated fungal strains *Paraphaeosphaeria quadriseptata* and *Chaetomium chiversii*. **Tetrahedron**, Amsterdam, v.62, p.8439–8446, 2006.

WINGFIELD, M. J.; CROUS, P. W.; COUTINHO, T. A. A serious canker disease of *Eucalyptus* in South Africa caused by a new species of *Coniothyrium*. **Mycopathologia**, Den Haag, v.136, n.3, p.139–145, 1996.

WOUDENBERG, J. H. C.; GROENEWALD, J. Z.; BINDER, M.; CROUS, P. W. *Alternaria* redefined. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.75, p.171–212, 2013.

WOUDENBERG, J. H. C.; TRUTER, M.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. Large-spored *Alternaria* pathogens in section *Porri* disentangled. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.79, p.1–47, 2014.

WU, Y. –M.; ZHANG, T. –Y. Soil dematiaceous hyphomycetes from Dahingganling Mountain Range, Inner Mongolia, China I. **Mycosystema**, Beijing, n.1, p.5–15, 2008.

YAZICIOGLU, M.; ASAN, A.; ONES, U.; VATANSEVER, U.; SEN, B.; TURE, M.; BOSTANCIOGLU, M.; PALA, O. Indoor airborne fungal spores and home characteristics in asthmatic children from Edirne region of Turkey. **Allergologia et Immunopathologia**, Madrid, v.32, n.4, p.197–203, 2004.

ZALAR, P.; GOSTINČAR, C.; de HOOG, G. S.; URŠIČ, V.; SUDHADDAM, M.; GUNDE-CIMERMAN, N. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.61, p.21–38. 2008

ZALAR, P.; NOVAK, M.; de HOOG, G. S.; GUNDE-CIMERMAN, N. Dishwashers - A man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens. **Fungal Biology**, Oxford, v.115, p.997–1007, 2011.

ZHAO, J.; ZENG, J.; de HOOG, G. S.; ATTILI-ANGELIS, D.; PRENAFETA-BOLDÚ, F. X. Isolation and identification of black yeasts by enrichment on atmospheres of monoaromatic hydrocarbons. **Microbial Ecology**, New York, v.60, p.149–156, 2010.

ZHANG, E. S.; TANAKA, T.; TAJIMA, M.; TSUBOI, R.; NISHIKAWA, A.; SUGITA, T. Characterization of the skin fungal microbiota in patients with atopic dermatitis and in healthy subjects. **Microbiology and Immunology**, Stafford, v.55, p.625–632, 2011.

ZHANG, Y.; CROUS, P. W.; SCHOCH, C. L. Pleosporales. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v.53, p.1–221, 2012.

ZHANG, J.; PENG, G.; DUAN, G.; ZHOU, Y.; YANG, S.; YU, L. *Bipolaris eleusines*, a potential mycoherbicide candidate for control of barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v.24, n.7, p. 839–846, 2014.

ZHUANG, J.; ZHU, M.; ZHANG, R.; YIN, H.; LEI, Y.; SUN, G.; GLEASON, M. L. *Phialophora sessilis*, a species causing flyspeck signs on bamboo in China. **Mycotaxon**, Ithaca, v.113, p.405–413, 2010.

3 CAPÍTULO 2

Prevalence of the genus *Cladosporium* on the integument of leaf-cutting ants characterized by 454 pyrosequencing

A. P. M. Duarte[1] - M. Ferro[1] - A. Rodrigues[1,2] - M. Bacci Jr.[1,2] - N. S. Nagamoto[3] - L.C. Forti[3] - F. C. Pagnocca[1,2]

[1] Center for the Study of Social Insects, UNESP – Rio Claro, SP, Brazil
[2] Department of Biochemistry and Microbiology, UNESP - Rio Claro, SP, Brazil
[3] Department of Plant Protection, UNESP - São Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil

Este capítulo é baseado no artigo original publicado na revista Antonie van Leeuwenhoek (doi: 10.1007/s10482-016-0724-3).

3.1 Contextualização

Os ambientes colonizados por micro-organismos são extraordinariamente diversos e as análises da composição microbiana a partir de métodos dependentes e independentes de cultivo permitem a compreensão do papel que muitos desempenham no ambiente e a extensão das espécies existentes.

Apesar da predominância de estudos que realizam o isolamento de micro-organismos, sabe-se que apenas uma pequena parcela destes é cultivável devido à inadaptabilidade em condições laboratoriais. Assim, as técnicas de análise independentes de cultivo têm se destacado. Dentre as estratégias utilizadas, o sequenciamento de nova geração é o mais vantajoso por não necessitar de uma etapa de clonagem, tornando a execução mais rápida e automatizada.

O sequenciamento de nova geração desenvolvido pela companhia 454 *Life Sciences* (Roche, Suíça), também conhecido como pirosequenciamento, tem sido extensivamente aplicado em estudos da microbiota relacionada ao solo e plantas, principalmente. A técnica é baseada na detecção da liberação do pirofosfato durante a síntese de DNA; mais detalhes dos processos envolvidos podem ser encontrados no trabalho de Ronaghi (2001).

Com a evolução do sequenciamento de DNA o volume de sequências geradas aumentou, exigindo o desenvolvimento de *pipelines* capazes de analisar a grande quantidade de dados em fluxo contínuo e rápido. Neste capítulo, o *pipeline* ITScan, desenvolvido pela Dra. Milene Ferro, foi aplicado no processamento das sequencias e incluiu a remoção de sequências quiméricas (composta por duas sequências parciais de genes diferentes), alinhamento e agrupamento das sequências em unidades taxonômicas moleculares operacionais (MOTUs).

A necessidade de profissionais qualificados para o processamento e análise de grandes volumes de dados obtidos nos sequenciamentos de alto desempenho, mostra que a bioinformática é um ramo promissor.

3.2 Abstract

The relationship among attine ants with their mutualistic fungus and other microorganisms has been studied during the last two centuries. However, previous studies about the diversity of fungi in the ants' microenvironment are based mostly on culture-dependent approaches, lacking a broad characterization of the fungal ant-associated community. Here, we analyzed the fungal diversity found on the integument of *Atta capiguara* and *A. laevigata* alate ants using 454 pyrosequencing. We obtained 35 453 ITS reads grouped into 99 Molecular Operational Taxonomic Units (MOTUs). Data analysis revealed that *A. capiguara* drones had the highest diversity of MOTUs. Besides the occurrence of several uncultured fungi, the mycobiota analysis revealed that the most abundant taxa were the *Cladosporium*-complex, C*ryptococcus laurentii* and *Epicoccum* sp. Taxa in the genus *Cladosporium* were predominant in all samples, comprising 67.9 % of all reads. The remarkable presence of the genus *Cladosporium* on the integument of leaf-cutting ants alates from distinct ant species suggests that this fungus is favored in this microenvironment.

Key words: next generation sequencing; ITS; Attini ants; cuticle; fungal consortium

3.3 Introduction

Colonies of leaf-cutting ants (genera *Atta* and *Acromyrmex*) of the tribe Attini (Formicidae) harbor a wide diversity of microorganisms. The principal member of this complex network of interactions is a basidiomycetous fungus (Agaricaceae, genus *Leucoagaricus*) cultured by these ants for food (SILVA et al., 2003). After 50 million years of co-evolution, attine ants and their cultivated fungus are dependent on each other and therefore feature an obligatory mutualistic relationship (MUELLER, 2012; SCHULTZ; BRADY, 2008).

Leaf-cutting ants cut large amounts of plant materials as substrate for the cultivation of the mutualistic fungus (WEBER, 1972) and this is why they are considered pests to agriculture crops causing severe economical losses. Thus, many studies have been conducted about the relationship of leaf-cutting ants with *Leucoagaricus* and other associated microbial symbionts in order to elucidate their ecology and assist in the search for methods to control these insects (ORTIZ; ORDUZ, 2000; LOPEZ; ORDUZ, 2003; FOLGARAIT et al., 2011).

Once a year, the reproductive caste of leaf-cutting ants, composed by alate individuals, leaves the nest to perform the mating flight. Females (gynes) carry a small portion of *Leucoagaricus* in their infrabuccal pocket and, after the fecundation by males (drones), each gyne tries to establish a new colony (AUTUORI, 1941).

The study of Pagnocca et al. (2008) was the first to analyse the fungal community present in the integument of leaf-cutting gynes from *A. capiguara* and *A. laevigata* nests and isolated several fungal species with prevalence of the genus *Cladosporium*. Few years later, Duarte et al. (2014) reported the presence of potentially pathogenic black fungi, such as *Exophiala* and *Ochroconis*, in the gynes' body of the same species. Therefore, the fungi present in the integument of alate ants may be dispersed in the environment and thus compose the fungal community of the newly founded colony.

The first study aiming to evaluate the fungal diversity associated with nests of leaf-cutting ants using a culture-independent method was performed by Rodrigues et al. (2014). Using clone libraries based on the internal transcribed spacer (ITS) region, the authors analyzed the fungal community in the chambers' soil and the surrounding soil of *A. sexdens rubropilosa* and *A. bisphaerica* nests. The authors found differences between fungal

communities in nest and non-nest soils, revealing that ants may influence the mycobiota found in the soil adjacent to their nests.

Culture-independent methods, such as next generation sequencing (NGS), have been widely used in environmental studies of the mycobiome, such as soil fungi (LIM et al., 2010; LENTENDU et al., 2011), mycorrhizal fungi (LUMINI et al., 2010) and plant-associated fungi (GILLEVET et al., 2009; ARFI et al., 2012) but not in mycobiomes found in fungal-insect interactions.

Because almost all studies on the diversity of fungi associated with leaf-cutting ants have used culture-dependent approaches, here we used 454 pyrosequencing to further evaluate the mycobiota diversity on gynes and drones of the ants *A. capiguara* and *A. laevigata*. This study represents the first survey of fungal communities present on the integument of leaf-cutting ants using a NGS method.

3.4 Materials and Methods

3.4.1 Study site and sampling

One colony of *A. laevigata* and one colony of *A. capiguara* located at Fazenda Santana (Locality: 22°50.6'S; 48°26.1'W; elevation 798 m), Botucatu, São Paulo State, Brazil, were monitored during several months before the mating flight season. This generally occurs once a year from September to November in São Paulo State. On the collection day (November 2012) only these two colonies released alates, thus limiting the number of colonies sampled. All ants were collected in the same day during the beginning of the mating flight, right at the moment when the alate ants appeared at the nest entrance[1]. Ten drones and ten gynes were picked up from the *A. capiguara* colony and ten drones from the *A. laevigata* colony. Gynes of *A. laevigata* were not released at the moment of collection.

[1] Collections were conducted under collecting permit number 36333-1 issued by the "Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis" (IBAMA) and the "Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade" (ICMBio).

3.4.2 Molecular analysis

Each ant was immersed individually in TE buffer (Tris 1M; EDTA 0,5M) and sonicated in a Branson 1210 ultrasonic water bath for 10 min. Due to the different sizes, one mL of buffer was used for drones and four mL for gynes. The buffer, containing fungal cells in suspension was evaporated to dryness in a Speed-Vac concentrator (Savant Instruments) and then suspended in 30 µL of TE buffer. The resulting suspension was used for DNA extraction according to the CTAB protocol of Reis et al. (2015). Extracted DNA of each ant group was mixed according to the source, resulting in three samples (*A. capiguara* and *A. laevigata* drones; *A. capiguara* gynes).

The ITS region of the ribosomal DNA was amplified using the primers ITS1 and ITS4 (WHITE et al., 1990). Fifteen ng of template DNA were used for a 25 µL PCR amplification reaction performed as follows: 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles consisting of 94 °C for 45 s, 52 °C for 30 s and 72 °C for 1 min, and post elongation step at 72 °C for 7 min. To reduce PCR biases, six PCR reactions were carried out for each sample and then pooled per sample group. Amplicons were analyzed on a 1% agarose gel and a negative control (DNA free) was also performed. Amplicons were purified using a NucleoSpin® PCR Clean-up (Macherey-Nagel). Pyrosequencing was performed on a Genome Sequencer (GS) FLX+ platform (Roche, Switzerland) at the MACROGEN DNA Synthesis and Sequencing Facility (Seoul, Korea).

3.4.3 Bioinformatics and data analyses

Reads were submitted to the online program PRINSEQ (SCHMIEDER; EDWARDS, 2011) to examine the presence of ambiguities (Ns), quality, average size, and GC content of reads. The data have been deposited in the National Center for Biotechnology Information BioProject database, www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject (project ID PRJNA321130). After checking that the reads quality was higher than the 20 PHRED (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998), sequences shorter than 400 bp were removed using a local script.

The data obtained were analyzed using ITScan (FERRO et al., 2014), a recent pipeline dedicated to studies on fungal diversity (available at http://evol.rc.unesp.br:8083/editor/faces/itscan/input.xhtml). Pipeline steps comprise a

chimera screening, executed by the Chimera Checker program (NILSSON et al., 2010), removal of chimeric ITS sequences, sequence alignment performed in MAFFT (KATOH; STANDLEY, 2013), clustering of aligned sequences into Molecular Operational Taxonomic Units (MOTUs) using a sequence similarity of 97% (TEDERSOO et al., 2010) in Mothur (SCHLOSS et al., 2009). Singletons (MOTUs including only one read) were removed from further analysis, as recommended by Tedersoo et al. (2010), in order to improve the precision of diversity estimates.

In order to provide taxonomic affiliations, comparisons of MOTUs against the NCBI-GenBank were carried out using 1e-03 e-value parameter. The identification of the MOTUs was also manually refined by constructing phylogenetic trees including sequences from reference strains (type) available in the GenBank (neighbor-joining method) using MEGA6 (TAMURA et al., 2013).

The taxonomic assignment was determined using the MycoBank (www.MycoBank.org; ROBERT et al., 2013). Fisher's alpha diversity index, a suitable tool for comparing samples of different sizes (LORO et al., 2012), and rarefaction curves were generated in PAST. Additionally, Sorensen and Jaccard's similarity indices were calculated to compare the communities using EstimateS 8.2.0 software (COLWELL et al., 2012).

3.5 Results

A total of 142 930 reads were obtained and after filtering out short sequence reads (< 400 bp), 99 281 reads (69.5 %) were used in the ITScan pipeline. The number of reads per sample and average read length are shown in Table 1. The PHRED quality score for all samples was higher than 20 and GC content ranged from 46.8 % (*A. capiguara* drones) to 48.1% (*A. laevigata* drones).

After removing chimeric sequences, 57 singletons were deleted and reads were grouped into 99 distinctive MOTUs: 51 from *A. capiguara* drones, 25 from *A. capiguara* gynes and 46 from *A. laevigata* drones.

Of the 99 MOTUs obtained in the study, 32 were unique to *A. capiguara* drones (including *Cryptococcus laurentti*, *Cunninghamella* and *Periconia* species), 11 were unique to *A. capiguara* gynes (including *Trichosporon chiarellii*) and 37 were unique to *A. laevigata* drones (including *Aureobasidium* and *Epicoccum* species). The mutualistic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* was shared by drones (5 reads) and gynes (351 reads) of *A.*

capiguara. Additionally, four MOTUs were present in all samples (Table 2). A complete list of the MOTUs and its distribution has been included in Online Resource 1.

Table 1 – Data characteristics before and after ITScan processing.

	Raw data		**Treated data**[2]	
	N° of reads	Average read length	N° of reads	Average read length
A. capiguara drones	44604	508	22953	519
A. capiguara gynes	74966	454	934	512
A. laevigata drones	23360	504	11566	505

[2] Reads characteristics after length filtering and removal of chimeric sequences.

According to Jaccard and Sorensen's indices, *A. capiguara* drones and *A. capiguara* gynes shared the highest number of fungal taxa (Jaccard: 0.24; Sorensen: 0.39). This comparison is not possible for *A. laevigata* since gynes were not obtained from this nest.

Most of the MOTUs contained three to 100 reads, however three MOTUs grouped over 1 000 reads. These three MOTUs were taxonomically assigned to the *Cladosporium*-complex (n=24 099), *Cryptococcus laurentii* (n=2 752), and *Epicoccum* sp. (n=3 955) and made up 86.9 % of the reads. Table 3 shows the most representative MOTUs in the samples.

Rarefaction analysis of the MOTUs showed that the asymptote was approached for all three samples (Fig. 1) suggesting that 454 pyrosequencing recovered most of the fungal species present on the integument of the sampled ants. The diversity index revealed that *A. capiguara* drones had the highest diversity (Fisher's alpha: 6.2) followed by *A. laevigata* drones (Fisher's alpha: 6.1).

From the 99 fungal taxa identified, 78.8 % belonged to Ascomycota, 16.2 % to Basidiomycota and 5 % to Mucoromycotina. The orders Pleosporales, Capnodiales and Hypocreales encompassed the highest number of MOTUs for ascomycetous fungi (Fig. 2). Basidiomycetous fungi were mostly classified in the order Tremellales. On the other hand, Mucoromycotina is represented exclusively by the order Mucorales and encompasses only *Cunninghamella* and *Mucor* species. Also, 13.1 % of the MOTUs represent uncultured fungi.

The sequence data of the ITS region are too conserved to distinguish different species in the genera *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* and *Trichoderma* (BALAJEE et al., 2007; VISAGIE et al., 2014; BENSCH et al., 2015; MONTOYA et al., 2016). Therefore these MOTUs were grouped as a species complex.

Table 2 – Shared MOTUs for *Atta capiguara* drones and gynes, and *Atta laevigata* drones.

Best hit at NCBI database	**Taxonomic assignment**	**Coverage (%)**	**Similarity (%)**	**Accession nº**	**Nº of reads**		
					AC drones	AC gynes	AL drones
Ascomycota sp.	Magnaporthales (A)	99	95	JQ692165	17	4	5
Cladosporium-complex	Capnodiales (A)	100	100	KP143685	17520	377	6202
Fusarium polyphialidicum	Hypocreales (A)	100	97	HQ607880	16	3	67
Fusarium decemcellulare	Hypocreales (A)	100	99	KR534720	5	2	25

(A) Ascomycota; AC *A. capiguara*; AL *A. laevigata*

Table 3 – The 10 top abundant MOTUs found in each sample based on closest match in NCBI database.

(continued)

	Best hit at NCBI database	**Taxonomic assignment**	**Coverage (%)**	**Similarity (%)**	**Accession #**	**Nº of reads**	**% total**
A. capiguara drones	*Cladosporium*-complex	Capnodiales (A)	100	100	GU395509	17520	76.2
	Cryptococcus laurentii	Tremellales (B)	81	98	KP131909	2754	12
	Dothideomycetes sp.	Pleosporales (A)	100	99	KM519276	970	4.2
	Cunninghamella sp.	Mucorales (M)	88	90	KR812209	339	1.5
	Phoma draconis	Pleosporales (A)	88	100	KP276621	322	1.4
	Teratosphaeriaceae sp. 2	Capnodiales (A)	100	94	KT833169	213	0.93
	Coniothyrium sp.	Pleosporales (A)	87	98	DQ092505	145	0.63
	Cunninghamella bainieri	Mucorales (M)	99	93	KF201293	145	0.63
	Periconia macrospinosa	Pleosporales (A)	100	99	JQ781723	66	0.29
	Pseudocercospora norchiensis	Capnodiales (A)	100	100	EF394859	52	0.23

Table 3 – The 10 top abundant MOTUs found in each sample based on closest match in NCBI database.

(conclusion)

	Best hit at NCBI database	Taxonomic assignment	Coverage (%)	Similarity (%)	Accession #	Nº of reads	% total
A. capiguara gynes	*Cladosporium*-complex	Capnodiales (A)	99	99	HQ608074	377	39.8
	Leucoagaricus gongylophorus	Agaricales (B)	100	99	KJ531208	351	37.5
	Teratosphaeriaceae sp. 4	Capnodiales (A)	100	99	KT833162	58	6.1
	Fusarium oxysporum	Hypocreales (A)	100	100	KT794176	35	3.7
	Teratosphaeriaceae sp. 2	Capnodiales (A)	100	98	KT833169	32	3.4
	Teratosphaeriaceae sp. 1	Capnodiales (A)	100	100	KT833155	11	1.2
	Phanerochaete tuberculata	Polyporales (B)	98	94	AY219356	10	1.1
	Clonostachys byssicola	Hypocreales (A)	100	100	KC806270	6	0.63
	Uncultured fungus 4	Pleosporales (A)	100	99	FJ213550	6	0.63
	Pseudocercospora fuligena	Capnodiales (A)	100	88	GU214675	5	0.53
	Trichosporon chiarellii	Tremellales (B)	99	99	GQ338074	5	0.53
A. laevigata drones	*Cladosporium*-complex	Capnodiales (A)	100	99	GU395509	6202	53.5
	Epicoccum sp.	Pleosporales (A)	100	99	KR024724	3955	34
	Aureobasidium leucospermi	Dothideales (A)	100	99	JN712487	399	3.4
	Bionectria sp.	Hypocreales (A)	100	99	HM849058	111	0.96
	Teratosphaeriaceae sp. 3	Capnodiales (A)	98	97	KT833168	107	0.92
	Fusarium incarnatum-equiseti complex	Hypocreales (A)	100	100	KJ562367	96	0.83
	Uncultured fungus 1	Pleosporales (A)	100	99	GU053794	95	0.82
	Alternaria alternata	Pleosporales (A)	100	100	KU866390	74	0.64
	Fusarium polyphialidicum	Hypocreales (A)	100	97	HQ607880	67	0.58
	Trichosporon asahii	Tremellales (B)	100	99	KU095859	63	0.54

(A) Ascomycota; (B) Basidiomycota; (M) Mucoromycotina

Figure 1 – Rarefaction curves (solid lines) of observed MOTU richness at 97 % sequence similarity along with the 95 % Confidence Intervals (dotted lines) on the integument of *A. capiguara* drones (a), *A. capiguara* gynes (b) and *A. laevigata* drones (c).

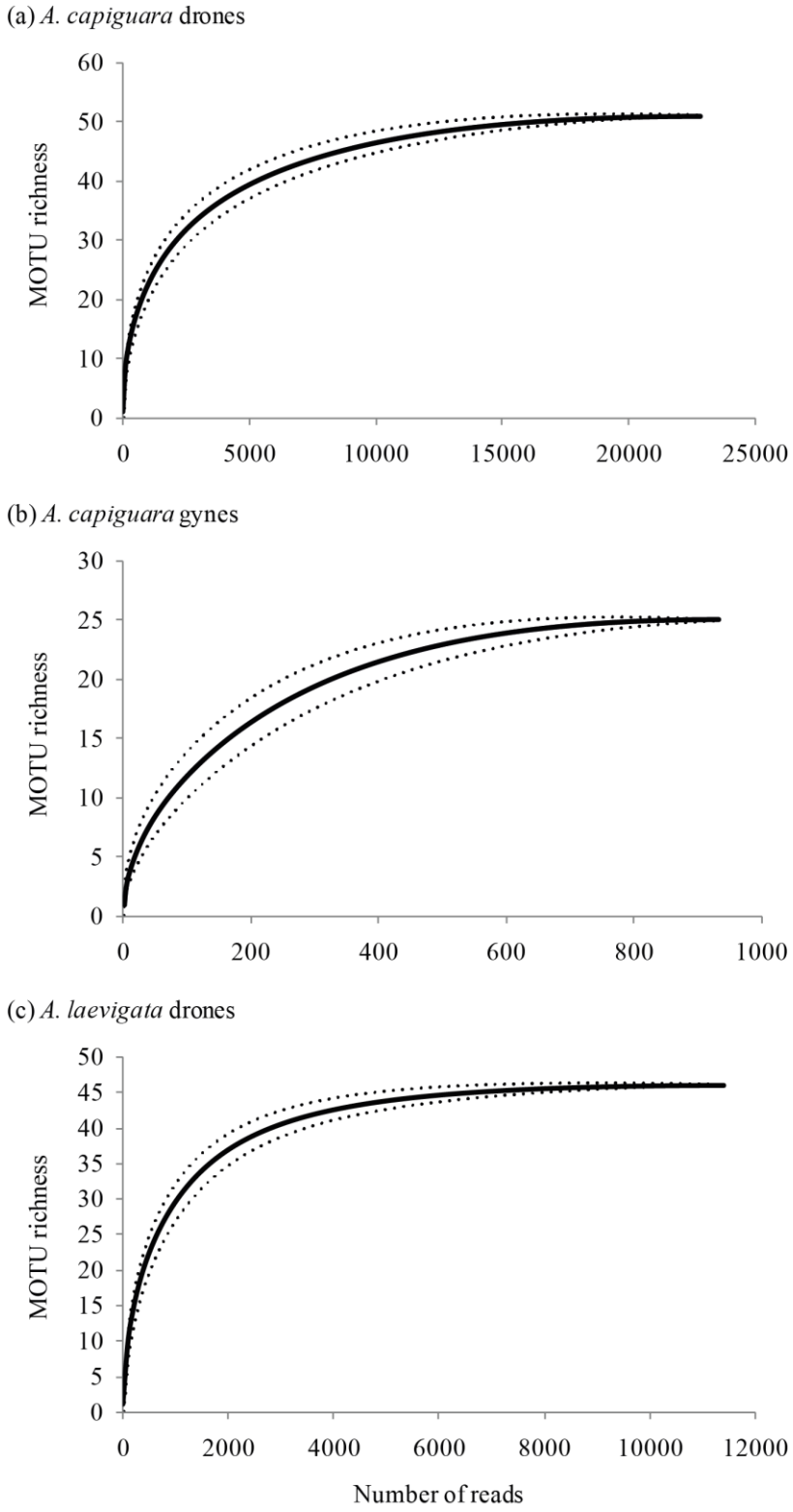
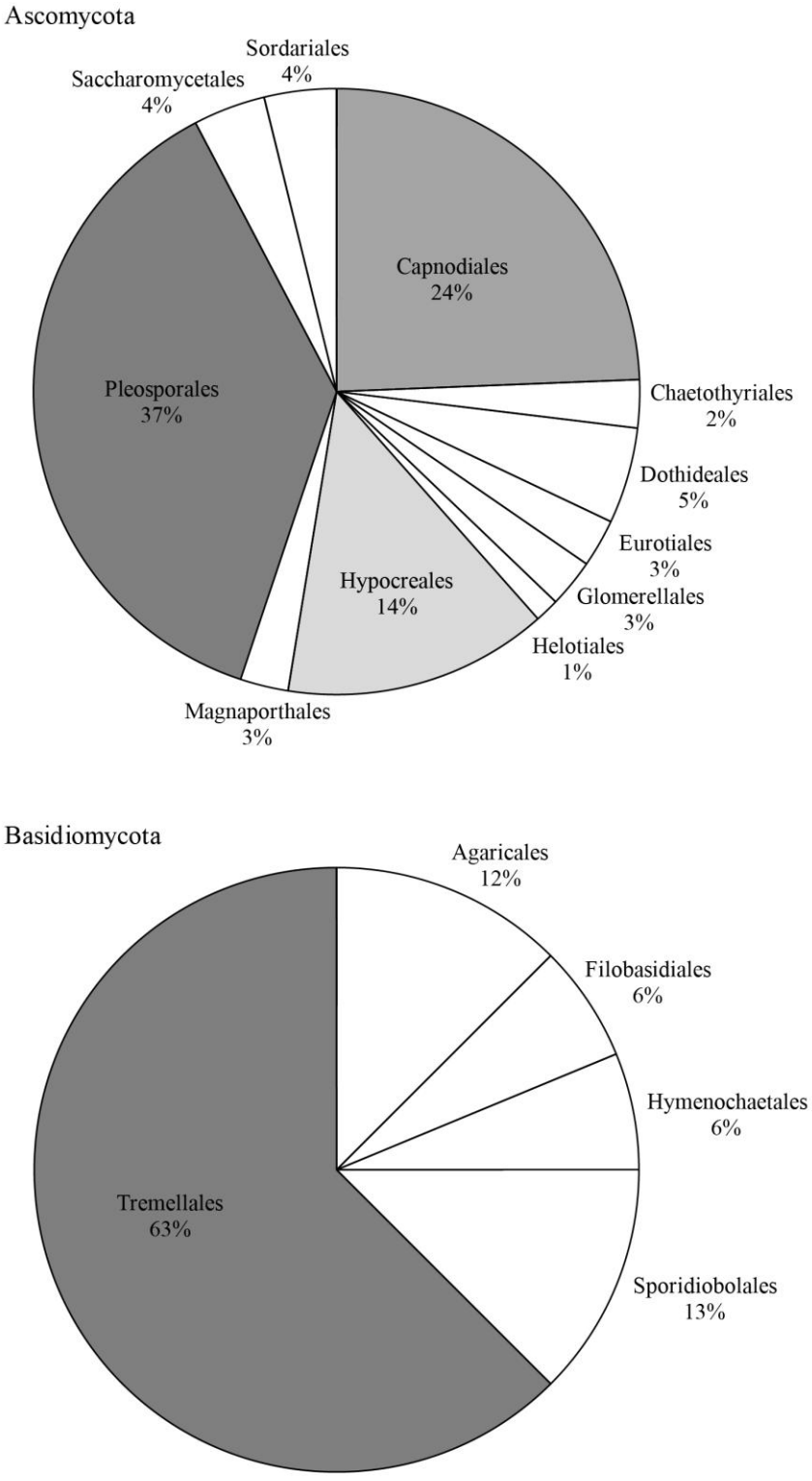


Figure 2 – Distribution of the 99 fungal MOTUs obtained from the integument of *A. capiguara* drones, *A. capiguara* gynes and *A. laevigata* drones, according to the phylogenetic assignment.



3.6 Discussion

Studies on the mycobiota present on the integument of leaf-cutting ants are relatively recent and only four studies are published on this subject (PAGNOCCA et al., 2008; GUEDES et al., 2012; ARCURI et al., 2014; DUARTE et al., 2014). The relationship of these cuticular fungi with ants is still unknown but Attili-Angelis et al. (2014) suggested that the presence of melanized fungi (order Chaetothyriales) may be favored by composing hydrocarbons in the cuticle of these insects.

Although these works contributed to the knowledge of fungi present on the integument of attine ants, the sole use of culture-dependent techniques limited the study of fungal diversity and the finding of putative unknown species that fail to grow on artificial media. In this context, the present study evaluated the fungal diversity associated with the integument of alate leaf-cutting ants using pyrosequencing.

As expected, we found the mutualistic fungus, *Leucoagaricus gongylophorus* on gynes of *A. capiguara*. Because ant female alates carry mycelium pellets in the internal infrabucal pockets (AUTUORI, 1941) it is likely that our method to recover DNA from the integument also extracted DNA from the mutualistic fungus. Furthermore, *L. gongylophorus* was also found on drones of *A. capiguara*, even though in a lower number of reads. As the reproductive caste is raised in the parental fungus garden, the mutualistic fungal hyphae could be attached to the integument of gynes and drones, however *L. gongylophorus* was not detected on drones of *A. laevigata*.

Besides the ant mutualistic fungus, our results revealed a diverse fungal community associated with both ant species examined. Moreover, it has become more apparent that the ants' integument represents a microenvironment for several microorganisms that interact among themselves and may interfere in the complex attine ant-microbe interaction (LITTLE; CURRIE, 2007; ISHAK et al., 2011).

As gynes are at least twice the size than drones (Online Resource 2), and for this reason they have a higher contact surface with the surrounding environment, we expected a higher number of reads obtained from these insects; however, we observed that *A. capiguara* gynes had the lowest number of reads (n= 934) and MOTUs (n= 25). Using a culture-dependent technique that favored the growth of melanized fungi, Duarte et al. (2014) isolated

17 fungal taxa from 100 *A. capiguara* gynes' integuments, a lower fungal richness compared to the present study.

Fisher's alpha diversity index showed that drones of *A. capiguara* and *A. laevigata* had the highest fungal richness. In fact, these samples also exhibit the highest number of MOTUs (51 and 46, respectively). The study on the mycobiota associated with drones is recent and Arcuri et al. (2014) showed a wide diversity of yeasts on the integument of *A. sexdens rubropilosa* drones, with predominance of *Aureobasidium* and *Cryptococcus* species.

According to the Jaccard and Sorensen's similarity indices, drones and gynes of *A. capiguara* are more similar to each other than to drones of *A. laevigata* regarding the fungal diversity. In addition, the number of shared MOTUs among the three samples was very low (n= 4). These results support the hypothesis of Duarte et al. (2014) that the fungal community associated with *A. capiguara* and *A. laevigata* alate ants are distinct. However, this conclusion should be carefully considered as it is based in a limited number of samples.

The clustered MOTUs suggest that the fungal populations present on the integument of leaf-cutting ants belong to the phyla Ascomycota, Basiodiomycota and Mucoromycotina. The two ascomycetous orders with the highest number of MOTUs, Pleosporales and Capnodiales, comprise epiphytes, endophytes, saprobes and plant parasites (CROUS et al., 2009; ZHANG et al., 2012). Hypocreales was another ascomycetous order frequently obtained in this study and includes plant pathogens and biocontrol agents (SAMUELS et al., 2006). Thus, the most abundant orders comprise plant-related fungi that may enter into the nests through different plants harvested by these leaf-cutting ants and, once incorporated in the fungus gardens, they can contaminate the integument of worker ants and alates as well.

Reads assigned to the genus *Cladosporium* (Capnodiales, Ascomycota) were prevalent in all samples and accounted for 67.9 % of all reads obtained. Pagnocca et al. (2008) reported massive isolation of this genus from the integument of *A. capiguara* and *A. laevigata* gynes, suggesting that leaf-cutting ants may be an important carrier of *Cladosporium* species.

Species of *Cladosporium* are ubiquitous and, therefore, they are found in a wide range of environments (BENSCH et al., 2012). Besides, *Cladosporium* is frequently isolated from soil (DOMSCH et al., 1980), air (O'GORMAN; FULLER, 2008) and is a common endophyte (KUMARESAN; SURYANARAYANAN, 2002) and plant pathogen (THOMMA et al., 2005). The access of fungi into the ants' nest has not been fully elucidated, but for plant-related fungal species, as *Cladosporium*, it is suggested that the entry happens during the

transport of plant material into the nests. Although their role in the attine symbiosis is unknown, the remarkable presence of *Cladosporium* in the integument of these ants suggests that this fungus is favored in this microenvironment and might use the ants as dispersal vehicle.

Contrary to the results obtained by Duarte et al. (2014), we found a lower diversity of chaetothyrialean fungi that could be explained by the small number of ants evaluated (n=30) as both studies sampled the same alate ants species. *Phialophora*-related species, suggested to be symbiont of attine ants by Little and Currie (2007), were also not found.

From the Basidiomycota phylum, C*ryptococcus laurentii* (order Tremellales) was the most abundant taxon and observed only in *A. capiguara* drones. This basidiomycetous yeast has been shown to be prevalent in the attine ants microenvironment and it has been reported in the fungus garden (MIDDELHOVEN et al., 2003) and integument of gynes (PAGNOCCA et al., 2008) and drones (ARCURI et al., 2014). Mendes et al. (2012) showed that, besides *C. laurentii*, many other yeasts present in the fungus garden of leaf-cutting ants, are able to assimilate galacturonic acid, a compound derived from the hydrolysis of pectin (SIQUEIRA et al., 1998) by *Leucoagaricus* and considered harmful to ants' survival.

Interesting to note, *Trichosporon chiarellii* has been frequently reported in association with attine ants (PAGNOCCA et al., 2010) and so far was not found in another environment. Here, we found this yeast species on the integuments of *A. capiguara* gynes (five reads). Arcuri et al. (2014) isolated *T. chiarellii* from the integument of *A. sexdens rubropilosa* drones before the mating flight. Because alate ants might be responsible for the vertical transmission of some microorganisms, the present report supports the hypothesis that *T. chiarellii* could be an autochtonous species in attine ant colonies.

Thirteen MOTUs were identified as uncultured fungi but all were classified to at least the order level. These results show that members of the fungal community associated with the integument of leaf-cutting ants remain poorly described.

Our study indicates that the integument of leaf-cutting ant alates harbor a wide diversity of fungi and many have not been recovered by culture-dependent methods. The complex relationship among fungi and other associated organisms in this microenvironment has been insufficiently researched and may contain the fundamental key to elucidate the mechanisms used by the ant in nurturing the mutualistic fungus and defence against natural enemies.

References

ARCURI, S. L.; PAGNOCCA, F. C.; MELO, W. G. P.; NAGAMOTO, N. S.; KOMURA, D. L.; RODRIGUES, A. Yeasts found on an ephemeral reproductive caste of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.106, p.475–487, 2014.

ARFI, Y.; BUÉE, M.; MARCHAND, C.; LEVASSEUR, A.; RECORD, E. Multiple markers pyrosequencing reveals highly diverse and host-specific fungal communities on the mangrove trees *Avicennia marina* and *Rhizophora stylosa*. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.79, p.433–444, 2012.

ATTILI-ANGELIS, D.; DUARTE, A. P. M.; PAGNOCCA, F. C.; NAGAMOTO, N. S.; de VRIES, M.; STIELOW, J. B.; de HOOG, G. S. Novel *Phialophora* species from leaf-cutting ants (tribe Attini). **Fungal Diversity**, Dordrecht, v.65, p.65–75, 2014.

AUTUORI, M. Contribuição para o conhecimento da saúva (*Atta* spp.). I. Evolução do sauveiro (*Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.12, p.197–228, 1941.

BALAJEE, S. A.; HOUBRAKEN, J.; VERWEIJ, P. E.; HONG, S. –B.; YAGHUCHI, T.; VARGA, J.; SAMSON, R. A. *Aspergillus* species identification in the clinical setting. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.59, p.39–46, 2007.

BENSCH, K.; BRAUN, U.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. The genus *Cladosporium*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.72, p.1–401, 2012.

BENSCH, K.; GROENEWALD, J. Z.; BRAUN, U.; DIJKSTERHUIS, J.; YÁÑEZ-MORALES, M. J.; CROUS, P. W. Common but different: The expanding realm of *Cladosporium*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.82, p.23–74, 2015.

COLWELL, R. K.; CHAO, A.; GOTELLI, N. J.; LIN, S. –Y.; MAO, C. X.; CHAZDON, R. L.; LONGINO, J. T. Models and estimators linking individual-based and sample-based rarefaction, extrapolation, and comparison of assemblages. **Journal of Plant Ecology**, Oxford, v.5, p.3–21, 2012.

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

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. **Compendium of soil fungi**. London: Academic, 1980.

DUARTE, A. P. M.; ATTILI-ANGELIS, D.; BARON, N. C.; FORTI, L. C.; PAGNOCCA, F. C. Leaf-cutting ants: an unexpected microenvironment holding human opportunistic black fungi. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.106, n.3, p.465–73, 2014.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v.8, p.186–194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v.8, p.175–185, 1998.

FERRO, M.; ANTONIO, E. A.; SOUZA, W.; BACCI, M. ITScan: a web-based analysis tool for Internal Transcribed Spacer (ITS) sequences. **BMC Research Notes**, London, v.7, p.857, 2014.

FOLGARAIT, P.; GOROSITO, N.; POULSEN, M.; CURRIE, C. R. Preliminary in vitro insights into the use of natural fungal pathogens of leaf-cutting ants as biocontrol agents. **Current Microbiology**, New York, v.63, n.3, p.250–258, 2011.

GILLEVET, P. M.; SIKAROODI, M.; TORZILLI, A. P. Analyzing salt-marsh fungal diversity: comparing ARISA fingerprinting with clone sequencing and pyrosequencing. **Fungal Ecology**, Amsterdam, v.2, n.4, p.160–167, 2009.

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

ISHAK, H. D.; MILLER, J. L.; SEN, R.; DOWD, S. E.; MEYER, E.; MUELLER, U. G. Microbiomes of ant castes implicate new microbial roles in the fungus-growing ant *Trachymyrmex septentrionalis*. **Scientific reports**, London, v.1, p.204, 2011.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v.30, n.4, p.772–780, 2013.

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

LENTENDU, G.; ZINGER, L.; MANEL, S.; COISSAC, E.; CHOLER, P.; GEREMIA, R. A.; MELODELIMA, C. Assessment of soil fungal diversity in different alpine tundra habitats by means of pyrosequencing. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v.49, n.1, p.113–123, 2011

LIM, Y. W.; KIM, B. K.; KIM, C.; JUNG, H. S.; KIM, B. –S.; LEE, J. –H.; CHUN, J. Assessment of soil fungal communities using pyrosequencing. **Journal of Microbiology**, Daejeon, v.48, n.3, p.284–289, 2010.

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

LOPEZ, E.; ORDUZ, S. *Metarhizium anisopliae* and *Trichoderma viride* for control of nests of the fungus-growing ant, *Atta cephalotes*. **Biological Control**, Orlando, v.27, p.194–200, 2003.

LORO, M.; VALERO-JIMÉNEZ, C. A.; NOZAWA, S.; MÁRQUEZ, L. M. Diversity and composition of fungal endophytes in semiarid Northwest Venezuela. **Journal of Arid Environments**, London, v.85, p.46–55, 2012.

LUMINI, E.; ORGIAZZI, A.; BORRIELLO, R.; BONFANTE, P.; BIANCIOTTO, V. Disclosing arbuscular mycorrhizal fungal biodiversity in soil through a land-use gradient using a pyrosequencing approach. **Environmental Microbiology**, Oxford, v.12, n.8, p.2165–2179, 2010.

MENDES, T. D.; RODRIGUES, A.; DAYO-OWOYEMI, I.; MARSON, F. A. L.; PAGNOCCA, F. C. Generation of nutrients and detoxification: possible roles of yeasts in leaf-cutting ant nests. **Insects**, Basel, v.3, p.228–245, 2012.

MIDDELHOVEN, W. J.; FONSECA, A.; CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C. *Cryptococcus haglerorum* sp. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast isolated from nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.83, p.167–174, 2003.

MONTOYA, Q. V.; MEIRELLES, L. A.; CHAVERRI, P.; RODRIGUES, A. Unraveling *Trichoderma* species in the attine ant environment: description of three new taxa. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.109, n.5, p.633–51, 2016.

MUELLER, U. G. Symbiont recruitment versus ant-symbiont co-evolution in the attine ant‑microbe symbiosis. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v.15, n.3, p.269–277, 2012.

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

O'GORMAN, C. M.; FULLER, H. T. Prevalence of culturable airborne spores of selected allergenic
and pathogenic fungi in outdoor air. **Atmospheric Environment**, Oxford, v.42, p.4355–4368, 2008.

ORTIZ, A.; ORDUZ, S. *In vitro* evaluation of *Trichoderma* and *Gliocladium* antagonism against symbiotic fungus of the leafcutting ant *Atta cephalotes*. **Mycopathologia**, Den Haag, v.150, p.53–60, 2000.

PAGNOCCA, F. C.; RODRIGUES, A.; NAGAMOTO, N. S.; BACCI Jr, M. Yeasts and filamentous fungi carried by the gynes of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.94, 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**, Reading, v.60, p.1454–1459, 2010.

REIS, B. M. S.; SILVA, A.; ALVAREZ, M. R.; OLIVEIRA, T. B.; RODRIGUES, A. Fungal communities in gardens of the leafcutter ant *Atta cephalotes* in forest and cabruca agrosystems of southern Bahia State (Brazil). **Fungal Biology**, Oxford, v.119, p.1170–1178, 2015.

ROBERT, V.; VU, D.; AMOR, A. B. H. et al. MycoBank gearing up for new horizons. **IMA Fungus**, Surrey, v.4, n.2, p.371–379, 2013.

RODRIGUES, A.; PASSARINI, M. R. Z.; FERRO, M.; NAGAMOTO, N. S.; FORTI, L. C.; BACCI Jr, M.; SETTE, L. D.; PAGNOCCA, F. C. Fungal communities in the garden chamber soils of leaf-cutting ants. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v.54, n.11, p.1186, 2014.

RONAGHI, M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v.11, p.3–11, 2001.

SAMUELS, G. J.; ROSSMAN, A. Y.; CHAVERRI, P.; OVERTON, B. E.; PÕLDMAA, K. Hypocreales of the Southeastern United States: an identification guide. **CBS Biodiversity Series**, Utrecht, v.4, p.1–145, 2006.

SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L.; RYABIN, T.; HALL, J. R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E. B.; LESNIEWSKI, R. A.; OAKLEY, B. B.; PARKS, D. H.; ROBINSON, C. J.; SAH, J. W.; STRES, B.; THALLINGER, G. G.; VAN HORN, D. J.; WEBER, C. F. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.75, n.23, p.7537–7541, 2009.

SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. **Bioinformatics**, Oxford, v.27, n.863–864, 2011.

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

SILVA, A.; BACCI Jr, M.; 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.

SIQUEIRA, C. G.; BACCI Jr, M.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A. Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, p.4820–4822, 1998.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v.30, p.2725–2729, 2013.

TEDERSOO, L.; NILSSON, R. H.; ABARENKOV, K.; JAIRUS, T.; SADAM, A.; SAAR, I.; BAHRAM, M.; BECHEM, E.; CHUYONG, G.; KÕLJALG, U. 454 Pyrosequencing and Sanger sequencing of tropical mycorrhiza fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases. **New Phytologist**, Cambridge, v.188, p.291–301, 2010.

THOMMA, B. P. H. J.; VAN ESSE, H. P.; CROUS, P. W.; DE WIT, P. J. G. M. *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*), a highly specialized plant pathogen as a model for functional studies on plant pathogenic Mycosphaerellaceae. **Molecular Plant Pathology**, London, v.6, n.4, p.379–393, 2005.

VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; HONG, S. –B.; KLAASEN, C. H. W.; PERRONE, G.; SEIFERT, K. A.; VARGA, J.; YAGUCHI, T.; SAMSON, R. A. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.78, p.343–371, 2014.

WEBER, N. A. The fungus-culturing behavior of ants. **American Zoologist**, Thousand Oaks, v.12, p.577–587, 1972.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; WHITE, T.; SNINSKY, J. J. (Eds.) **PCR protocols**: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990.

ZHANG, Y.; CROUS, P. W.; SCHOCH, C. L.; HYDE, K. D. Pleosporales. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v.53, p.1–221, 2012.

3.7 Online Resource 1

Table ESM 1 – BLASTn results for the 99 MOTUs obtained from the integument of leaf-cutting ants by 454 pyrosequencing.

(continued)

Best hit at NCBI database	Coverage (%)	Similarity (%)	Accession nº	N° of reads		
				AC drones	AC gynes	AL drones
Ascomycota						
Order Capnodiales						
Catenulostroma protearum	100	93	GU214628	2	0	0
Cladosporium-complex	100	100	KP143685	17520	377	6202
Microcyclospora tardicrescens	91	93	JQ358790	3	0	0
Mycosphaerellaceae sp.	99	98	GU214703	2	0	0
Mycosphaerella heimii	100	99	EF394841	39	2	0
Mycosphaerella konae	100	93	GQ852746	2	0	0
Pseudocercospora norchiensis	100	100	EF394859	52	3	0
Pseudocercospora fuligena	100	88	GU214675	0	5	0
Ramichloridium brasilianum	100	97	EU041797	28	3	0
Teratosphaeriaceae sp. 1	100	100	KT833155	0	11	0
Teratosphaeriaceae sp. 2	100	94	KT833169	213	32	0
Teratosphaeriaceae sp. 3	98	97	KT833168	0	0	107
Teratosphaeriaceae sp. 4	100	99	KT833162	0	58	0
Teratosphaeriaceae sp. 5	92	97	KT833170	2	0	0
Uncultured *Davidiella* 1	100	96	HG935309	0	0	2
Uncultured *Davidiella* 2	99	98	HG935237	6	2	0
Uncultured *Davidiella* 3	82	99	HG935303	0	0	19
Uncultured fungus 2	94	95	KF800571	0	2	0
Uncultured soil fungus 2	66	99	JQ666416	2	0	0

Table ESM 1 – BLASTn results for the 99 MOTUs obtained from the integument of leaf-cutting ants by 454 pyrosequencing.

(continued)

Best hit at NCBI database	**Coverage (%)**	**Similarity (%)**	**Accession nº**	**N° of reads**		
				AC drones	AC gynes	AL drones
Order Chaetothyriales						
Exophiala spinifera	99	97	JX966556	6	0	0
Strelitziana africana	100	99	DQ885895	4	4	0
Order Dothideales						
Aureobasidium leucospermi	100	99	JN712487	0	0	399
Aureobasidium pullulans 1	83	98	FJ744598	0	0	10
Aureobasidium pullulans 2	78	100	KP638734	0	0	2
Uncultured *Aureobasidium*	78	98	KF385316	0	0	12
Order Eurotiales						
Aspergillus-complex	100	93	AY373890	0	0	18
Penicillium-complex	99	99	JF327829	3	0	0
Order Glomerellales						
Colletotrichum gloeosporioides	100	99	KJ632407	0	0	3
Colletotrichum siamense	100	99	KP703365	0	0	17
Order Helotiales						
Cadophora malorum	100	100	KT959320	0	2	0

Table ESM 1 – BLASTn results for the 99 MOTUs obtained from the integument of leaf-cutting ants by 454 pyrosequencing.

(continued)

Best hit at NCBI database	Coverage (%)	Similarity (%)	Accession nº	N° of reads		
				AC drones	AC gynes	AL drones
Order Hypocreales						
Bionectria sp.	100	99	HM849058	0	0	111
Clonostachys byssicola	100	100	KC806270	10	6	0
Fusarium annulatum	100	100	AY213654	0	0	13
Fusarium decemcellulare	100	99	KR534720	5	2	25
Fusarium incarnatum-equiseti complex	100	100	KJ562367	0	0	96
Fusarium oxysporum	100	100	KT794176	19	35	0
Fusarium polyphialidicum	100	99	EF687915	16	3	67
Fusarium solani	100	100	KT184399	3	0	0
Fusarium sp.	81	98	KF746131	0	0	3
Myrothecium gramineum	100	97	KJ780796	2	0	0
Trichoderma-complex	100	100	KR296867	0	0	5
Order Magnaporthales						
Ascomycota sp.	99	95	JQ692165	17	4	5
Pyriculariopsis parasitica	95	97	AY265340	19	4	0
Order Pleosporales						
Alternaria alternata	100	100	KU866390	0	0	74
Bipolaris cynodontis	100	99	KJ909767	0	0	17
Cochliobolus cynodontis	100	98	JN943392	0	0	2

Table ESM 1 – BLASTn results for the 99 MOTUs obtained from the integument of leaf-cutting ants by 454 pyrosequencing.

(continued)

Best hit at NCBI database	Coverage (%)	Similarity (%)	Accession nº	N° of reads		
				AC drones	AC gynes	AL drones
Order Pleosporales						
Cochliobolus sp.	100	99	KM362367	0	2	0
Coniothyrium sp.	87	98	DQ092505	145	0	5
Curvularia trifolii	100	99	KR093892	5	0	0
Dothideomycetes sp.	100	99	KM519276	970	0	0
Epicoccum nigrum	100	91	FJ424262	0	0	6
Epicoccum sp.	100	99	KR024724	0	0	3955
Leptosphaeria sp.	100	98	AJ608969	6	0	6
Periconia macrospinosa	100	99	JQ781723	66	0	0
Periconia sp.	100	100	HQ607981	41	0	0
Phaeosphaeria sp.	100	99	HQ631018	12	0	0
Phaeosphaeriopsis sp.	100	96	KC478551	3	0	13
Phanerochaete tuberculata	98	94	AY219356	0	10	0
Phoma draconis	88	100	KP276621	322	0	0
Phoma herbarum	100	99	KT319052	0	3	0
Phoma sp. 1	100	95	HQ846581	19	0	0
Phoma sp. 2	69	100	KM979945	0	0	2
Phoma sp. 3	91	98	KJ173541	16	0	0
Pleosporales sp.	100	99	HQ631015	0	0	10
Teratosphaeria considenianae	99	96	GQ852791	0	0	10
Torula herbarum	98	97	NR_132929	10	0	0

Table ESM 1 – BLASTn results for the 99 MOTUs obtained from the integument of leaf-cutting ants by 454 pyrosequencing.

(continued)

Best hit at NCBI database	Coverage (%)	Similarity (%)	Accession nº	N° of reads		
				AC drones	AC gynes	AL drones
Order Pleosporales						
Uncultured fungus 1	100	99	GU053794	49	0	95
Uncultured fungus 3	100	91	JQ081528	0	0	4
Uncultured fungus 4	100	99	FJ213550	0	6	0
Uncultured fungus 5	100	96	KF800405	0	0	8
Uncultured fungus 6	100	98	KF800357	0	0	11
Uncultured soil fungus 1	100	98	JQ666415	0	0	33
Order Saccharomycetales						
Debaryomyces hansenii	100	99	EF543259	0	0	5
Lipomyces kononenkoae	100	100	AB747653	7	0	0
Meyerozyma caribbica	100	100	KP132416	2	0	0
Order Sordariales						
Chaetomium funicola	100	100	KR909159	0	0	13
Chaetomium sp.	100	99	KM520348	0	0	7
Uncultured *Podospora*	100	96	HG936000	0	0	8
Basidiomycota						
Order Agaricales						
Leucoagaricus gongylophorus	100	99	KJ531208	5	351	0
Pleurotus ostreatus	100	99	HM770884	0	0	9

Table ESM 1 – BLASTn results for the 99 MOTUs obtained from the integument of leaf-cutting ants by 454 pyrosequencing.

(continued)

Best hit at NCBI database	Coverage (%)	Similarity (%)	Accession nº	N° of reads		
				AC drones	AC gynes	AL drones
Order Filobasidiales						
Filobasidium uniguttulatum	100	99	KP132189	0	0	5
Order Hymenochaetales						
Resinicium saccharicola	85	99	DQ826549	4	0	0
Order Sporidiobolales						
Rhodotorula mucilaginosa	100	99	KU864995	0	0	23
Sporobolomyces sp.	98	99	FJ515188	0	0	9
Order Tremellales						
Cryptococcus laurentii 1	81	98	KP131909	2752	0	0
Cryptococcus laurentii 2	100	93	KP131909	9	0	0
Cryptococcus paraflavus	88	95	AY395800	6	0	0
Cryptococcus podzolicus	100	100	FR716534	13	0	38
Cryptococcus sp.	100	98	FM178288	22	0	0
Dioszegia zsoltii var. *zsoltii*	100	99	EU266502	0	2	0
Fellomyces sp.	88	93	AJ608657	2	0	0
Kockovaella schimae	100	92	AF444479	3	0	0
Trichosporon chiarellii	99	99	GQ338074	0	5	0
Trichosporon asahii	100	99	KU095859	0	0	63

Table ESM 1 – BLASTn results for the 99 MOTUs obtained from the integument of leaf-cutting ants by 454 pyrosequencing.

(conclusion)

Best hit at NCBI database	**Coverage (%)**	**Similarity (%)**	**Accession nº**	**N° of reads**		
				AC drones	AC gynes	AL drones
Mucoromycotina						
Order Mucorales						
Cunninghamella bainieri	99	93	KF201293	145	0	0
Cunninghamella sp. 1	88	90	KR812209	339	0	0
Cunninghamella sp. 2	81	94	JQ889699	3	0	0
Cunninghamella sp. 3	98	86	KR812209	2	0	0
Mucor circinelloides	100	99	KP836336	0	0	19

AC *Atta capiguara*; AL *Atta laevigata*

3.8 Online Resource 2

Figure ESM 2 – Alate reproductive caste of *Atta capiguara* ants leaving the nest to perform the mating flight. The white arrow indicates a drone while the black arrow indicates a gyne.



Source: Dr. Luiz Carlos Forti

4 CAPÍTULO 3

Riding with the ants

A.P.M. Duarte [1] - D. Attili-Angelis[1,2] - N.C. Baron[1] - J.Z. Groenewald[3] - P.W. Crous[3,4,5] - F.C. Pagnocca[1]

[1] Center for the Study of Social Insects, UNESP – Rio Claro, SP, Brazil
[2] Division of Microbial Resources, CPQBA - University of Campinas, SP, Brazil
[3] CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands
[4] Department of Microbiology and Plant Pathology, Forestry and Agricultural Biotechnology Institute (FABI), University of Pretoria, South Africa
[5] Microbiology, Department of Biology, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands

Este capítulo é baseado no artigo original em revisão pela revista Persoonia (submetido em 21 de junho de 2016).

4.1 Abstract

Isolates of Teratosphaeriaceae have frequently been found in the integument of attine ants, proving to be common and diverse in this microenvironment. The LSU phylogeny of the ant-associated strains studied revealed that they cluster in two main lineages. The first was associated with the genus *Xenopenidiella* whereas the other represented two ant-associated lineages sister to the taxa *Penidiella aggregata* and *P. drakensbergensis*, which are allocated to the new genus *Penidiellomyces*. The genus *Penidiella* is limited to the lineage containing *P. columbiana*, which is not congeneric with *Penidiellomyces* or *Penidiellopsis*, nor with *Simplicidiella*, a novel genus introduced here to accommodate a strain isolated from ants. For species level analysis, the final 26 aligned sequences of the ITS (498 characters), *cmdA* (389 characters), *tef1* (342 characters) and *tub2* (446 characters) regions lead to the introduction of six new species in *Xenopenidiella*, and one in respectively *Penidiellopsis* and *Simplicidiella*. The species described in this study were distinguished by the combination of morphological and phylogenetic data. Novelties on the integument of leaf-cutting ants from Brazil include: *Penidiellopsis ramosus, Xenopenidiella clavata, X. formica, X. inflata, X. laevigata, X. nigrescens, X. tarda* spp. nov., and *Simplicidiella nigra* gen. & sp. nov. Beta-tubulin is recommended as primary barcode for the distinction of species in *Penidiellopsis*, whereas ITS was sufficient to distinguish species of *Xenopenidiella*.

Key words: Attini tribe, leaf-cutting ants, multi-gene analyses, *Penidiellopsis*, *Simplidiella*, *Xenopenidiella*

4.2 Introduction

Seen as important symbionts, fungi interact with a wide range of organisms, including insects (McLAUGHLIN et al., 2009). According to Hawksworth (2012) it is estimated that at least 1.5–3 M species of fungi are living on Earth, of which only around 100 000 are presently known (CROUS et al., 2015). Since the symbiotic relationships of attine ants with fungi are not fully understood and comprise a wide fungal diversity (PAGNOCCA et al., 2008; RODRIGUES et al. 2011; DUARTE et al., 2014), nests of ants are favourable environments to investigate for undescribed taxa.

The symbiosis between attine ants and their mutualistic fungi (Leucocoprineae and Pterulaceae), nourished as food source (MUELLER; RABELING, 2008), exists for approximately 50 M years (SCHULTZ; BRADY, 2008). In order to maintain the symbiont, attine ants utilize different agricultural systems (SCHULTZ; BRADY, 2008). The leaf-cutter agriculture performed by genera *Atta* and *Acromyrmex* is the most common in Brazil and consists of cutting fresh plant material being incorporated into the fungal garden and used as energy source for the growth of the mutualistic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (WEBER, 1972).

Recent studies of melanised fungi carried in the integument of leaf-cutting ants have revealed the existence of a wide diversity of undescribed fungal species (DUARTE et al., 2014). Little and Currie (2007) were the first to show an association between a black yeast (phialophora-like), classified by the authors as the fifth symbiont, and *Apterostigma* ants (tribe Attini).

Thus far three new black fungal species isolated from leaf-cutting ants have been described: *Phialophora attae*, *P. capiguare* (ATTILI-ANGELIS et al., 2014) and *Ochroconis globalis* (SAMERPITAK et al., 2015). In addition, Duarte et al. (2014) isolated several unknown species affiliated to Teratosphaeriaceae, which are the subject of the present study.

The Teratosphaeriaceae was originally separated from Mycosphaerellaceae (CROUS et al., 2007) and circumscribed to include saprobic, extremophilic, human opportunistic and plant pathogenic fungi (QUAEDVLIEG et al., 2014). Although often linked to diseases in plants, especially Myrtaceae and Proteaceae hosts (PÉREZ et al. 2009; CARNEGIE et al., 2011; CROUS; GROENEWALD, 2011; HUNTER et al., 2011), Teratosphaeriaceae species do not have reports of specific associations with ants. However, this family is also rich in

genera and species associated with rocks and other extreme environments (EGIDI et al., 2014), and its ecology remains insufficiently known.

In a recent revision to phylogenetically and morphologically classify lineages in Teratosphaeriaceae, Quaedvlieg et al. (2014) generated a multi-locus DNA sequence dataset and introduced 17 new genera within Teratosphaeriaceae, including *Xenopenidiella*, a saprobic fungus on leaf litter. *Xenopenidiella* was introduced based on a single species, *X. rigidophora*, which was represented by a single isolate (QUAEDVLIEG et al., 2014). The discovery of more species of *Xenopenidiella* will thus allow for a more robust generic circumscription of the genus and facilitate a better understanding of its ecology.

The present study aims to provide a taxonomic study of Teratosphaeriaceae species obtained from the integument of leaf-cutting ants from Brazil. Here, we describe one novel genus associated with ants (*Simplicidiella nigra*), a new species of *Penidiellopsis* (*Penidiellopsis ramosus*), and six new species of *Xenopenidiella* (*X. clavata*, *X. formica*, *X. inflata*, *X. laevigata*, *X. nigrescens*, *X. tarda*). A third genus, *Penidiellomyces*, is also introduced for two species of *Penidiella* s.lat.

4.3 Materials and Methods

4.3.1 Isolation techniques

In order to isolate the fungi present in the integument of attine ants, three different methods were used as described below. For the oil flotation technique (SATOW et al., 2008) the bodies of sampled ants were immersed in 25 mL of saline solution (NaCl 0.85 %) with antibiotics (200 U penicillin, 200 µg/mL chloramphenicol, 200 µg/mL streptomycin and 500 µg/mL cycloheximide). Tubes were vortexed and after 30 min of incubation at room temperature, approximately 20 % sterile mineral oil was added, followed by vortexing for 5 min. After 20 min of settling, 100 µL aliquots were removed from the oil-solution interface and plated on Mycosel agar using a Drigalsky rod. Plates were incubated in the dark at 25 °C and monitored daily until the appearance of fungal colonies.

For the nitrogen-free cultivation, ants were immersed in distilled water and sonicated for 15 min. Then, 150 µL of the solution containing fungal cells in suspension were plated in a free-nitrogen medium described by Thanh (2006). Plates were incubated in the dark at 25 °C for 3 wk. In the third method, a dextrose 50 % enrichment technique was performed by

immersing the ants in tubes containing 50 % dextrose and 0.5 % yeast extract. After 10 d of incubation in the dark at 28 °C, tubes were shaken and 150 µL of the mixed solution was plated on malt-dextrose agar (1 % malt, 1 % dextrose, 0.01 % chloramphenicol, 2 % agar) and again incubated in dark at 28 °C for 10 d (THANH et al., 2013).

4.3.2 Fungal isolates

The 25 isolates analysed are listed in Table 1 and were all obtained from the integument of *Atta capiguara* and *A. laevigata* leaf-cutting ant gynes (primary reproductive female caste) and drones (male caste which role is to mate with a gyne) from Brazil.

All isolates are maintained in the culture collection of the Microbial Resource Centre (CRM-UNESP, Brazil). Ex-type strains were deposited in the CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre (The Netherlands) and in the Brazilian Collection of Environmental and Industrial Microorganisms (CBMAI, Brazil).

4.3.3 DNA extraction

Isolates were inoculated to MA (2 % Malt Agar) plates and incubated in the dark at 25 °C for 14–21 d. Approximately 1 cm^2 of mycelium was transferred to a 2 mL microtube containing 500 µL of lysis buffer (50 mmol/L Tris-HCl; 250 mmol/L NaCl; 50 mmol/L EDTA; 0.3 % w/v SDS; pH 8) and the equivalent to 100 µL of glass beads (SIGMA-ALDRICH G8893). After vortexing for 4 min, the microtubes were incubated for 1 h at 65 °C (two replicates). After centrifugation for 15 min at 13.000 rpm the aqueous phase with DNA was transferred into new microtubes. DNA extracts were stored at -20 °C prior to use.

4.3.4 Multi-locus PCR amplification and sequencing

Isolates were screened for five loci (ITS, LSU, *cmdA*, *tef1* and *tub2*) using the primer sets listed in Table 2. Amplification reactions were performed in a total volume of 25 µL containing 1 µL of 50 mM $MgCl_2$, 4 µL of 1.25 mM of dNTP Mix, 2.5 µL of 10× PCR buffer, 2 µL of 10 µM of each primer (100 µM stock concentration), 0.2 µL of 5 U/µL of Taq polymerase (Invitrogen), 5 µL of DNA template (diluted 1:100) and 8.3 µL PCR water. PCR conditions were set as follows: an initial denaturation temperature of 96 °C for 2 min,

followed by 35 cycles of denaturation at 96 °C for 45 s, primer annealing at the temperature stated in Table 2, primer extension at 72 °C for 90 s and a final extension step at 72 °C for 2 min. PCR products were analysed on a 1 % agarose gel and a negative control (DNA free) was also included to check for possible contaminations. Amplicons were purified using a NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel), according to the manufacturer's instructions. The PCR products were sequenced using the BigDye® Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and an ABI Prism® 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Consensus sequences were generated using the BioEdit Sequence Alignment Editor v. 7.0.5.3 (HALL, 1999).

4.3.5 Alignment and phylogenetic reconstruction

A preliminary identification of the isolates to genus level was made by comparing the consensus LSU sequences against NCBI's GenBank nucleotide database using the megaBLAST algorithm. The most similar sequences were downloaded in FASTA format and subsequently combined with the *Teratosphaeriaceae* alignment of Quaedvlieg et al. (2014) (TreeBASE study S16145). A draft phylogeny was created from this alignment (data not shown), after which a reduced dataset was used to generate the final overview phylogeny presented here. The species level phylogeny was created from a concatenated alignment consisting of ITS, *cmdA*, *tub2* and *tef1* sequences. All loci were aligned individually using the MAFFT v. 7 online portal (http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html; KATOH; STANDLEY, 2013), after which they were manually checked and improved in MEGA v. 6.06. A parsimony analysis was performed on the overview LSU alignment and the combined 4-locus alignment as described by Arzanlou et al. (2008). Gaps were treated as a new state, missing data were indicated as missing data in the analyses and statistics such as tree length, consistency index, retention index and rescaled consistency index (TL, CI, RI and RC, respectively) were calculated. Bayesian analysis was performed on the LSU tree using MrBayes v. 3.2.1 (RONQUIST et al., 2012). Sequences derived from this study were deposited in GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) (Table 1), and the alignments and trees in TreeBASE (www.treebase.org/treebase/index.html). The resulting phylogenetic trees were printed with Geneious v. 7.1.8 (http://www.geneious.com; KEARSE et al., 2012), and the layout of the tree for publication was done using Adobe Illustrator v. CS6.

Table 1 – Fungal isolates details and GenBank accession numbers of isolates included in this study.

(continued)

Species	Isolate number[1]	Source	Isolation technique	GenBank Accession numbers[2]				
				tub2	*cmdA*	*tef1*	ITS	LSU
Penidiellopsis radicularis	AP386 = CBS 131976 = CBMAI 1938^{ET}	AC gyne	Oil flotation	KU216267	KU216292	KU216339	KT833148	KU216314
	AP387 = CBS 131979 = CBMAI 1947	AC gyne	Oil flotation	KU216268	KU216293	KU216340	KT833149	KU216315
	AP389	AC gyne	Oil flotationl	KU216269	KU216294	KU216341	KT833150	KU216316
	AP410 = CBS 131963	AC gyne	Oil flotation	KU216272	KU216297	KU216344	KT833153	KU216319
	AP418	AC gyne	Oil flotation	KU216273	KU216298	KU216345	KT833154	KU216320
	AP440 = CBS 132769 = CBMAI 1951	AC gyne	Oil flotation	KU216276	KU216301	KU216348	KT833157	KU216323
	DOC350 = CBMAI 1952	AC drone	Nitrogen-free	KU216277	–	KU216349	KT833158	KU216324
	DOC363 = CBMAI 1953	AC drone	Nitrogen-free	KU216278	KU216302	KU216350	KT833159	KU216325
Penidiellopsis ramosus	AP391 = CBMAI 1937^{ET}	AC gyne	Oil flotation	KU216270	KU216295	KU216342	KT833151	KU216317
	AP392 = CBMAI 1948	AC gyne	Oil flotation	KU216271	KU216296	KU216343	KT833152	KU216318
	AP420 = CBMAI 1949	AC gyne	Oil flotation	KU216274	KU216299	KU216346	KT833155	KU216321
	AP421 = CBMAI 1950	AC gyne	Oil flotation	KU216275	KU216300	KU216347	KT833156	KU216322
Simplicidiella nigra	AP 416 = CBMAI 1939^{ET}	AC gyne	Oil flotation	KU216266	KU216291	KU216338	KT833147	KU216313
Xenopenidiella clavata	DOC354 = CBMAI 1942^{ET}	AC drone	Nitrogen-free	KU216287	–	–	KT833168	KU216334
Xenopenidiella formica	67N = CBMAI 1954	AL drone	Oil flotation	KU216282	KU216306	KU216354	KT833163	KU216329
	AP380 = CBMAI 1946	AC gyne	Oil flotation	KU216283	KU216307	KU216355	KT833164	KU216330
	DOC323 = CBMAI 1941^{ET}	AC drone	Nitrogen-free	KU216284	KU216308	KU216356	KT833165	KU216331
	DOC349	AC drone	Nitrogen-free	KU216285	KU216309	KU216357	KT833166	KU216332
	DOC362	AC drone	Nitrogen-free	KU216286	KU216310	KU216358	KT833167	KU216333

Table 1 – Fungal isolates details and GenBank accession numbers of isolates included in this study.

(conclusion)

Species	Isolate number[1]	Source	Isolation technique	GenBank Accession numbers[2]				
				tub2	*cmdA*	*tef1*	ITS	LSU
Xenopenidiella inflata	87N = CBMAI 1945^{ET}	AL drone	Oil flotation	KU216290	KU216312	KU216359	KT833171	KU216337
Xenopenidiella laevigata	89N = CBMAI 1944^{ET}	AL gyne	Oil flotation	KU216289	–	–	KT833170	KU216336
Xenopenidiella nigrescens	DOC356 = CBMAI 1943^{ET}	AC drone	Nitrogen-free	KU216288	KU216311	–	KT833169	KU216335
Xenopenidiella tarda	DOC248 = CBMAI 1940^{ET}	AC drone	Dextrose 50%	KU216279	KU216303	KU216351	KT833160	KU216326
	DOC317	AC drone	Nitrogen-free	KU216280	KU216304	KU216352	KT833161	KU216327
	DOC343	AC drone	Nitrogen-free	KU216281	KU216305	KU216353	KT833162	KU216328

[1] CBS: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands; CBMAI: Brazilian Collection of Environmental and Industrial Microorganisms; all other codes are placed in the culture collection of the Microbial Resource Centre (UNESP, Brazil).

[2] *cmdA*: partial calmodulin gene; ITS: internal transcribed spacers and intervening 5.8S nrDNA; LSU: partial 28S nrRNA gene; *tef1*: partial translation elongation factor 1-alpha; *tub2*: partial beta-tubulin gene.

^{ET} ex-type.

AC *Atta capiguara*; AL *Atta laevigata*

Table 2 – Primer combinations used for amplification and sequencing.

Locus	Primer	Primer sequence 5' to 3'	Annealing temperature (°C)	Orientation	Reference
β-tubulin (*tub2*)	T1	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	52	Forward	O'Donnell & Cigelnik (1997)
	β-Sandy-R	GCRCGNGGVACRTACTTGTT		Reverse	Stukenbrock et al. (2012)
Calmodulin (*cmdA*)	CAL-235F	TTCAAGGAGGCCTTCTCCCTCTT	50	Forward	Quaedvlieg et al. (2012)
	CAL2Rd	TGRTCNGCCTCDCGGATCATCTC		Reverse	Groenewald et al. (2013)
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	52	Forward	White et al. (1990)
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		Reverse	White et al. (1990)
LSU (28S nrDNA)	LSU1Fd	GRATCAGGTAGGRATACCCG	52	Forward	Crous et al. (2009a)
	LR5	TCCTGAGGGAAACTTCG		Reverse	Vilgalys & Hester (1990)
Translation elongation factor-1α (*tef1*)	EF1-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	52	Forward	Carbone & Kohn (1999)
	EF-2	GGARGTACCAGTSATCATGTT		Reverse	O'Donnell et al. (1998)

4.3.6 Morphology

Colony characters and pigment production were observed on MA, PDA (Potato Dextrose Agar, Acumedia®) and CMA (Corn Meal Agar, Himedia®) at 25 °C in the dark for 21 d. Microscopic observations were based on slide culture techniques using CMA due to the rapid induction of sporulation. Agar blocks of ~1 cm^2 were placed on a sterile Petri dish and inoculated at the four sides. The block was subsequently covered with a sterile cover slip (~2 cm^2). Plates were incubated at 25 °C in the dark for 14–21 d. Slides were made in distilled water. Micrographs were taken using a phase-contrast microscope (DM 750, Leica; software Leica Application Suite v. 3.5.0, Leica).

4.4 Results

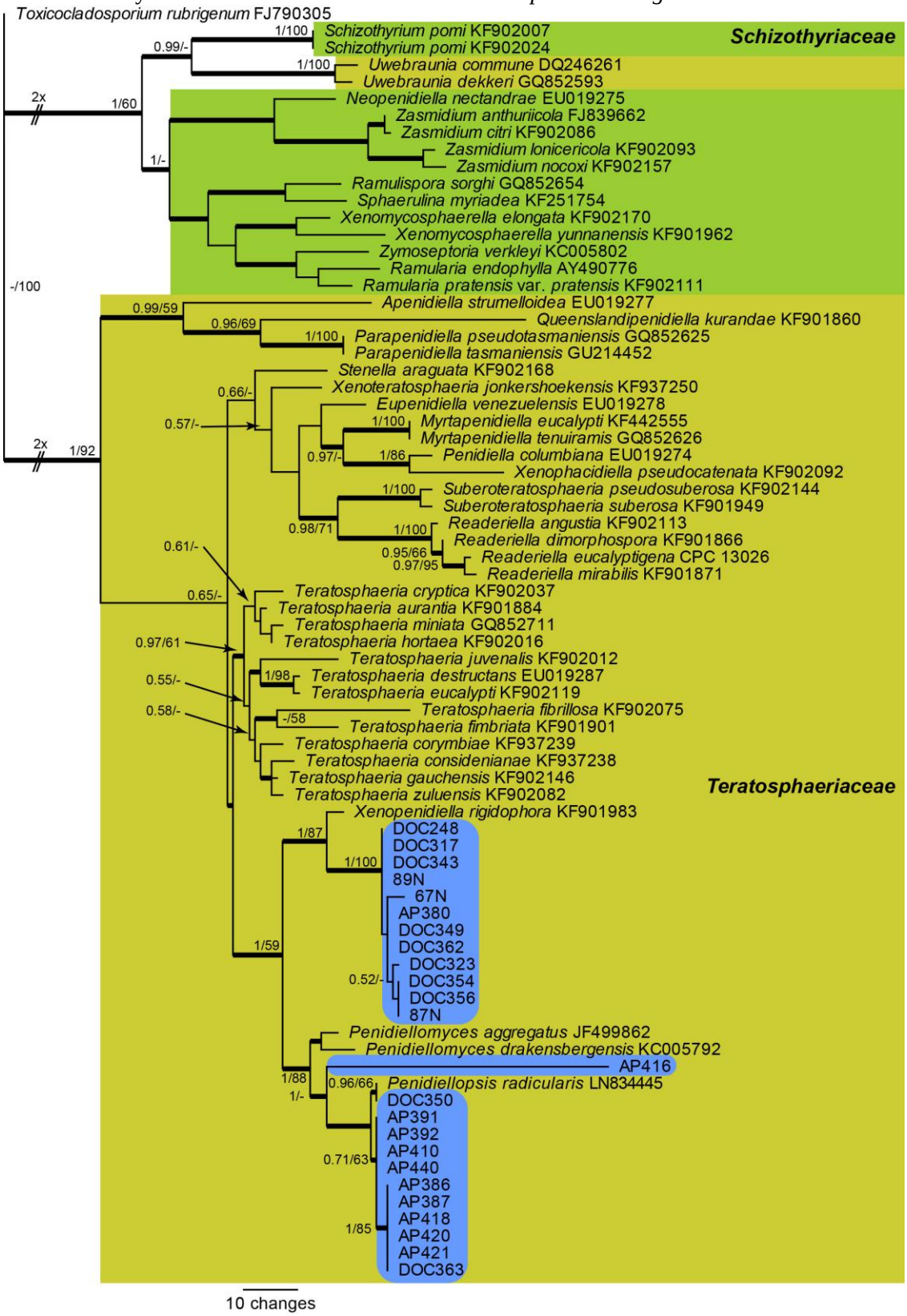
4.4.1 Phylogeny

The LSU alignment consisted of 75 sequences (including the outgroup sequence, *Toxicocladosporium rubrigenum* GenBank FJ790305) and 776 characters were included in the analysis. Of the 776 analysed characters, 174 were parsimony informative, 85 variable characters were parsimony-uninformative and 517 characters were constant. A maximum of 1 000 equally most parsimonious trees were saved, one of which is shown in Fig. 1 (TL = 799 steps; CI = 0.458; RI = 0.777; RC = 0.356). The LSU phylogeny revealed that the strains from ants are present in two main clades, one of which is associated with the genus *Xenopenidiella*, whereas the other has as closest neighbour "*Penidiella*" *aggregata* (Genbank JF499862) and "*Penidiella*" *drakensbergensis* (GenBank KC005792) and the recently described genus *Penidiellopsis* (GenBank LN834445). As the genus *Penidiella* is restricted to the lineage containing *P. columbiana* (represented here by GenBank EU019274, obtained from the ex-type culture CBS 486.80), which is not congeneric with the lineage containing *P. aggregata*, *P. drakensbergensis* and the ant strains, one novel genus, *Simplicidiella*, is described below to accommodate one of the strains isolated from ants and another new genus, *Penidiellomyces*, is proposed for the two "*Penidiella*" species. This topology was also supported by a Bayesian analysis (data not shown, posterior probability values plotted on Fig. 1; dirichlet (1,1,1,1)

state frequency distribution and inverse gamma-shaped rate variation across sites (GTR+I+G) as priors and 255 unique site patterns).

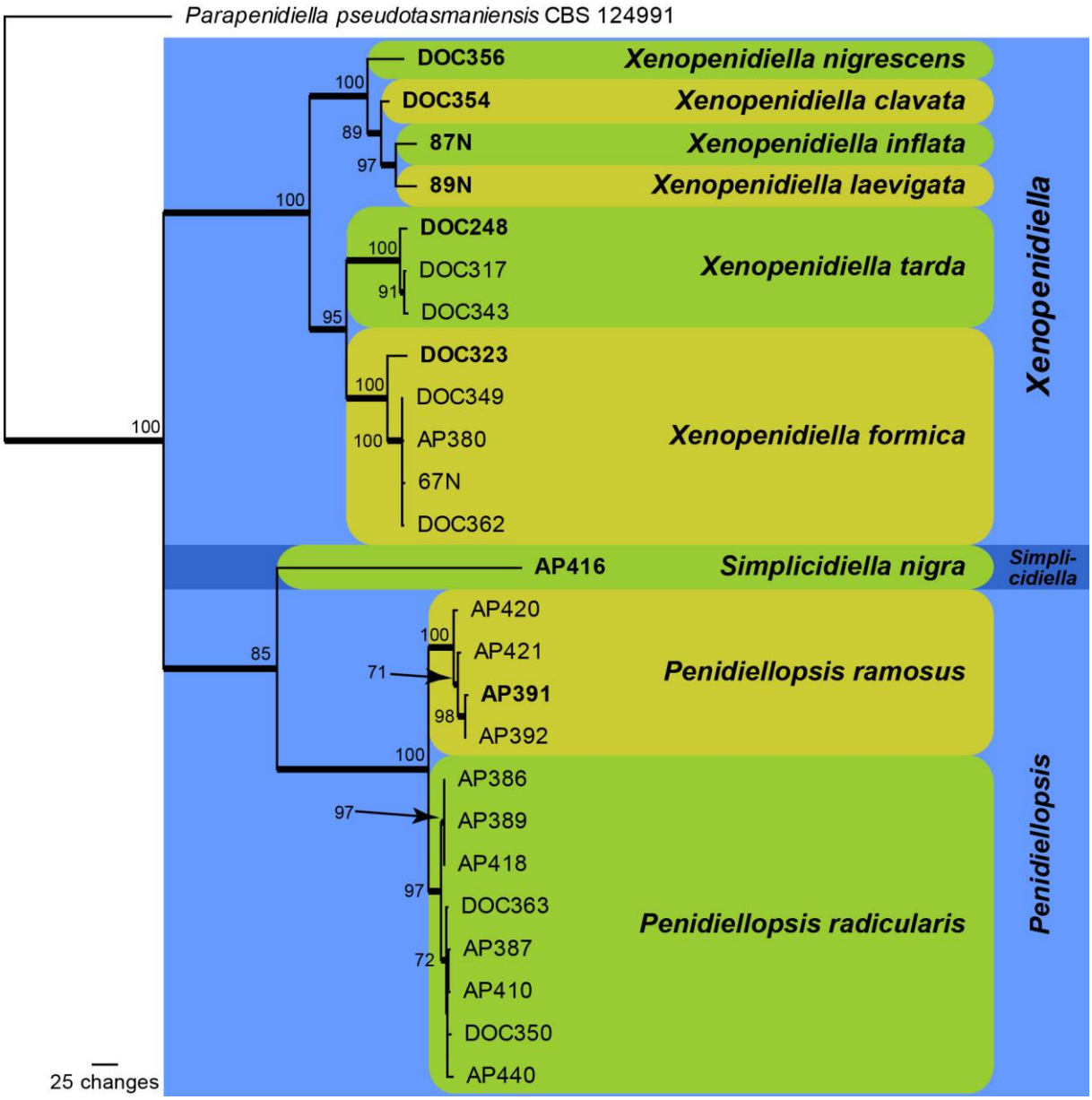
For the species level analysis, a concatenated sequence alignment from 26 strains (including the outgroup species *Parapenidiella pseudotasmaniensis* strain CBS 124991) was subjected to maximum parsimony analyses. The final aligned sequences of the ITS (498 characters), *cmdA* (389 characters), *tef1* (342 characters) and *tub2* (446 characters) gene regions had a total length of 1 675 characters (including alignment gaps) which were included in the analyses. The gaps in the alignment were treated as fifth base for the parsimony analyses. From the analysed characters, 902 were constant (ITS: 293, *cmdA*: 257, *tef1*: 152, *tub2*: 200), 255 were variable and parsimony-uninformative (ITS: 93, *cmdA*: 44, *tef1*: 65, *tub2*: 53) and 518 were parsimony informative (ITS: 112, *cmdA*: 88, *tef1*: 125, *tub2*: 193). A total of 59 equally most parsimonious trees (TL = 1 343 steps, CI = 0.832, RI = 0.944, RC = 0.786) were saved from the parsimony analysis, one of which is shown in Fig. 2. Rerunning the analysis without the *tef1* sequences (the least complete data set) did not result in an overall topology that was much different from the topology depicted in Fig. 2; only some internal rearrangements were observed between the isolates representing each of the two multi-strain species in *Penidiellopsis* (data not shown). The ITS sequence of strain DOC 350 was 100 % identical to *Penidiellopsis radicularis* (GenBank LN834441); unfortunately no other loci were available to include the ex-type culture of this species in the multi-gene phylogeny. Several unique lineages are present in the obtained phylogeny (Fig. 2), and these are described as novel species in the Taxonomy section below.

Figure 1 – One of 1 000 equally most parsimonious trees obtained from a maximum parsimony analysis of the LSU sequence alignment. The scale bar shows 10 changes, and posterior probability values from a Bayesian analysis (PP) and parsimony bootstrap support (PBS) values from 1 000 replicates are shown at the nodes (PP/PBS). Thickened lines represent those branches also present in the strict consensus tree and families are indicated with coloured square blocks and the clades with ant isolates with coloured blocks with rounded corners. The lengths of some branches were halved to facilitate easier layout. The tree was rooted to *Toxicocladosporium rubrigenum*.



Source: Dr. JZ Groenewald

Figure 2 – One of 59 equally most parsimonious trees obtained from a maximum parsimony analysis of the combined ITS, *cmdA*, *tub2* and *tef1* sequence alignment. The scale bar shows 100 changes, and bootstrap support values from 1 000 replicates are shown at the nodes. Thickened lines represent those branches also present in the strict consensus tree and species are indicated with coloured square blocks with rounded corners and the genera with coloured blocks. The tree was rooted to *Parapenidiella pseudotasmaniensis* strain CBS 124991 (GenBank accession numbers KF901522, KF902589, KF902855, KF903152, respectively).



Source: Dr. JZ Groenewald

4.4.2 Taxonomy

Penidiellomyces Crous, Attili-Angelis, Duarte, Pagnocca & J.Z. Groenew., *gen. nov* – MycoBank MB817411

Etymology. Named after its morphological similarity to the genus *Penidiella*.

Type species. *Penidiellomyces aggregatus* (Crous) Crous & Duarte

Hyphomycetous. *Mycelium* consisting of branched, septate, smooth, pale brown hyphae. *Conidiophores* solitary, arising from superficial mycelium, erect, brown, smooth, septate, straight to irregularly geniculate-sinuous. *Conidiogenous cells* terminal, subcylindrical, unbranched, medium brown, smooth, tapering to a flattened or rounded apical region, scars unthickened, aggregated, somewhat darkened, not refactive. *Ramoconidia* 0–1-septate, medium brown, smooth, ellipsoidal to obclavate, obovoid or subcylindrical, with 1–3-apical hila. *Intermediate and terminal conidia* subcylindrical to ellipsoid, 0–1-septate, brown, in chains of up to 6; hila truncate, unthickened, somewhat darkened.

Notes – *Penidiellomyces* resembles *Penidiella* in having solitary conidiophores with an apical apparatus that can appear penicillate, giving rise to branched chains of conidia. It differs, however, by having a terminal conidiogenous cell with a more well-developed apical rachis that gives rise to ramoconidia. The recent introduction of several penidiella-like genera in this complex (QUAEDVLIEG et al., 2014), however, will make it difficult to identify species of *Penidiellomyces* without the aid of molecular data. Ecologically, both known species share a foliicolous habitat on plants known from South Africa (CROUS et al., 2007; CROUS; GROENEWALD, 2011; CROUS et al., 2012), and are presumed to be saprobic.

Penidiellomyces aggregatus (Crous) Crous & Duarte, *comb. nov.* – MycoBank MB817412

Basionym. *Penidiella aggregata* Crous, Persoonia 26: 78. 2011.

Description and illustration – see Crous & Groenewald (2011).

Penidiellomyces drakensbergensis (Crous) Crous & Attili-Angelis, *comb. nov. nov.*– MycoBank MB817413

Basionym. *Penidiella drakensbergensis* Crous, Persoonia 29: 161. 2012.

Description and illustration – see Crous et al. (2012).

Penidiellopsis Sandoval-Denis et al., Persoonia 36: 316-458. 2016.

Type species. Penidiellopsis radicularis Sandoval-Denis et al.

Conidiophores differentiated, solitary, erect, straight to geniculate-sinuous, rarely branched, pale to medium brown, smooth- and thick-walled. *Conidiogenous cells* integrated, terminal or intercalary, pale to medium brown, smooth, mono- and polyblastic, giving rise to one or more sets of ramoconidia, scars truncate, slightly darkened, unthickened and not refractive. *Ramoconidia* 0–1-septate, obovoid, ellipsoid or slightly clavate, pale to medium brown, smooth- and thick-walled, apical part with denticle-like loci, basal scar flattened, slightly darkened, unthickened and not refractive. *Conidia* in branched acropetal chains, 0-septate, obovoid, ellipsoid or limoniform, pale to medium brown, smooth, thick-walled, with conidial scars truncate or protuberant, somewhat darkened, unthickened and not refractive. Sexual morph unknown.

Notes – *Penidiellopsis* was introduced as a new genus to accommodate an isolate from a human nail, collected in South Carolina, USA (Crous et al. 2016). Phylogenetically it is closely related to *Penidiellomyces aggregatus* and *P. drakensbergensis*. Conidiophores in *Penidiella* are penicillate with well-developed apical branches, characteristics that were absent in *Penidiellopsis*. Morphological data are only known from slow-growing colonies in artificial media.

Penidiellopsis radicularis Sandoval-Denis et al., Persoonia 36: 316-458. 2016; Fig. 3

Specimen examined. BRAZIL, São Paulo (GPS location: 22°50.6”S; 48°26.1”W; elevation 798 m), isolated from the integument of *Atta capiguara* gyne, Nov. 2009, *F. C. Pagnocca* (culture ex-type CBMAI 1938).

Isolated from gynes and drones of *Atta capiguara* (Myrmicinae, Attini tribe). *Mycelium* consisting of septate, smooth-walled, pale brown, 1.5–3 µm wide hyphae. *Conidiophores* erect, solitary, from superficial mycelium, branched or not, 25–53 × 3.5–4 µm. *Conidiogenous cells* mostly elongate, aseptate, smooth-walled, 10.5–13 × 3.5–4 µm. *Conidia* catenate in branched chains, 0–1-septate, smooth, lemon-shaped with prominent hila, not thickened, slightly darkened, 4.5–6.5 × 3–4 µm. *Chlamydospores* terminal and intercalary. Hila present but neither thickened nor darkened.

Culture characteristics – Colonies were grown at 25 °C for 21 d. On CMA, colonies flat with velutinous central portion, dark olivaceous to black, lobed margin, reaching 10 mm diam. Colonies on MA greyish green with darker mycelium in the centre and margin, crenate surface, reaching 11.5 mm diam. On PDA, dark olivaceous folded colonies, with a raised, velutinous central portion, reaching 11 mm diam. Colonies sporulating on all media, with dark mycelium and olivaceous black in reverse on all three media.

Notes – Similar to *P. ramosus* although colonies are smaller. *Penidiellopsis radicularis* (originally isolated and described from an infection of a human nail) was found on gynes and drones, while *P. ramosus* only occurs on gynes of *Atta capiguara.*

Penidiellopsis ramosus Attili-Angelis & Duarte, *sp. nov.* – MycoBank MB817886; Fig. 4

Etymology. Name refers to its apically branched conidiophores.

Specimens examined. BRAZIL, São Paulo (GPS location: 22°50.6”S; 48°26.1”W; elevation 798 m), isolated from the integument of *Atta capiguara* gyne, Nov. 2009, *F.C. Pagnocca* (culture ex-type CBMAI 1937).

Isolated from gynes of *Atta capiguara* (Myrmicinae, Attini tribe). *Mycelium* consisting of septate, smooth-walled, pale olivaceous-brown, 2–3.5 µm wide hyphae. *Conidiophores* ascending to erect, apically branched, bearing conidia in short chains, irregularly geniculate-sinuous, 27–63.5 × 3–4 µm. *Conidiogenous cells* aseptate, smooth-walled, 7–17 × 3–4 µm; scars not thickened, slightly darkened. *Conidia* catenate in branched chains, aseptate, smooth, limoniform to fusiform, 4–7.5 × 3–4 µm. *Chlamydospores* not observed. Hila present but neither thickened nor darkened.

Culture characteristics – Colonies were grown at 25 °C for 21 d. On CMA, colonies flat with velutinous central portion, dark olivaceous to black, reaching 13 mm diam. Colonies on MA greyish green with darker mycelium in the centre and margin, sulcate surface, reaching 14 mm diam. On PDA, dark olivaceous folded colonies, raised with an entire edge, velutinous central portion, reaching 12 mm diam. Colonies sporulating on all media, with dark mycelium and olivaceous black in reverse on all three media.

Notes – Similar to *Penidiellopsis radicularis*, but chlamydospores were not observed. Although conidia are similar in shape and size, those of *A. ramosus* are aseptate.

Simplicidiella Crous, Attili-Angelis, Duarte, Pagnocca & J.Z. Groenew., *gen. nov.* – MycoBank MB817414

Etymology. Named after the presence of simple and poorly differentiated conidiophores (Simplici-, *Latin* = simple).

Type species. *Simplicidiella nigra* Duarte & Attili-Angelis.

Hyphomycetous. *Mycelium* consisting of septate, smooth-walled, pale brown hyphae. *Conidiophores* erect, solitary, poorly branched or unbranched. *Conidiogenous cells* elongate, aseptate, smooth-walled; scars not thickened, slightly darkened. *Conidia* catenate, in branched chains, 0–1-septate, smooth, ellipsoidal to broadly ellipsoidal with prominent hila. *Sexual morph* unknown.

Notes – The genus *Simplicidiella* is described to accommodate ant-associated melanised fungi in Brazil, with simple and poorly differentiated reproductive structures. Its few phenotypic characteristics underlies the need of molecular tools for identification. The genus is here presumed to be saprobic. *Simplicidiella* is distinct from *Penidiella* and other penidiella-like genera for not sharing the following characteristics: penicillate conidiophores with branches (as in *Penidiella* s.str and *Queenslandipenidiella*); being described as foliicolous (as in *Neopenidiella* and *Myrtapenidiella*); associated with opportunistic human infections with dimorphic conidiophores (as reported for *Eupenidiella*); production of ramoconidia (as in *Apenidiella*), and mycelium strongly branched (as observed in *Xenopenidiella*).

Simplicidiella nigra Duarte & Attili-Angelis, *sp. nov.* – MycoBank MB817415; Fig. 5

Etymology. Name refers to very dark colonies on CMA.

Specimen examined. BRAZIL, São Paulo (GPS location: 22°50.6”S; 48°26.1”W; elevation 798 m), isolated from the integument of *Atta capiguara* gyne, Nov. 2009, *F. C. Pagnocca* (culture ex-type CBMAI 1939).

Isolated from gyne of *Atta capiguara* (Myrmicinae, Attini tribe). *Mycelium* consisting of septate, smooth-walled, pale brown, 1.5–3 µm wide hyphae. *Conidiophores* erect, solitary, poorly branched or unbranched, 27–47 × 3–3.5 µm. *Conidiogenous cells* elongate, aseptate, smooth-walled, 8–18.5 × 3–4 µm; scars not thickened, slightly darkened. *Conidia* catenate in branched chains, 0–1-septate, smooth, ellipsoidal to broadly ellipsoidal with prominent hila, 5.5–9 × 3–4 µm. *Chlamydospores* not observed.

Culture characteristics – Colonies were grown at 25 °C for 21 d. On CMA, colonies flat with velutinous central portion, colony margin dark olivaceous to black, reaching 14 mm diam. Colonies on MA flat with raised velutinous central portion, intermediate section with olivaceous green mycelium, and darker margins, reaching 11 mm diam. Exudate produced. On PDA, colonies with raised greyish central portion producing exudate, black mycelium and darker margins, reaching 11 mm diam. Sporulation and olivaceous black reverse were present in all media.

Note – Due to few phenotypic characteristics available, identification of *S. nigra* requires molecular data. This species is presumed to be saprobic and a potential hydrocarbon-degrader, based on the selective method used for isolation and due to the known presence of a complex mixture of hydrocarbons on the cuticle of insects (HOWARD; BLOMQUIST, 2005). The species is described based on a single isolate, although its phylogenetic placement was supported by all loci and analyses.

Xenopenidiella Quaedvl. & Crous, Persoonia 33: 33. 2014.

Type species. *Xenopenidiella rigidophora* (Crous et al.) Quaedvl. & Crous.

Xenopenidiella clavata Attili-Angelis, Duarte & Pagnocca, *sp. nov.* – MycoBank MB817416; Fig. 6

Etymology. Named after its clavate conidia.

Specimen examined. BRAZIL, São Paulo (GPS location: 22°50.6”S; 48°26.1”W; elevation 798 m), isolated from the integument of *Atta capiguara* drone, Nov. 2013, *F. C. Pagnocca* (culture ex-type CBMAI 1942).

Isolated from drone of *Atta capiguara* (Myrmicinae, Attini tribe). *Mycelium* consisting of septate, smooth-walled, pale brown, 3–4 µm wide hyphae. *Conidiophores* mostly reduced to conidiogenous cells arising directly from hyphae, rarely 1–5-septate, brown, smooth-walled, straight to geniculate-sinuous, 11–34 × 3.5–4.5 µm. *Conidiogenous cells* intercalary or terminal, brown, smooth-walled, 11–12 × 3.5–4 µm, with several aggregated terminal scars, not thickened nor darkened. *Conidia* 2–3-celled, smooth-walled to finely verrucose, clavate, apex obtuse, base truncate, constricted at both septa, 8–15.5 × 3–4 µm; hila not thickened, slightly darkened. *Chlamydospores* not observed.

Culture characteristics – Colonies were grown at 25 °C for 21 d. Colonies on CMA flat and dark olivaceous to brown, with a velutinous central portion, reaching 10 mm diam. Colonies on MA with a slightly elevated velutinous central portion, greenish mycelium and black

margins, reaching 11 mm diam. On PDA, flat velutinous dark olivaceous to brown colonies, reaching 10 mm diam. Colonies with low to moderate sporulation and olivaceous black in reverse on all media.

Notes – *Xenopenidiella clavata* is ecologically distinct from the *X. rigidophora* (type species) in its association to the leaf-cutting ants, which represents a new niche for the genus. Morphologically, conidiophores of *X. clavata* are not strongly branched, hyphae are not guttulate, and its mycelium is not strongly branched. Dimorphic conidiophores are present in both species, but in *X. clavata* conidiogenous cells are predominantly intercalary and conidia are only finely verrucose.

Xenopenidiella formica Duarte, Attili-Angelis & Baron, *sp. nov.* – MycoBank MB817417; Fig. 7

Etymology. Named after the isolation source (ants).

Specimen examined. BRAZIL, São Paulo (GPS location: 22°50.6”S; 48°26.1”W; elevation 798 m), isolated from the integument of *Atta capiguara* drone, Nov. 2013, *F. C. Pagnocca* (culture ex-type CBMAI 1941).

Isolated from gynes and drones of *Atta capiguara* and *A. laevigata* (Myrmicinae, Attini tribe). *Mycelium* consisting of septate, smooth-walled, pale olivaceous, 2–3 µm wide hyphae, producing poorly differentiated conidiophores. *Conidiophores* erect, solitary, poorly branched or unbranched, smooth, brown, straight to geniculate-sinuous, 28.5–75 × 2–3.5 µm. *Conidiogenous cells* smooth-walled, bearing conidia from flat to semi-denticulate scars, 13–17 × 3.5–4 µm. *Conidia* 1-septate, smooth-walled, clavate, apex obtuse, base truncate, constricted at septum, 7–12 × 2.5–4 µm. *Chlamydospores* not observed.

Culture characteristics – Colonies were grown at 25 °C for 21 d. Colonies on CMA were dark olivaceous and flat, velutinous, reaching 12 mm diam. On MA, flat colonies with velutinous central portion, greenish mycelium and darker margins, reaching 12.5 mm diam. On PDA,

velutinous colonies with raised olivaceous green central portion, reaching 11 mm diam. Low sporulation and olivaceous black in reverse on all media.

Notes – Phylogenetically, *X. formica* is closely related to *X. tarda*, but with a faster growth rate in culture, and smaller conidia. It is represented by five isolates from gynes and drones of *A. capiguara* and *A. laevigata,* while *X. tarda* was found only associated with *A. capiguara.* In contrast to *X. rigidophora*, *X. formica* does not exhibit strongly branched hyphae, and its conidia are not verrucose.

Xenopenidiella inflata Duarte, Baron, Pagnocca & Attili-Angelis, *sp. nov.* – MycoBank MB817418; Fig. 8

Etymology. Named after its swollen conidiogenous cells (Inflatus, *Latin* = swollen).

Specimen examined. BRAZIL, São Paulo (GPS location: 22°50.6”S; 48°26.1”W; elevation 798 m), isolated from the integument of *Atta laevigata* drone, Nov. 2011, *F. C. Pagnocca* (culture ex-type CBMAI 1945).

Isolated from drone of *A. laevigata* (Myrmicinae, Attini tribe). *Mycelium* consisting of septate, smooth, pale brown, 1.5–3 µm wide hyphae. *Conidiophores* reduced to conidiogenous cells, or subcylindrical, smooth, brown, up to 3-septate, straight to geniculous-flexuous, 16–52 × 4–5 µm. *Conidiogenous cells* swollen or elongated, arising from mycelium or terminal on conidiophores, sometimes rejuvenating and elongating to have lateral and terminal conidiogenous cells, smooth-walled, 9–14 × 3.5–4.5 µm; scars not thickened nor darkened. *Conidia* 1-septate, smooth-walled, clavate, constricted at septum, truncate hila, 7.5–10 × 3–4 µm. *Chlamydospores* not observed.

Culture characteristics – Colonies were grown at 25 °C for 21 d. On CMA, colonies with black velutinous mycelium and pronounced central portion, reaching 12.5 mm diam. Colonies on MA greyish green, velutinous and sulcate, black margins, reaching 12 mm diam. On PDA colonies were greenish and raised at the centre, olivaceous green towards the sulcate and

darker margin, reaching 12.5 mm diam. Low to moderate sporulation and olivaceous black reverse on all media.

Notes – *Xenopenidiella inflata* is described based on a single isolate from *A. laevigata* drone. Although phylogenetically closely related to *X. laevigata*, it differs based on its swollen conidiogenous cells and slower growth rate on cultural media. *Xenopenidiella inflata* differs from the *X. rigidophora* in the following morphological aspects: pale brown mycelium present (not pale olivaceous to medium brown); thinner hyphae (1.5–3 µm wide, not up to 6 µm diam); conidiogenous cells terminal and intercalary; conidia not verrucose (not appearing like small spines under light microscope); thicker hila.

Xenopenidiella laevigata Baron, Duarte, Pagnocca & Attili-Angelis, *sp. nov.* – MycoBank MB817419; Fig. 9

Etymology. Name refers to the first isolation source: the ant species *Atta laevigata.*

Specimen examined. BRAZIL, São Paulo (GPS location: 22°50.6”S; 48°26.1”W; elevation 798 m), isolated from the integument of *Atta laevigata* gyne, Nov. 2011, *F. C. Pagnocca* (culture ex-type CBMAI 1944).

Isolated from gyne of *A. laevigata* (Myrmicinae, Attini tribe). *Mycelium* consisting of septate, olivaceous-brown, smooth and thick-walled, 3–3.5 µm wide hyphae. *Conidiophores* brown, smooth to finely verrucose, thick-walled erect, straight to geniculous-sinuous, 1–10-septate, 10–64 × 2–4.5 µm. *Conidiogenous cells* in loose branches, smooth-walled to finely verrucose, terminal or lateral, 10.5–14 × 2.5–3.5 µm; scars unthickened and not darkened. *Conidia* 1-septate, smooth-walled to finely verrucose, clavate, constricted at somewhat darker septum, 9.5–17.5 × 3–5 µm; hila unthickened and not darkened. *Chlamydospores* not observed.

Culture characteristics – Colonies were grown at 25 °C for 21 d. On CMA, colonies with black velutinous mycelium and aerial central portion, reaching 18 mm diam. Colonies on MA greyish green, velutinous and sulcate, black margins, reaching 19 mm diam. On PDA colonies were dark olivaceous, sulcate and folded, with raised central portion and velutinous

mycelium, reaching 18 mm diam. Poor sporulation and olivaceous black reverse on all three media.

Notes – In this study both species *X. laevigata* and *X. inflata* are known from single strains isolated from *A. laevigata* via the oil flotation method. The parsimony tree shows that they are closely related, but the former differs in the melanisation of the mycelium (colonies are darker and hyphae are thicker), growth rate and conidial size. A comparison with *X. rigidophora* shows differences such as less-branched and thinner hyphae, rare macronematous conidiophores that are loosely penicillate, and conidiogenous cells frequently intercalary.

Xenopenidiella nigrescens Attili-Angelis, Duarte & Pagnocca, *sp. nov.* – MycoBank MB817420; Fig. 10

Etymology. Named after its dark brown mycelium.

Specimen examined. BRAZIL, São Paulo (GPS location: 22°50.6”S; 48°26.1”W; elevation 798 m), isolated from the integument of *Atta capiguara* drone, Nov. 2013, *F. C. Pagnocca* (culture ex-type CBMAI 1943).

Isolated from drone of *Atta capiguara* (Myrmicinae, Attini tribe). *Mycelium* consisting of septate, olivaceous-brown, smooth and thick-walled 3–4 µm wide hyphae. Conidiophores brown, smooth to finely verrucose, thick-walled, erect, straight to flexuous, 0–6-septate, 7–79 × 3.5–4.5 µm. *Conidiogenous cells* arising from mycelium, loosely branched, smooth-walled to verrucose, terminal and lateral, 13–18 × 3–3.5 µm. *Conidia* 1-septate, smooth-walled to finely verrucose, clavate, constricted at the septum, 9–13 × 3.5–4 µm; hila unthickened and not darkened. *Chlamydospores* not observed.

Culture characteristics – Colonies were grown at 25 °C for 21 d. Colonies on CMA were flat and dark olivaceous to brown, velutinous with raised central portion, irregular margins, reaching 14 mm diam. Colonies on MA with velutinous and slightly folded surface, raised central portion, olivaceous mycelium, reaching 13 mm diam. On PDA, dark olivaceous highly

folded colonies, raised velutinous central portion, reaching 13 mm diam. Colonies presented low to moderate sporulation and olivaceous black reverse on all media.

Notes – *Xenopenidiella nigrescens* was found to consistently have the darkest colonies on all three media tested when compared to other *Xenopenidiella* species. A combination of previously mentioned characteristics is also found in this species: slow growth rate (as in *X. tarda*), clavate conidia (as in *X. clavata*), 1-septate, smooth-walled to finely verrucose conidia (resembling *X. laevigata*), conidiophores poorly differentiated (as in *X. formica*). In comparison to *X. rigidophora*, *X. nigrescens* differs in having darker mycelium, conidiogenous cells smooth to verrucose, and conidia rarely occurring in branched chains. Molecular data are necessary to confirm its identification.

Xenopenidiella tarda Pagnocca, Duarte & Attili-Angelis, *sp. nov.* – MycoBank MB817421; Fig. 11

Etymology. Named due to very slow growth rate (Tardus, *Latin* = slow).

Specimen examined. BRAZIL, São Paulo (GPS location: 22°50.6”S; 48°26.1”W; elevation 798 m), isolated from the integument of *Atta capiguara* drone, Nov. 2013, *F. C. Pagnocca* (culture ex-type CBMAI 1940).

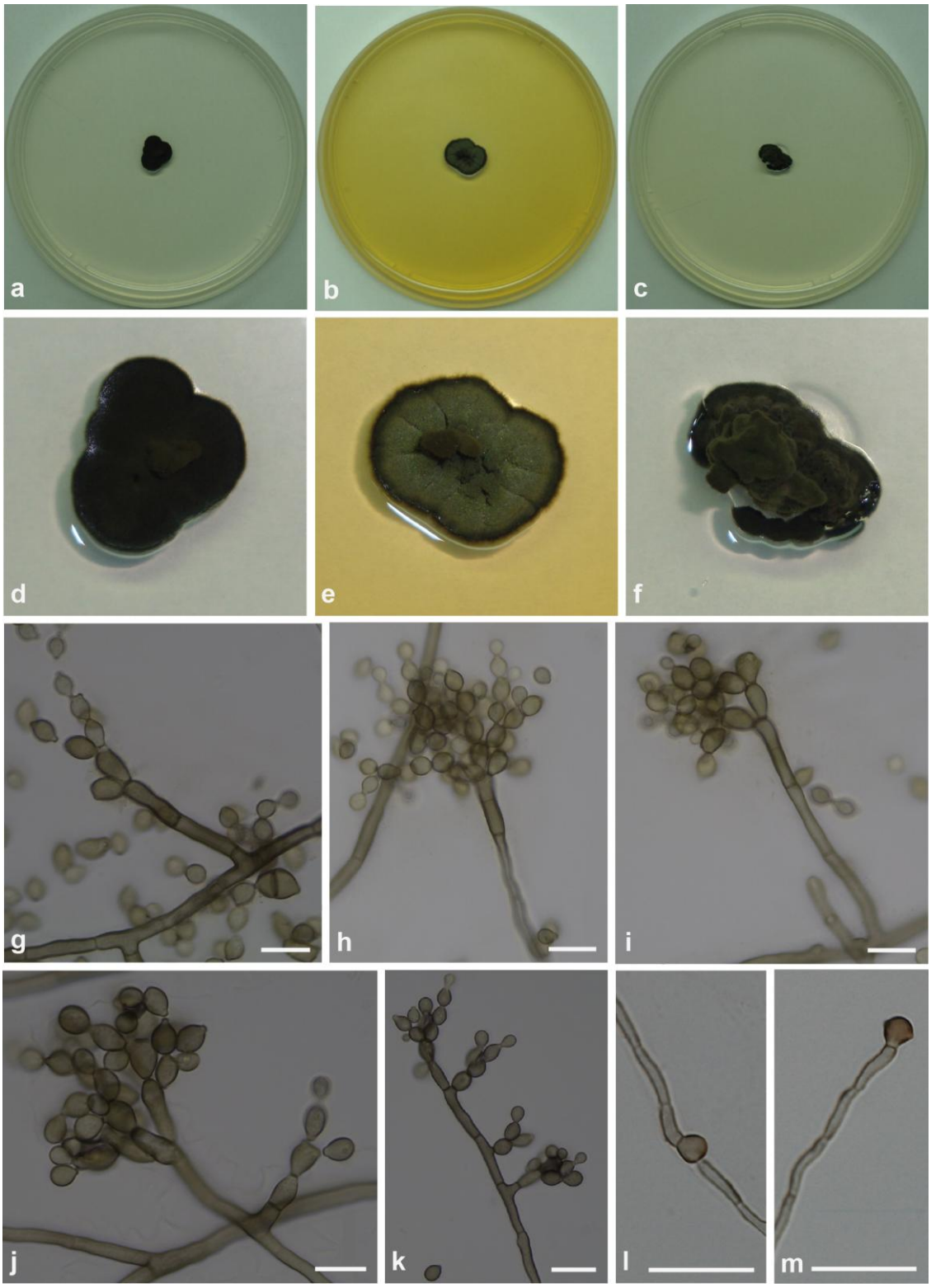
Isolated from drones of *Atta capiguara* (Myrmicinae, Attini tribe). *Mycelium* consisting of septate, smooth-walled, pale brown, 2–3 µm wide hyphae. *Conidiophores* ascending to erect, solitary, poorly branched or unbranched, 0–4-septate, 5.5–51 × 3–4 µm. *Conidiogenous cells* elongate, aseptate, smooth-walled, 5.5–21.5 × 3–3.5 µm; scars unthickened and not darkened. *Conidia* 2–3-celled, smooth-walled to finely verrucose, clavate, constricted at septum, 8–11.5 × 3–5 µm; hila truncate, unthickened and not darkened. *Chlamydospores* not observed.

Culture characteristics – Colonies were grown at 25 °C for 21 d. On CMA, colonies dark olivaceous, velutinous, flat and small, reaching 9 mm diam. Colonies on MA flat with aerial velutinous central portion, olivaceous green mycelium and black margin, reaching 9 mm diam. On PDA colonies with raised greyish-green central portion, and black margins,

reaching 9 mm diam. Moderate sporulation and olivaceous black reverse present on all three media.

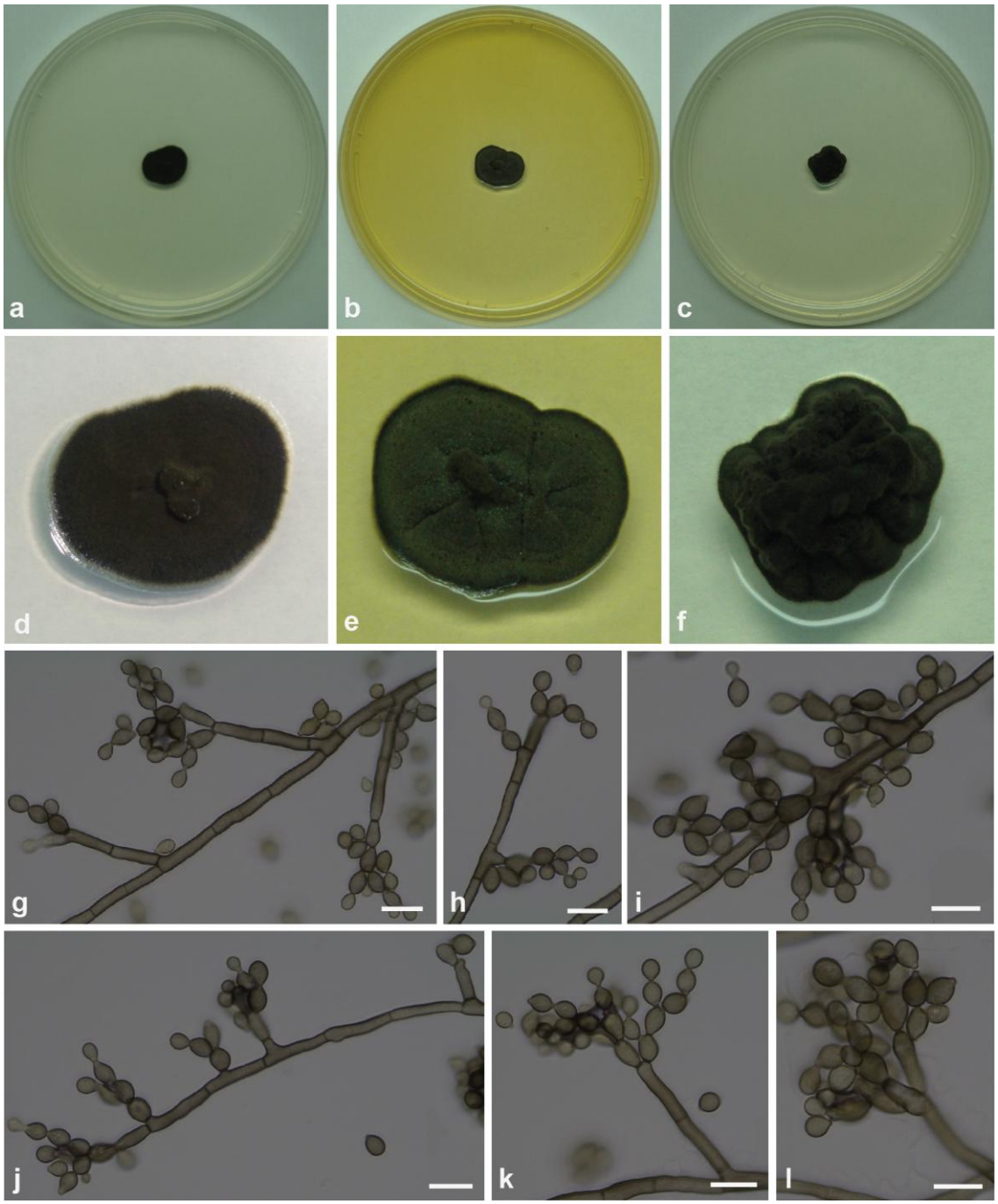
Notes – *Xenopenidiella tarda* is represented by two isolates from drones of *A. capiguara*. It is morphologically similar to *X. formica*, although colonies have a slower growth rate in culture. This species can be distinguished from *X. rigidophora* because mycelium of *X. tarda* does not show to be strongly branched, not necessarily constricted at septa and hyphae are not so wide. Furthermore, conidiogenous cells are less wide and pale brown; conidia mostly smooth-walled or finely verrucose.

Figure 3 – *Penidiellopsis radicularis*. Colonies after 21 d at 25 °C on: a, d. CMA; b, e. MA; c, f. PDA; g–k. conidiophores with conidia in chains; l, m. chlamydospore. — Scale bars = 10 µm.



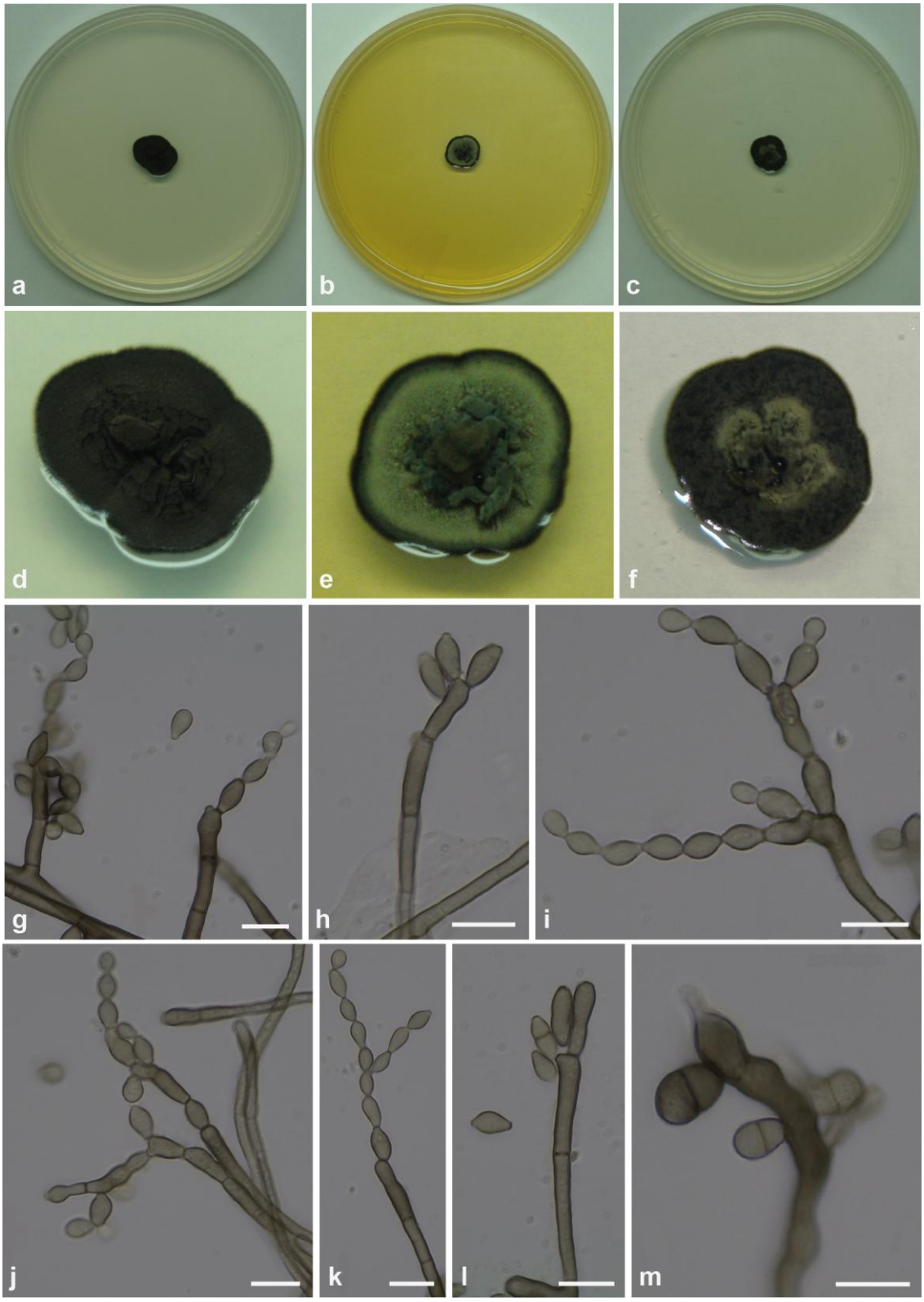
Source: Elaborated by the author.

Figure 4 – *Penidiellopsis ramosus*. Colonies after 21 d at 25 °C on: a, d. CMA; b, e. MA; c, f. PDA; g–l. conidiophores with conidia in chains. — Scale bars = 10 µm.



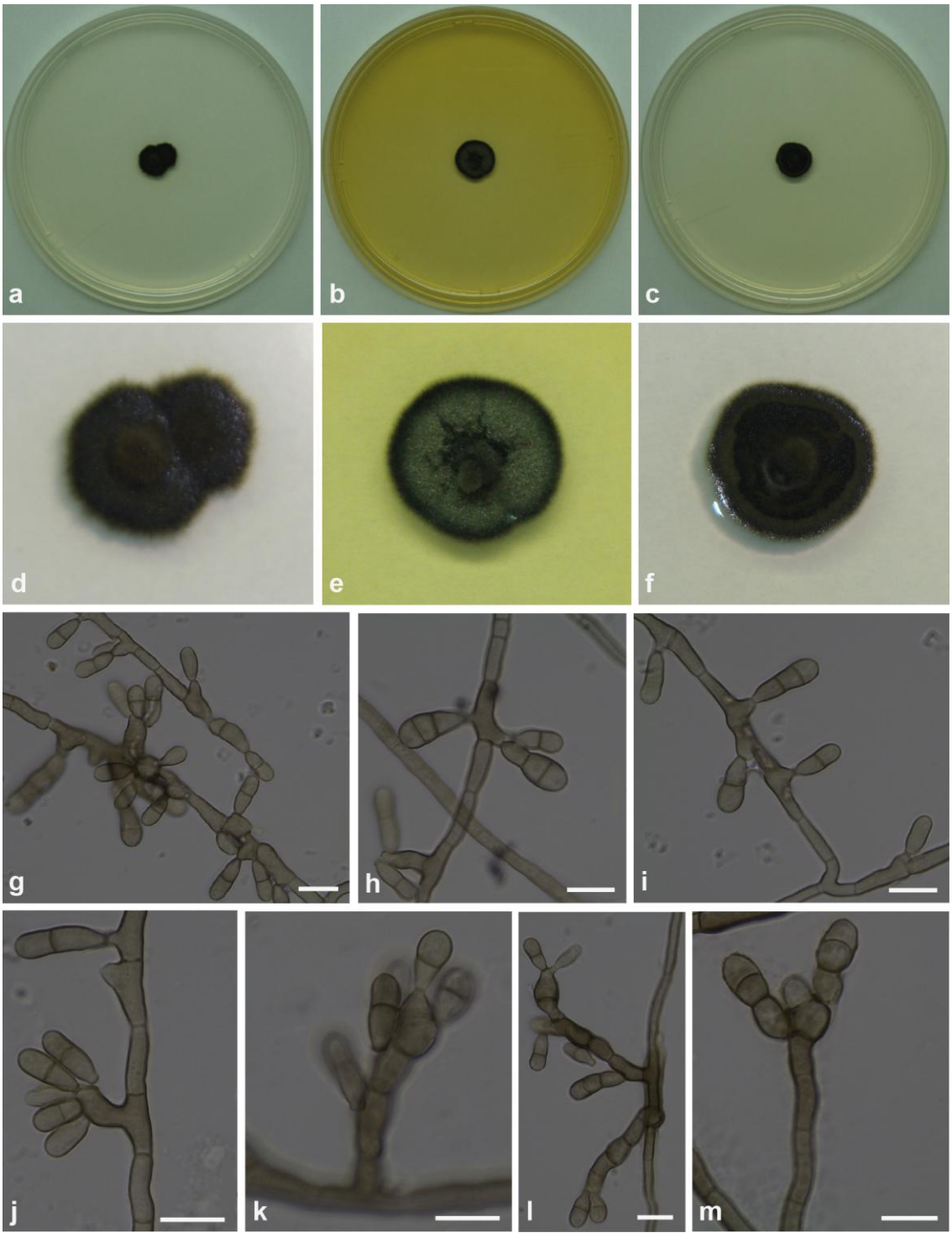
Source: Elaborated by the author.

Figure 5 – *Simplicidiella nigra*. Colonies after 21 d at 25 °C on: a, d. CMA; b, e. MA; c, f. PDA; g–k. conidiophores with conidia in chains; l, m. conidiogenous cells. — Scale bars = 10 µm.



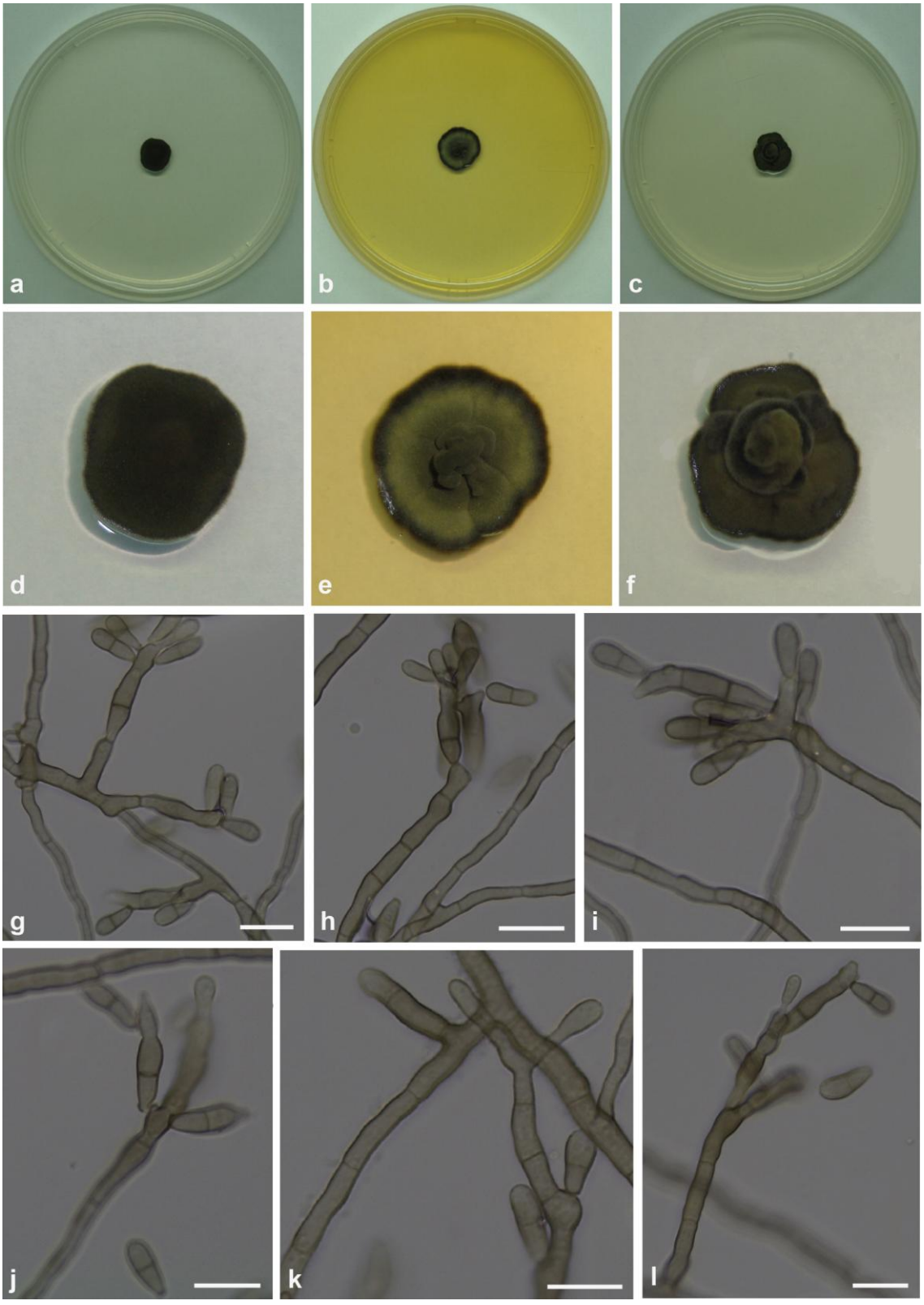
Source: Elaborated by the author.

Figure 6 – *Xenopenidiella clavata*. Colonies after 21 d at 25 °C on: a, d. CMA; b, e. MA; c, f. PDA; g–m. conidiophores with conidia. — Scale bars = 10 µm.



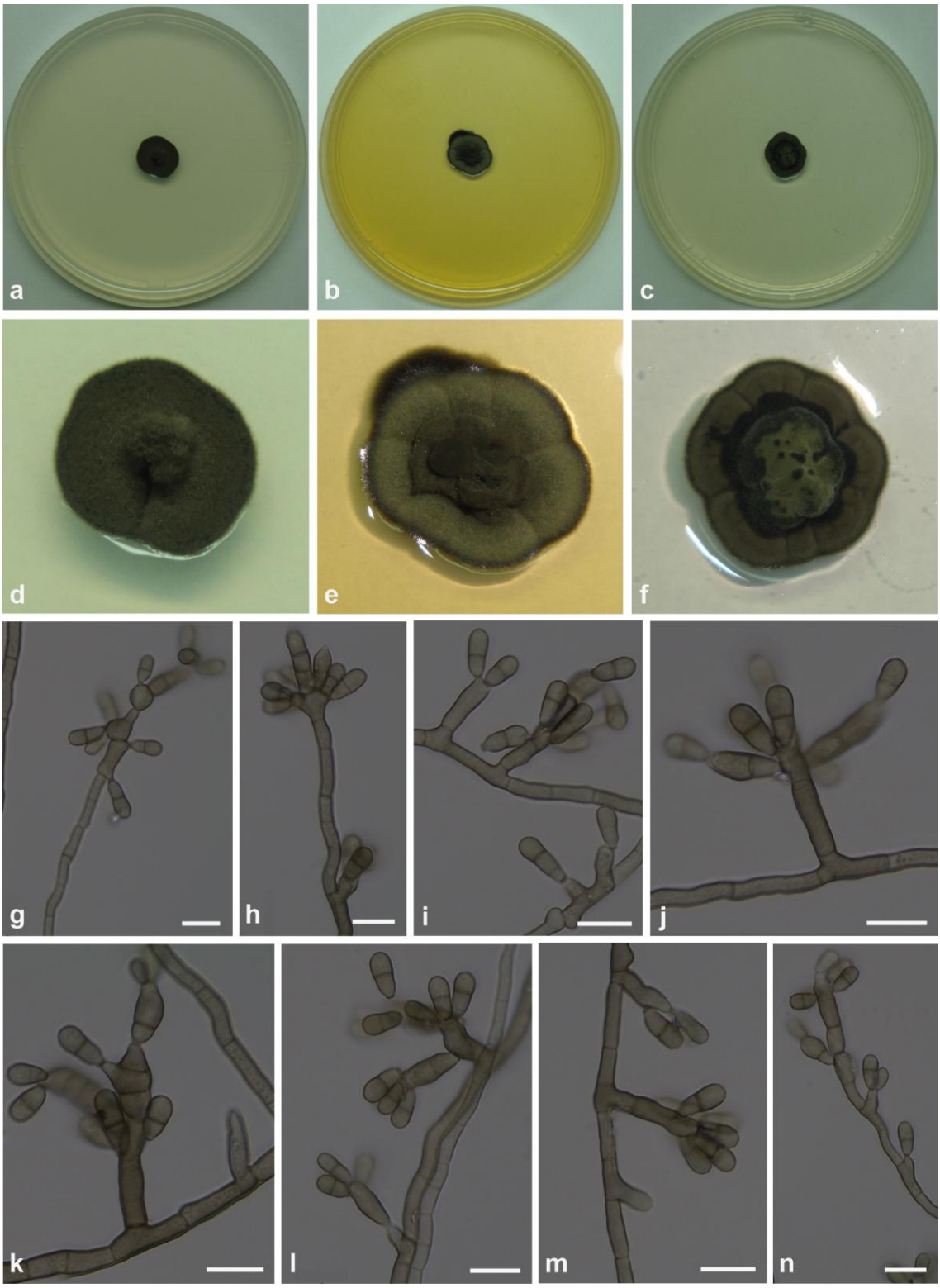
Source: Elaborated by the author.

Figure 7 – *Xenopenidiella formica*. Colonies after 21 d at 25 °C on: a, d. CMA; b, e. MA; c, f. PDA; g–l. conidiophores with conidia. — Scale bars = 10 µm.



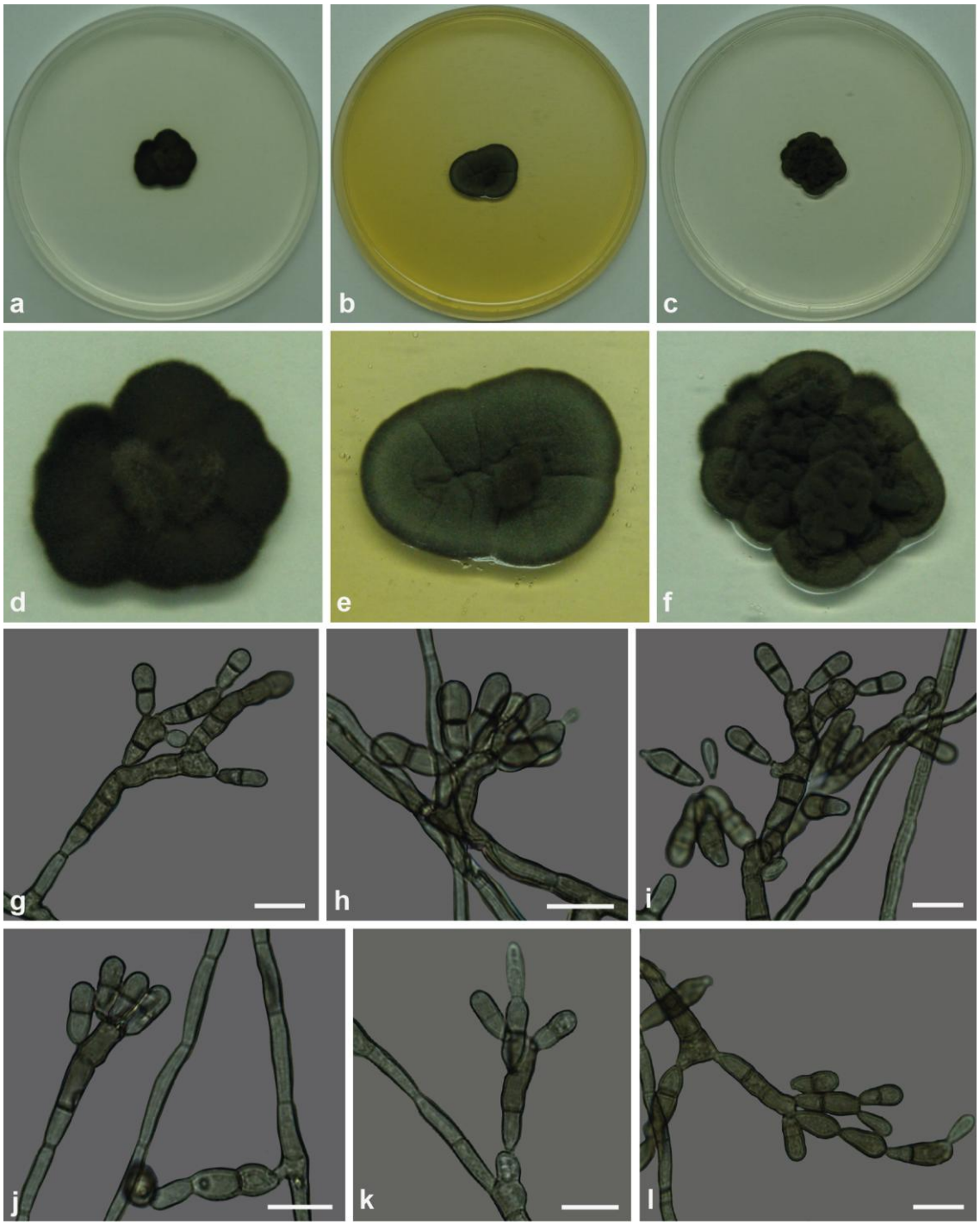
Source: Elaborated by the author.

Figure 8 – *Xenopenidiella inflata*. Colonies after 21 d at 25 °C on: a, d. CMA; b, e. MA; c, f. PDA; g–n. conidiophores with conidia. — Scale bars = 10 µm.



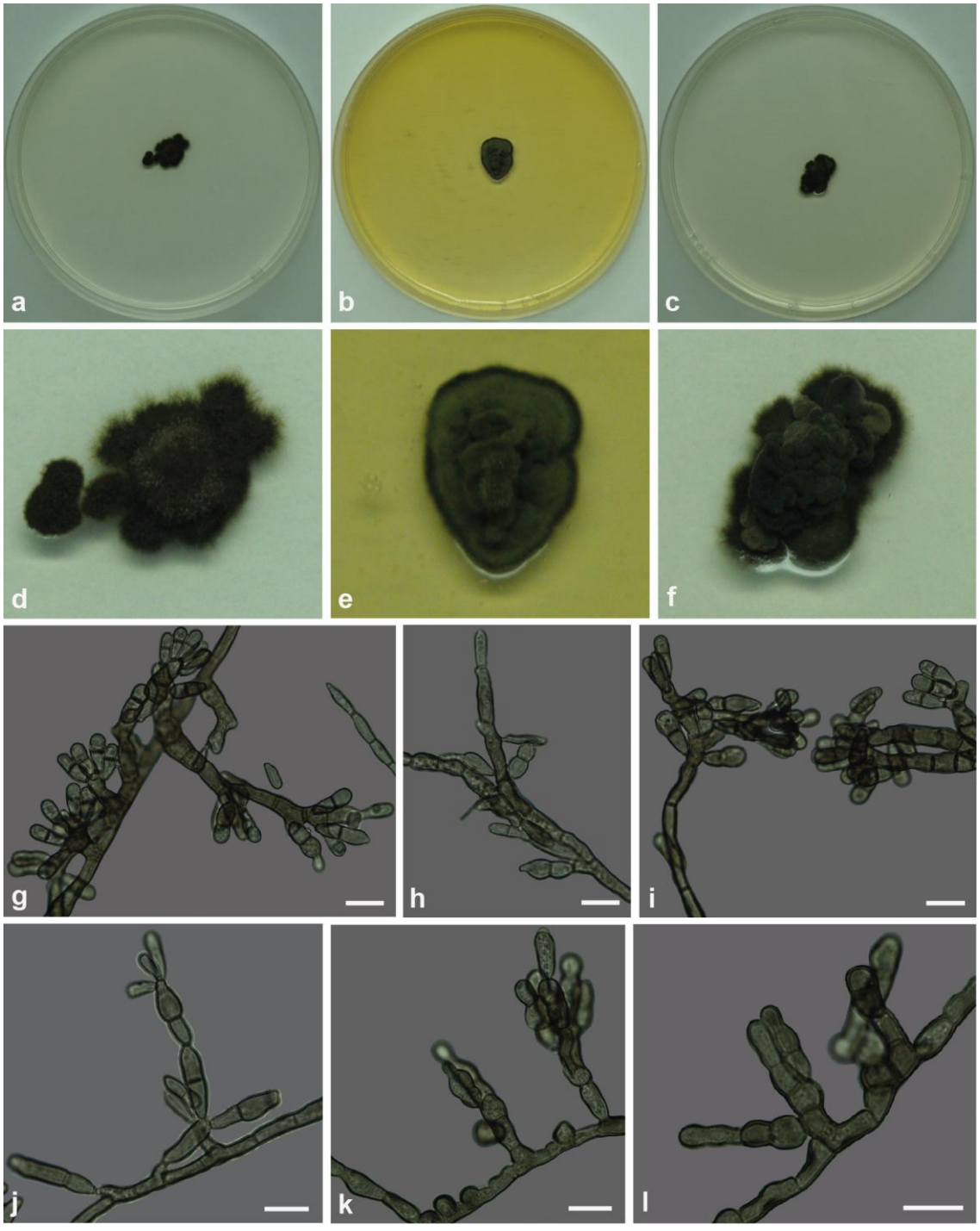
Source: Elaborated by the author.

Figure 9 – *Xenopenidiella laevigata*. Colonies after 21 d at 25 °C on: a, d. CMA; b, e. MA; c, f. PDA; g–l. conidiophores with conidia. — Scale bars = 10 µm.



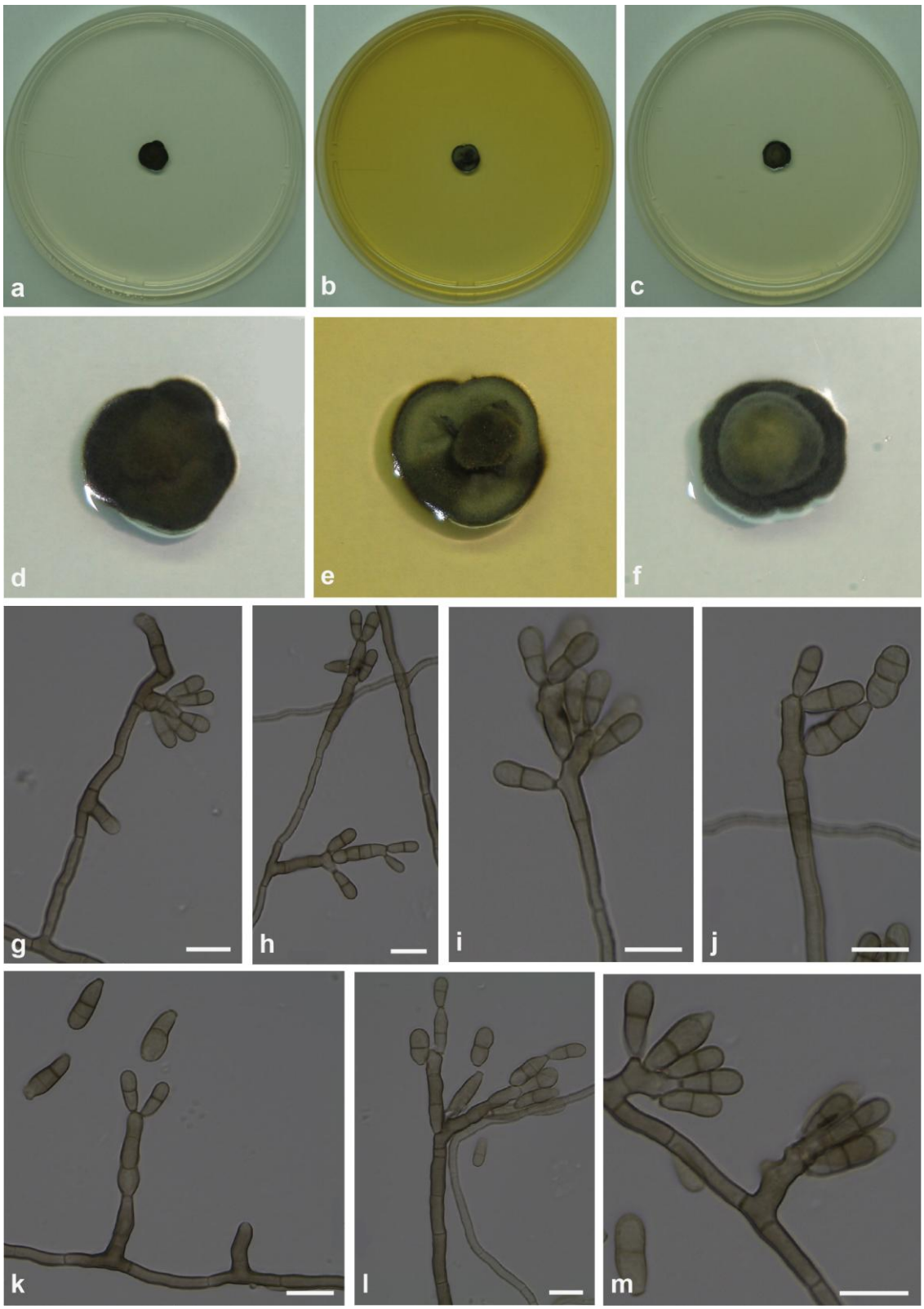
Source: Elaborated by the author.

Figure 10 – *Xenopenidiella nigrescens*. Colonies after 21 d at 25 °C on: a, d. CMA; b, e. MA; c, f. PDA; g–l. conidiophores with conidia. — Scale bars = 10 µm.



Source: Elaborated by the author.

Figure 11 – *Xenopenidiella tarda*. Colonies after 21 d at 25 °C on: a, d. CMA; b, e. MA; c, f. PDA; g–m. conidiophores with conidia. — Scale bars = 10 µm.



Source: Elaborated by the author.

4.5 Discussion

Leaf-cutting ants from the Attini tribe are social insects limited to the New World, widely distributed from Argentina to Southern USA, with a range from latitude from 10 °N to 25 °S (MAYHÉ-NUNES; JAFFÉ, 1998). These ants have been investigated for the huge economic losses they are able to cause by damage to plant leaves, and for their unique ability for fungiculture, which has become a model system for coevolutionary studies (CHAPELA et al., 1994; CURRIE et al., 2003).

These insects have shown to harbour a large and unknown diversity of microorganisms (PAGNOCCA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2008, 2011; GUEDES et al., 2012; DUARTE et al., 2014), and some novel species of filamentous fungi and yeasts were already described (MIDDELHOVEN et al., 2003; CARREIRO et al., 2004; PAGNOCCA et al., 2010; AUGUSTIN et al., 2013; ATTILI-ANGELIS et al., 2014; MELO et al., 2014; MASIULIONIS et al., 2015; MEIRELLES et al., 2015; SAMERPITAK et al., 2014, 2015; MONTOYA et al., 2016). However, the occurrence of new melanised fungal species in the ants' environment has been poorly documented.

The fungal family Teratosphaeriaceae was recently established based on molecular phylogenetic analysis, which strongly supported its separation from Mycosphaerellaceae. *Teratosphaeria* and relatives were initially associated to leaf disease of *Eucalyptus*, but they vary from saprobic, human opportunistic, plant pathogen and extremophilic species (CROUS et al., 2007; RUIBAL et al., 2009; TEODORO et al., 2012; EGIDI et al., 2014; QUAEDVLIEG et al., 2014). Investigators in Brazil have isolated plant pathogenic fungi (GUEDES et al., 2012) and opportunistic melanised representatives (DUARTE et al., 2014) from workers of *Atta laevigata* and gynes of *Atta* spp., respectively, which belong to this family of fungi.

One undescribed genus and eight new species of Teratosphaeriaceae were isolated when investigating the diversity of Attini-associated fungi from gynes and drones before the nuptial flight. The aim of these investigations was to further explore and better understand the primary microbial community that is dispersed into a young ant colony.

This is therefore the first study to provide a taxonomic treatment of Teratosphaeriaceae from ants, which has significantly expanded the number of *Xenopenidiella* species in addition to the type *X. rigidophora*, thereby allowing for a more robust amended

description of the genus. Previous reports on filamentous fungi from ant niches characterised similar isolates as members of the soil community (PAGNOCCA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2008), which is different from the results found in this study, where the fungi were isolated directly from the insects themselves. It can be hypothesized that the isolation methods used in the other studies may have contributed to this difference.

The lack of knowledge on ant nests encouraged studies with focus on this microenvironment, but even less is known about the ant integument from which the new species were obtained. One interesting ecological aspect of Teratosphaeriaceae is that the family harbours isolates from extreme environments. However, the present scientific information is still insufficient to answer several questions about the studied substrate, for instance, if it should be treated as extreme or not. It is known that the pH of the fungus garden ranges from 4.35 to 5 (POWELL; STRADLING, 1986), but nothing was published about the pH of the integument itself. On the other hand, the presence of cuticular hydrocarbons and alkaloids was already reported (ROUX et al., 2009).

The main lineages in Teratosphaeriaceae remained obscured until the extensive revision published by Quaedvlieg and collaborators (2014). A discussion has been raised over the phylogenetic position of Piedraiaceae, which appeared to cluster with Teratosphaeriaceae (CROUS et al., 2009a). Other reports studying rock-inhabiting fungi (RIF) showed that these are phylogenetically highly diverse, and highlighted the importance of larger taxon samplings to define questions about generic boundaries (RUIBAL et al., 2009, 2011). All these results demonstrate the importance of dedicated projects on fungal isolation from diverse niches.

Although this study still underrepresents the total biodiversity associated with leaf-cutting ants, it does reveal yet another source of Teratosphaeriaceae species. It is known that the morphology of many genera of saprobic and plant pathogenic fungi have evolved several times (CROUS et al., 2009b), which explains how these penidiella-like isolates could adapt to be found associated to such an unexpected environment like gynes and drones of attine ants.

The species phylogeny presented in Fig. 2 is based on four genomic loci (ITS, *cmdA*, *tef1* and *tub2* gene regions). For the species of *Xenopenidiella*, all loci for which data was available could distinguish the included species (data not shown, trees for individual loci in TreeBASE). However, the amplification rate of *tef1* and *cmdA* for this genus was not as high as for ITS and *tub2*. The ex-type culture of *X. formica*, CBMAI 1941, clusters slightly distant to the rest of the isolates of this species; this is due to its ITS sequence which is different from

the other isolates of the species. The phylogenetic placement of the single isolate of *Simplicidiella* was supported by all loci and analyses (Fig. 1, 2). Both species of *Penidiellopsis* are only separated by their *tub2* sequences; all other loci either lack resolution to resolve the species or show an intermixing of isolates from the two species. It is quite possible that with a broader sampling these two species might turn out to be synonymous; however, on *tub2* they are only 92 % identical (394/428 nucleotides) based on fixed nucleotide differences and therefore we maintain them as separate species for now. A broader sampling from wider geographic regions is being planned to determine whether this difference is significant or not. Since all four loci together did not provide 100 % amplification success rate, it is recommended that an ideal identification protocol includes both ITS and *tub2*.

4.6 Concluding remarks

Representatives of Teratosphaeriaceae include species of agricultural importance and wide ecological plasticity with ability to colonise diverse substrates, including ants and extreme environments. Although social insects have proved to accommodate many undescribed fungal species, the numbers are still underestimated to date. Over the last 10–15 yr it was concluded that knowledge on fungal diversity contributes greatly to safeguard global genetic resources, which will have great impact on human lives in future (HAWKSWORTH, 2004; LANGE et al., 2012). The present study contributes to this knowledge, which is a fundamental tool to plan strategies aimed at the protection of species and environments, especially in tropical and subtropical regions. A significant number of fungi are part of the complex interactions in leaf-cutting ant colonies and further studies will be required to determine their roles in this specific niche.

References

ARZANLOU, M.; GROENEWALD, J. Z.; FULLERTON, R. A.; ABELN, E. C.; CARLIER, J.; ZAPATER, M. F.; BUDDENHAGEN, I. W.; VILJOEN, A.; CROUS, P. W. Multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several novel species of *Mycosphaerella* and related anamorphs on banana. **Persoonia**, Utrecht, v.20, p.19–37, 2008.

ATTILI-ANGELIS, D.; DUARTE, A. P. M.; PAGNOCCA, F. C.; NAGAMOTO, N. S.; de VRIES, M.; STIELOW, J. B.; de HOOG, G. S. Novel *Phialophora* species from leaf-cutting ants (tribe Attini). **Fungal Diversity**, Dordrecht, v.65, p.65–75, 2014.

AUGUSTIN, J. O.; GROENEWALD, J. Z.; NASCIMENTO, R. J.; MIZUBUTI, E. S. G.; BARRETO, R. W.; ELLIOT, S. L.; EVANS, H. C. Yet more "weeds" in the garden: Fungal novelties from nests of leaf-cutting ants. **PLoS ONE**, v.8, p.e82265, 2013.

CARBONE, I.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. **Mycologia**, New York, v.91, p.553–556, 1999.

CARNEGIE, A. J.; PEGG, G. S.; WHITE, D.; BURGESS, T. I. Species within Mycosphaerellaceae and Teratosphaeriaceae from eucalypts in eastern Australia. **Australasian Plant Pathology**, Murdoch, v.40, p.366–384, 2011.

CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C.; BACCI, M. Jr.; LACHANCE, M. A.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J.; RUIVO, C. C.; Rosa, C. A. *Sympodiomyces attinorum* sp.nov., a yeast species associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.54, p.1891–1894, 2004.

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, p.1691–1694, 1994.

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

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

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

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

CROUS, P. W.; SHIVAS, R. G.; WINGFIELD, M. J. et al. Fungal Planet description sheets: 128–153. **Persoonia**, Utrecht, v.29, p.146–201, 2012.

CROUS, P. W.; HAWKSWORTH, D. L.; WINGFIELD, M. J. Identifying and Naming Plant-Pathogenic Fungi: Past, Present, and Future. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.53, p.247–267, 2015.

CURRIE, C. R.; BOT, A. N. M.; BOOMSMA, J. J. Experimental evidence of a tripartite mutualism: bacteria protect ant fungus gardens from specialized parasites. **Oikos**, Buenos Aires, v.101, p.91–102, 2003.

DUARTE, A. P. M.; ATTILI-ANGELIS, D.; BARON, N. C.; FORTI, L. C.; PAGNOCCA, F. C. Leaf-cutting ants: an unexpected microenvironment holding human opportunistic black fungi. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.106, p.465–473, 2014.

EGIDI, E.; de HOOG, G. S.; ISOLA, D.; ONOFRI, S.; QUAEDVLIEG, W.; de VRIES, M.; VERKLEY, G. J. M.; STIELOW, J. B.; ZUCCONI, L.; SELBMANN, L. Phylogeny and taxonomy of meristematic rock-inhabiting black fungi in the Dothidemycetes based on multi-locus phylogenies. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v.65, p.127–165, 2014.

GROENEWALD, J. Z.; NAKASHIMA, C.; NISHIKAWA, J.; SHIN, H. -D.; PARK, J. -H.; JAMA, A. N.; GROENEWALD, M.; BRAUN, U.; CROUS, P. W. Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.75, p.115–170, 2013.

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

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

HAWKSWORTH, D. L. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.50, p.9–18, 2004.

HAWKSWORTH, D. L. Global species numbers of fungi: are tropical studies and molecular approaches contributing to a more robust estimate? **Biodiversity and Conservation**, London, v.21, p.2425–2433, 2012.

HOWARD, R. W.; BLOMQUIST, G. J. Ecological, behavioral and biochemical aspects of insect hydrocarbons. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.50, p.371–393, 2005.

HUNTER, G. C.; CROUS, P. W.; CARNEGIE, A. J.; BURGESS, T. I.; WINGFIELD, M. J. *Mycosphaerella* and *Teratosphaeria* diseases of *Eucalyptus*; easily confused and with serious consequences. **Fungal Diversity**, Houten, v.50, p.145–166, 2011.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.30, p.772–780, 2013.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MEINTJES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, Oxford, v.28, p.1647–1649, 2012.

LANGE, L.; BECH, L.; BUSK, P. K.; GRELL, M. N.; HUANG, Y.; LANGE, M.; LINDE, T.; PILGAARD, B.; ROTH, D.; TONG, X. The importance of fungi and of mycology for a global development of the bioeconomy. **IMA Fungus**, Surrey, v.3, p.87–92, 2012.

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

MAYHÉ-NUNES, A. J.; JAFFÉ, K. On the biogeography of Attini (Hymenoptera: Formicidae). **Ecotropicos**, Caracas, v.11, p.45–54, 1998.

MASIULIONIS, V. E.; CABELLO, M. N.; SEIFERT, K. A.; RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F. C. *Escovopsis trichodermoides* sp. nov., isolated from a nest of the lower attine ant *Mycocepurus goeldii*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.107, p.731–740, 2015.

MELO, W. G. P.; ARCURI, S. L.; RODRIGUES, A.; MORAIS, P. B.; MEIRELLES, L. A.; PAGNOCCA, F. C. *Starmerella aceti* f.a., sp. nov., an ascomycetous yeast species isolated from fungus garden of the leafcutter ant *Acromyrmex balzani*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.64, p.1428–1433, 2014.

McLAUGHLIN, D. J.; HIBBETT, D. S.; LUTZONI, F.; SPATAFORA, J. W.; VILGALYS, R. The search for the fungal tree of life. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v.17, p.488–497, 2009.

MEIRELLES, L. A.; MONTOYA, Q. V.; SOLOMON, S. E.; RODRIGUES, A. New light on the systematics of fungi associated with attine ant gardens and the description of *Escovopsis kreiselii* sp. nov. **PLoS ONE**, v.10, p.e0112067, 2015.

MIDDELHOVEN, W. J.; FONSECA, A.; CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C. *Cryptococcus haglerorum*, sp. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast isolated from nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.83, p.167–174, 2003.

MONTOYA, Q. V.; MEIRELLES, L. A.; CHAVERRI, P.; RODRIGUES, A. Unraveling *Trichoderma* species in the attine ant environment: description of three new taxa. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.109, n.5, p.633–51, 2016.

MUELLER, U. G.; RABELING, C. A breakthrough innovation in animal evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.105, p.5287–5288, 2008.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v.7, p.103–116, 1997.

O'DONNELL, K.; KISTLER, H. C.; CIGELNIK, E.; PLOETZ, R. C. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.95, p.2044–2049, 1998.

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, p.517–526, 2008.

PAGNOCCA, F. C.; LEGASPE, M. F.; RODRIGUES, A.; RUIVO, C. C.; NAGAMOTO, N. S.; BACCI, M. Jr; 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**, Reading, v.60, p.1454–1459, 2010.

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

POWELL, R. J.; STRADLING, D. J. Factors influencing the growth of Attamyces bromatificus, a symbiont of attine ants. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v.87, p.205–213, 1986.

QUAEDVLIEG, W.; GROENEWALD, J. Z.; de JESÚS YÁÑEZ-MORALES, M.; CROUS, P. W. DNA barcoding of *Mycosphaerella* species of quarantine importance to Europe. **Persoonia**, Utrecht, v.29, p.101–115, 2012.

QUAEDVLIEG, W.; BINDER, M.; GROENEWALD, J.Z.; SUMMERELL, B.A.; CARNEGIE, A.J.; BURGESS, T.I.; CROUS, P.W. Introducing the Consolidated Species Concept to resolve species in the Teratosphaeriaceae. **Persoonia**, Utrecht, v.33, p.1–40, 2014.

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

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

RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; MARK, P. van der; AYRES, D. L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M. A.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, Washington, v.61, p.539–542, 2012.

ROUX, O.; MARTIN, J. M.; GHOMSI, N. T.; DEJEAN, A. A non-lethal water-based removal-reapplication technique for behavioral analysis of cuticular compounds of ants. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.35, p.904–912, 2009.

RUIBAL, C.; GUEIDAN, C.; SELBMANN, L.; GORBUSHINA, A. A.; CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z.; MUGGIA, L.; GRUBE, M.; ISOLA, D.; SCHOCH, C. L.; STALEY, J. T.; LUTZONI, F.; de HOOG, G. S. Phylogeny of rock-inhabiting fungi related to Dothideomycetes. **Studies in Mycology**, Utrecht, v.64, p.123–133, 2009.

RUIBAL, C.; MILLANES, A. M.; HAWKSWORTH, D. L. Molecular phylogenetic studies on the lichenicolous *Xanthoriicola physciae* reveal Antarctic rock-inhabiting fungi and *Piedraia* species among closest relatives in the Teratosphaeriaceae. **IMA Fungus**, Surrey, v.2, p.97–103, 2011.

SAMERPITAK, K.; VAN der LINDE, E.; CHOI, H. -J. et al. Taxonomy of *Ochroconis*, genus including opportunistic pathogens on humans and animals. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v.65, n.1, p.89–126, 2014.

SAMERPITAK, K.; DUARTE, A. P. M.; ATTILI-ANGELIS, D.; PAGNOCCA, F. C.; HEINRICHS, G.; RIJS, A. J. M. M.; ALFJORDEN, A.; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G.; MENKEN, S. B. J.; de HOOG, G. S. A new species of the oligotrophic genus *Ochroconis* (Sympoventuriaceae). **Mycological Progress**, Tübingen, v.14, p.6, 2015.

SANDOVAL-DENIS, M.; GENÉ, J.; SUTTON, D. A.; GUARRO, J. *Penidiellopsis radicularis*. Fungal Planet description sheets: 400–468. **Persoonia**, Utrecht, v.36, p.316-458, 2016.

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

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

STUKENBROCK, E. H.; QUAEDVLIEG, W.; JAVAN-NIKHAH, M.; ZALA, M.; CROUS, P. W.; McDONALD, B. A. *Zymoseptoria ardabilia* and *Z. pseudotritici*, two progenitor species of the septoria tritici leaf blotch fungus *Z. tritici* (synonym: *Mycosphaerella graminicola*). **Mycologia**, New York, v.104, p.1397–1407, 2012.

TEODORO, M. G.; FERREIRA, M. A.; GUIMARÃES, L. M. S.; MAFIA, R. G.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W.; ALFENAS, A. C. *Mycosphaerella* and *Teratosphaeria* species associated with leaf diseases on *Eucalyptus globulus* in southern Brazil. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v.51, p.355–364, 2012.

THANH, V. N. *Lipomyces orientalis* sp. nov., a yeast species isolated from soil in Vietnam. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.56, p.2009–2013, 2006.

THANH, V. N.; HIEN, D. D.; THOM, T. T. *Moniliella byzovii* sp. nov., a chlamydospore-forming black yeast isolated from flowers. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.63, p.1192–1196, 2013.

VILGALYS, R.; HESTER, M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.172, p.4238–4246, 1990.

WEBER, N. A. The fungus-culturing behavior of ants. **American Zoologist**, Thousand Oaks, v.12, p.577–587, 1972.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, J.; TAYLOR, S. B. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Eds.) **PCR protocols**: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990.

5 CAPÍTULO 4

Inhibition of black fungi by actinobacteria associated with attine ants

A. P. M. Duarte[1] - F. C. Pagnocca[1,2]

[1]Center for the Study of Social Insects, UNESP - Rio Claro, SP, Brazil
[2]Department of Biochemistry and Microbiology, UNESP - Rio Claro, SP, Brazil

Este capítulo é baseado no artigo original em revisão pela revista Folia Microbiologica (submetido em 04 de fevereiro de 2016).

5.1 Abstract

Attine ants are hosts to a wide variety of microorganisms, including black fungi. The diversity of black fungi present in the ants' microenvironment is higher than previously thought and so far little is known about the role played by black fungi in the complex ants-microbe interaction. Specifically, the magnitude of the relationship among actinobacteria and melanised fungi in the ants' symbiosis is largely unknown. Recently it was suggested that symbionts actinobacteria are inhibited by a melanised fungi (*Phialophora*-related) found in the integument of the ants, compromising the antifungal defense that these bacteria provide. Using *in vitro* bioassays, we tested 11 actinobacteria strains isolated from attine ants for antagonistic effects against 25 black fungi strains obtained from the integument of leaf-cutting ants. Our results revealed that 72 % of all tested black fungi were inhibited by at least one actinobacteria strain. *Phialophora* species were inhibited by *Amycolatopsis decaplanina* and *Streptomyces* sp. Additionally, *A. decaplanina* inhibited the highest number of black fungi (52 %). Thus, this study revealed that actinobacteria present on the integument of attine ants produce compounds capable of inhibiting black fungi and therefore are able to protect the ants' nests from microorganisms that threat the symbiosis.

Key words: leaf-cutting ants; Attini tribe; antagonistic; *Pseudonocardia*; dematiaceous fungi

5.2 Introduction

Attine ants keep an ancient and compulsory association with basidiomycetes fungi, which are farmed as food source and provide nutrients for the colony (BASS; CHERRETT, 1995). In order to provide beneficial conditions for the fungi growth, attine ants perform several mechanisms to defend their fungus garden, including grooming/weeding to eliminate alien microorganisms (CURRIE; STUART, 2001) and to avoid contamination of the waste deposit (WEBER, 1972; BOT et al., 2001). In spite of the defense mechanisms, the ant-mutualistic fungus relationship is parasitized by a specialized filamentous fungi of the genus *Escovopsis* (CURRIE et al., 1999a; CURRIE, 2001; REYNOLDS; CURRIE, 2004), considered symbionts of this complex interaction.

In order to protect the mutualistic fungi, attine ants have developed a symbiotic relationship with actinobacteria (genus *Pseudonocardia*) present in the integument of these insects. The actinobacteria are responsible for the production of antimicrobial substances that inhibit the growth of *Escovopsis* (CURRIE et al., 1999b).

During an isolation of actinobacteria in *Apterostigma* ants (Attini tribe), Little and Currie (2007) often obtained colonies of black fungi (phylogenetically close to the genus *Phialophora*, Ascomycota), considered by these authors another symbiont in the attine ant-microbe symbiosis. Besides, Little and Currie (2008) suggest that the *Phialophora*-related fungus has an antagonistic relationship with the actinobacteria, directly competing for nutrients and suppressing the bacterial growth.

Additionally, black fungi of Chaetothyriales (as *Cladophialophora*, *Exophiala* and *Phialophora* genera) and Capnodiales order (as *Cladosporium* genus and Teratosphaeriaceae family) have also been frequently isolated from the integument of leaf-cutting ants (Attini tribe) (GUEDES et al., 2012; DUARTE et al., 2014; ATTILI-ANGELIS et al., 2014). The occurrence of a wide diversity of black fungi in the ants' body, including *Phialophora* species (ATTILI-ANGELIS et al., 2014), raises doubts about the role of these microorganisms in the symbiosis.

Studies on the association between attine ants and black fungi are scarce and have been mostly developed in the Microbiology Laboratory of the Center for the Study of Social Insects (Rio Claro, SP, Brazil). Despite all the effort directed to studies that have expanded the knowledge of the black fungal diversity from attine ants, some aspects of this relationship

remain to be elucidated. Here we performed *in vitro* bioassays in order to further explore the interactions among black fungi and actinobacteria.

5.3 Materials and Methods

5.3.1 Microorganisms selection

A total of 25 black fungal strains and 11 actinobacteria strains were obtained from the Center of Microbial Resources, Rio Claro, SP, Brazil. Except for black fungi strains TO 390 and TO 868, which were isolated from the refuse deposit of *Acromyrmex balzanii*, and AP 160, AP 323, which were isolated from the fungal pellet carried by gynes during the mating flight, all the 21 strains remaining were obtained from the integument of leaf-cutting ants. Black fungal strains were selected according to the different morphological characteristics and two recently described *Phialophora* species (ATTILI-ANGELIS et al., 2014), isolated from the integument of *Atta capiguara*, were intentionally chosen. Actinobacteria strains were isolated from the integument of *Trachymyrmex* and *Acromyrmex* ants. All the strains are preserved in 15 % glycerol at -80 °C and were reactivated on YMA (0.3 % yeast extract, 0.3 % malt extract, 0.5 % peptone, 1 % glucose, 2 % agar) for actinobacteria and MA (2 % malt agar) for black fungi.

5.3.2 DNA extraction and sequencing

Actinobacteria and black fungi were transferred to fresh YMA and MA plates, respectively, and incubated at 25 °C for 14–21 d. Approximately 1 cm^2 mycelium was transferred to a 2 ml Eppendorf tube containing 500 µL of lysis buffer (50 mmol Tris l^{-1}; 250 mmol de NaCl l^{-1}; 50 mmol EDTA l^{-1}; 0.3 %, w/v, SDS; pH 8) and the equivalent to 100 µL of sterilized glass microspheres (SIGMA G8893). After vortexed for 4 min, the microtubes were incubated for 1 h at 65 °C and this procedure was repeated twice. After centrifugation for 15 min at 13 000 rpm the aqueous phase, containing the DNA, was transferred into new microtubes. DNA extracts were stored at -20 °C prior to use.

Actinobacteria strains, previously sequenced by Mendes et al. (2013) and Meirelles et al. (2014), were identified using the 16S rRNA region following the protocol of Mendes et al.

(2013). PCR amplification was performed using the primers 27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') and 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3') (LANE, 1991). Sequences were generated using the same primers along with an internal primer U519F (5'-CAGCMGCCGCGGTAATWC-3') (LANE, 1991).

Black fungi were identified using the ITS rDNA region following the protocol of Duarte et al. (2014). PCR amplification and sequencing were performed using the primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE et al., 1990). Sequences were edited in Bioedit v.7.0.5.3 (HALL, 1999) and used in BLASTn analysis at NCBI-GenBank (ALTSCHUL et al., 1997).

5.3.3 Bioassay challenges

In order to analyze the defensive potential of actinobacteria against black fungi, *in vitro* bioassays were performed. Bioassays challenges followed a modified version of the antibiogram test (BAUER et al., 1966).

A suspension of 1 cm^2 of fungal tap, previously cultivated on YMA for 7–14 d at 25 °C, was vortexed in 5 mL 0.85 % saline solution. Then, 150 µL aliquots of the fungal suspension were spread in YMA plates. After 30 min of settling, an agar plug (7 mm of diameter) of the actinobacteria was inoculated in the YMA plates containing the diffused black fungus. Actinobacteria were grown on YMA for 25 d at 25 °C before the experiments. The plates were then incubated for 14–21 d at 25 °C. Six actinobacteria were evaluated per 150-mm plate (Online Resource) and the best results were repeated individually on 90-mm plates. For each black fungus-actinobacteria assay (a total of 275 challenges) were made three replicates. The activity of actinobacteria against the black fungi was determined by measuring the diameter of the inhibition halo and differences were evaluated using Kruskal–Wallis non-parametric test in BioEstat v.5.0 (AYRES et al., 2007).

5.4 Results

5.4.1 Actinobacteria and black fungi identification

According to Meirelles et al. (2014), the actinobacteria TD 01–TD 04 and TD 07, isolated from the integument of *Trachymyrmex* (Table 1), share identical 16S rRNA sequences and therefore only TD 01 was sequenced in this study. At the GenBank database, TD 01 showed 100 % of similarity with *Pseudonocardia* sp. TD 07 (accession # KF240732), deposited by Meirelles et al. (2014) and 99 % of similarity with *Pseudonocardia* sp. EC090907-05 (accession # JQ731845) isolated by Marsh et al. (2013) from an *Atta cephalotes* nest in Peru. Six non-*Pseudonocardia* strains were identified as *Streptomyces* sp. (n=4), *Amycolatopsis decaplanina* (n=1) and *Nocardia neocaledoniensis* (n=1).

Sequencing of the ITS region (Table 2) revealed that all the 25 black fungal strains belongs to different ascomycetous species and *Exophiala* species were the most abundant (n=4). Additionally, chaetothyrialean fungi were predominant (n=8).

Table 1 – Identification of the actinobacteria based on 16S rRNA sequencing.

Strain code	Isolation source	Nest	GenBank best hit (similarity, accession #)
TD 01	*Trachymyrmex* sp.	SES080402-05	*Pseudonocardia* sp. (100 %, KF240732)
TD 02	*Trachymyrmex* sp.	SES080402-05	*Pseudonocardia* sp.[1]
TD 03	*Trachymyrmex* sp.	SES080419-02	*Pseudonocardia* sp. [1]
TD 04	*Trachymyrmex* sp.	SES080419-04	*Pseudonocardia* sp. [1]
TD 07	*Trachymyrmex* sp.	SES080419-03	*Pseudonocardia* sp. [1]
TD 33	*Trachymyrmex* sp.	SES080911-04	*Streptomyces* sp. (99 %, JN408737)
TD 34	*Trachymyrmex* sp.	SES080911-04	*Amycolatopsis decaplanina* (100 %, NR025562) [2]
TD 36	*Acromyrmex* cf. *balzani*	SES080911-08	*Streptomyces* sp. (99 %, KT581419)
TD 37	*Acromyrmex* cf. *balzani*	SES080911-09	*Streptomyces* sp. (99 %, AB622252)
TD 41	*Acromyrmex* cf. *balzani*	SES080911-10	*Nocardia neocaledoniensis* (99 %, JX297206)
TD 53	*Trachymyrmex* sp.	SES080924-01	*Streptomyces* sp. (98 %, EU413908)

[1] Sequencing not performed
[2] Identification carried out by Mendes et al. (2013)

Table 2 – Identification of the black fungi based on ITS rDNA sequencing.

(continued)

Strain code	Isolation source	GenBank best hit (similarity, accession #)	Taxonomic assigment
AP 79	*A. capiguara* gyne	*Phialophora attae* (100 %, KF928460)	Chaetothyriales
AP 128	*A. capiguara* gyne	*Exophiala spinifera* (98 %, AY484985)	Chaetothyriales
AP 160	*A. capiguara* pellet	*Cochliobolus lunatus* (100 %, HQ607991)	Pleosporales
AP 171	*A. capiguara* gyne	*Ochroconis globalis* (100 %, KF961088)	Venturiales
AP 267	*A. capiguara* gyne	*Exophiala* sp. (95 %, HQ631063)	Chaetothyriales
AP 297	*A. capiguara* gyne	*Ochroconis sexualis* (100 %, KF156018)	Venturiales
AP 300	*A. capiguara* gyne	*Cladophialophora* sp. (92 %, EU137293)	Chaetothyriales
AP 323	*A. laevigata* pellet	*Exophiala dermatitidis* (100 %, AB498925)	Chaetothyriales
AP 376	*A. capiguara* gyne	*Phialophora capiguarae* (100 %, KF928464)	Chaetothyriales
AP 389	*A. capiguara* gyne	*Penidiellopsis radicularis* (100 %, KT833150)	Capnodiales
AP 416	*A. capiguara* gyne	*Simplicidiella nigra* (100 %, KT833147)	Capnodiales
DOC 43	*A. capiguara* drone	*Microsphaeropsis arundinis* (100 %, JX496010)	Pleosporales
DOC 93	*A. capiguara* gyne	*Trichomerium foliicola* (92 %, JX313653)	Capnodiales
DOC 97	*A. laevigata* drone	*Strelitziana eucalypti* (92 %, HQ599596)	Chaetothyriales
DOC 147	*A. laevigata* drone	*Sporothrix schenckii* (98 %, AB363791)	Ophiostomatales
DOC 287	*A. capiguara* drone	*Ramichloridium brasilianum* (97 %, EU041797)	Capnodiales
DOC 289	*A. capiguara* drone	*Dactylaria* sp. (95 %, AY265338)	Helotiales
DOC 312	*A. capiguara* drone	*Paraphaeosphaeria* sp. (98 %, KC871040)	Pleosporales

Table 2 – Identification of the black fungi based on ITS rDNA sequencing.

(conclusion)

Strain code	Isolation source	GenBank best hit (similarity, accession #)	Taxonomic assigment
DOC 337	*A. capiguara* gyne	*Catenulostroma hermanusense* (93 %, JF499833)	Capnodiales
FAH 40	*A. laevigata* worker	*Curvularia trifolii* (98%, GQ241277) [3]	Pleosporales
PB 10	*A. sexdens rubropilosa* drone	*Kabatiella microsticta* (99 %, EU167608)	Dothideales
PB 11	*A. sexdens rubropilosa* drone	*Kabatiella microsticta* (98 %, EU167608)	Dothideales
TO 390	*Acromyrmex balzani* disposal	*Exophiala bergeri* (100 %, FJ358240) [4]	Chaetothyriales
TO 868	*Acromyrmex balzani* disposal	*Dothichiza pithyophila* (97 %, FJ150969) [4]	Dothideales
87N	*A. capiguara* gyne	*Xenopenidiella inflata* (100 %, KT833171)	Capnodiales

[3] Identification carried out by Guedes et al. (2012)
[4] Identification carried out by Melo (2014)

5.4.2 Antagonism against black fungi

We evaluated the interaction of 11 actinobacteria strains (five *Pseudonocardia* and six non-*Pseudonocardia*) against 25 black fungal strains. In the 275 bioassay challenges, 72 % of all black fungi were inhibited by at least one actinobacteria strain (Table 3).

Comparisons among the tested actinobacteria revealed that non-*Pseudonocardia* strains significantly inhibited more black fungi than the *Pseudonocardia* strains (Kruskal-Wallis test, $p<0.05$). Both *Amycolatopsis decaplanina* (TD 34) and *Streptomyces* sp. (TD 37) inhibited the highest number of black fungi, 52 % and 44 %, respectively, including *Phialophora* species.

Considering the inhibitory effects as weak (9.5-15 mm diam halo), medium (16-30 mm diam halo) or strong (> 30 mm diam halo), there was a remarkably dominance of weak inhibitions (n=27) and minority of strong inhibitions (n=10). Additionally, *Trichomerium foliicola* (DOC 93) was strongly inhibited (inhibition halo: 60 mm diameter) by *Streptomyces* sp. (TD 33).

Catenulostroma hermanusense (DOC 337) and *Cladophialophora* sp. (AP 300) were the black fungi inhibited by the highest number of actinobacteria (n=7 for both). On the other hand, *Dactylaria* sp. (DOC 289), *Dothichiza pithyophila* (TO 868), *Exophiala* sp. (AP 267), *Kabatiella microsticta* (PB 11), *Microsphaeropsis arundinis* (DOC 43), *Ochroconis globalis* (AP 171) and *Sporothrix schenckii* (DOC 147) were not inhibited by any of the tested actinobacteria.

Table 3 – Antagonistic activity of actinobacteria strains against black fungi strains. Results are expressed as inhibition diameter (mm).

Black fungi strains	**Actinobacteria strains**										
	TD 01	TD 02	TD 03	TD 04	TD 07	TD 33	TD 34	TD 36	TD 37	TD 41	TD 53
Phialophora attae AP 79							20	20			
Exophiala spinifera AP 128									15		
Cochliobolus lunatus AP 160							9.5			11	
Ochroconis globalis AP 171											
Exophiala sp. AP 267											
Ochroconis sexualis AP 297							25				
Cladophialophora sp. AP 300	10	10	13	10	12	40	12				
Exophiala dermatitidis AP 323									10		10
Phialophora capiguarae AP 376							20		16		
Penidiellopsis radicularis AP 389							22		22		23
Simplicidiella nigra AP 416							35		30	10	30
Microsphaeropsis arundinis DOC 43											
Trichomerium sp. DOC 93						60	35		25		
Strelitziana sp. DOC 97	20	20	12				45				
Sporothrix schenckii DOC 147											
Ramichloridium sp. DOC 287							21		10		10
Dactylaria sp. DOC 289											
Paraphaeosphaeria sp. DOC 312										10	
Catenulostroma sp. DOC 337	10	10	10	10			10		33		31
Curvularia trifolii FAH 40									11	11	10
Kabatiella microsticta PB 10							25				
Kabatiella microsticta PB 11											
Exophiala bergeri TO 390						12		11	11		12
Dothichiza pithyophila TO 868											
Xenopenidiella inflata 87N							31		32		32

Amycolatopsis decaplanina (TD 34)
Nocardia neocaledoniensis (TD 41)
Pseudonocardia sp. (TD 01-TD 04 e TD 07)
Streptomyces sp. (TD 33, TD 36, TD 37 e TD 53)

5.5 Discussion

In an attempt to establish the role of the *Phialophora*-related fungus in the symbiotic relationship of attine ants, Little and Currie (2008) performed bioassay challenges and observed that the melanised fungus inhibit the growth of *Pseudonocardia*, limiting the defense mechanisms that ants have against the parasitic fungi *Escovopsis*. However, the studies of Sen et al. (2009) and Duarte et al. (2014) reported that the number of actinobacteria and black fungi in the ants' integument is more diverse than previously thought and the interactions among them should be better elucidated.

Thus, to better understand the antagonistic effects of this relationship, we selected 11 actinobacteria (including non-*Pseudonocardia* species), isolated from the integument of attine ants, and 25 black fungal species, also isolated from the ants' integument, to perform *in vitro* antagonism bioassays.

Among the selected actinobacteria, *Pseudonocardia* and *Streptomyces* species were at higher number. According to Mendes et al. (2013), most of the actinobacteria found in the integument of attine ants belongs to the genera *Pseudonocardia* and *Streptomyces*. Also, several studies have proved the production of antifungal substances by these actinobacteria, as dentigerumycin (OH et al., 2009), urauchimycins (MENDES et al., 2013), candicidin and antimycin (SEIPKE et al., 2011, 2012).

Although *Pseudonocardia* has a strong antagonistic effect against *Escovopsis* (POULSEN et al., 2010; MEIRELLES et al., 2014), in this study *Pseudonocardia* strains were able to inhibit only three black fungal species (*Catenulostroma hermanusense*, *Cladophialophora* sp. and *Strelitziana eucalypti*), showing low efficiency against these fungi. Also, *Pseudonocardia* strains were not able to inhibit *Phialophora*, confirming the results obtained by Little and Currie (2008).

Oppositely, non-*Pseudonocardia* strains, such as *Amycolatopsis declapanina* and *Streptomyces* sp., were very efficient in the inhibitory activity. *Amycolatopsis decaplanina* (TD 34) inhibited a broad spectrum of black fungi (n=13), including *Phialophora* species. *Amycolatopsis decaplanina* may produce the decaplanin antibiotic (WINK et al., 2004). First isolated from soil, Wink et al. (2004) reported that this bacteria didn't show antifungal activity. However Mendes et al. (2013) showed that organic extracts of TD 34 inhibited the yeast *Candida albicans*. Now we are reporting that *A. decaplanina* may also inhibit many black fungi.

Haeder et al. (2009) observed that *Streptomyces* sp. are highly active against the parasite *Escovopsis*. In this study *Streptomyces* sp. (TD 37) shown to be effective against a wide range of black fungi (n=11) confirming that members of this genus may act positively in the ants' symbiosis.

Although reported by Little and Currie (2008) that symbiont *Pseudonocardia* are suppress by the *Phialophora*-related fungus, our results revealed that non-*Pseudonocardia* strains (such as *A. decaplanina* and *Streptomyces* sp.), also present in the integument of attine ants, were able to interfere in the growth of two *Phialophora* species. Recently described (ATTILI-ANGELIS et al., 2014), *Phialophora attae* and *P. capiguarae* were, so far, only been found in attine ants' integument and its interaction in the symbiosis is unclear.

Despite the high inhibitory efficiency of *Amycolatopsis decaplanina* and *Streptomyces* sp. against black fungi, it is important to note that actinobacteria and black fungi were not isolated from the same ants' species. However, the source of the strains does not revoke the ability of these actinobacteria to inhibit black fungi, especially potentially pathogenic species.

Several studies have shown that black fungi are more resistant to antifungal agents (NOSANCHUK; CASADEVALL, 2006; DUARTE et al., 2013) and it has been correlated to the melanisation of the cell wall. Therefore, the weak inhibition observed for most of the analysed fungal strains could be related to their recalcitrant nature. It was interesting to note that the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii*, isolated from the integument of *Atta laevigata* drone, was not inhibited by any of the actinobacteria tested.

The presence of black fungi in the attine ants' integument was recently discovered and, so far, most of the studies aimed to study the fungal diversity. The findings of these studies revealed that several black fungi found in the ants' environment are potentially pathogens, such as *Exophiala dermatitidis* and *E. spinifera* (HARRIS et al., 2009; SUDHADHAM et al., 2010). Infections caused by black fungi are difficult to control and new antifungal agents could be isolated from actinobacteria living in the ants' microenvironment. Despite the low efficiency of *Pseudonocardia* against black fungi, our results showed that other actinobacteria present in the integument of ants are able to inhibit these fungi.

The present study on antagonistic effects of black fungi towards actinobacteria is the first effort to understand the complex interactions involving melanised fungi in the attine ants symbiosis. At first sight our data show that the ants continuously select a broad range of actinobacteria which can inhibit possible mycoparasites of the symbiosis.

References

AYRES, M.; AYRES, M. Jr.; AYRES, D. L.; dos SANTOS, A. S. **BioEstat 5.0-Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas**: Sociedade Civil Mamirauá, Belém. Brasília: CNPq, 2007.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. GappedBLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.25, p.3389–3402, 1997.

ATTILI-ANGELIS, D.; DUARTE, A. P. M.; PAGNOCCA, F. C.; NAGAMOTO, N. S.; de VRIES, M.; STIELOW, J. B.; de HOOG, G. S. Novel *Phialophora* species from leaf-cutting ants (tribe Attini). **Fungal Diversity**, Dordrecht, v.65, p.65–75, 2014.

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

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotics susceptibility test by a standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, Chicago, v.45, p.493–496, 1966.

BOT, A. N. M.; CURRIE, C. R.; HART, A. G.; BOOMSMA, J. J. Waste management in leaf-cutting ants. **Ethology Ecology & Evolution**, Firenze, v.13, n.3, p. 225–237, 2001.

CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.96, 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, 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, p.357–380, 2001.

CURRIE, C. R.; STUART, A. E. Weeding and grooming of pathogens in agriculture by ants. **Proceedings of the Royal Society B**, London, n.1471, p.1033–1039, 2001.

DUARTE, A. P. M.; PAGNOCCA, F. C.; BARON, N. C.; MELHEM, M. S. C.; PALMEIRA, G. A.; de ANGELIS, D. F.; ATTILI-ANGELIS, D. In vitro susceptibility of environmental isolates of *Exophiala dermatitidis* to five antifungal drugs. **Mycopathologia**, v.175, p.455–461, 2013.

DUARTE, A. P. M.; ATTILI-ANGELIS, D.; BARON, N. C.; FORTI, L. C.; PAGNOCCA, F. C. Leaf-cutting ants: an unexpected microenvironment holding human opportunistic black fungi. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.106, n.3, p.465–73, 2014.

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

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

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

HARRIS, J. E.; SUTTON, D. A.; RUBIN, A.; WICKES, B.; de HOOG, G. S.; KOVARIK, C. *Exophiala spinifera* as a cause of cutaneous phaeohyphomycosis: Case study and review of the literature. **Medical Mycology**, v.47, n.1, p.87–93, 2009.

LANE, D. J. 16S/23S RNAr sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, G. (Eds.) **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic**. New York: John Willey, 1991. p.115–175.

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.

LITTLE, A. E.; CURRIE, C. R. Black yeast symbionts compromise the efficiency of antibiotic defenses in fungus-growing ants. **Ecology**, Washington, v.89, p.1216–1222, 2008.

MARSH, S. E.; POULSEN, M.; GOROSITO, N. B.; PINTO-TOMÁS, A.; MASIULIONIS, V. E.; CURRIE, C. R. Association between *Pseudonocardia symbionts* and *Atta* leaf-cutting ants suggested by improved isolation methods. **International Microbiology**, Madrid, v.16, p.17–25, 2013.

MELO, W. G. P. **Leveduras isoladas de ninhos de *Acromyrmex balzani* (Hymenoptera: Formicidae) de áreas de cerrado do Estado do Tocantins**. 2014. 164 f. Tese (Doutorado em Ciências biológicas -Área de Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2014.

MEIRELLES, L. A.; MENDES, T. D.; SOLOMON, S. E.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; RODRIGUES, A. Broad *Escovopsis*-inhibition activity of *Pseudonocardia* associated with *Trachymyrmex* ants. **Environmental Microbiology Reports**, Bedford, v.6, n.4, p.339–345, 2014.

MENDES, T. D.; BORGES, W. S.; RODRIGUES, A.; SOLOMON, S. E.; VIEIRA, P. C.; DUARTE, M. C. T.; PAGNOCCA, F. C. Anti-*Candida* properties of urauchimycins from actinobacteria associated with *Trachymyrmex* ants. **BioMed Research International**, v.2013, p.1–9, 2013.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**, v.50, n.11, p.3519–3528, 2006.

OH, D. C.; POULSEN, M.; CURRIE, C. R.; CLARDY, J. Dentigerumycin: a bacterial mediator of an ant-fungus symbiosis. **Nature Chemical Biology**, New York, v.5, n.6, p.391–393, 2009.

POULSEN, M.; CAFARO, M. J.; ERHARDT, D. P.; LITTLE, A. E. F.; GERARDO, N. M.; TEBBETS, B.; KLEIN, B. S.; CURRIE, C. R. Variation in *Pseudonocardia* antibiotic defence helps govern parasite-induced morbidity in *Acromyrmex* leaf-cutting ants. **Environmental Microbiology Reports**, Bedford, v.2, n.4, p.534–540, 2010.

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

SEIPKE, R. F.; BARKE, J.; BREARLEY, C.; HILL, L.; YU, D. W.; GOSS, R. J. M.; HUTCHINGS, M. I. A single *Streptomyces* symbiont makes multiple antifungals to support the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus.* **PLoS ONE**, v.6, n.8, p.e22028, 2011.

SEIPKE, R. F.; GRUSCHOW, S.; GOSS, R. J.; HUTCHINGS, M. I. Isolating antifungals from fungus-growing ant symbionts using a genome-guided chemistry approach. **Methods in Enzymology**, New York, v.517, p.47–70, 2012.

SEN, R.; ISHAKA, 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**, Whasington, v.106, n.42, p.17805–17810, 2009.

SUDHADHAM, M.; de HOOG, G. S.; MENKEN, S. B. J.; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G.; SIHANONTH, P. Rapid screening for genotypes as possible markers of virulence in the neurotropic black yeast *Exophiala dermatitidis* using PCR-RFLP. **Journal of Microbiol Methods**, v.80, p.138–142, 2010.

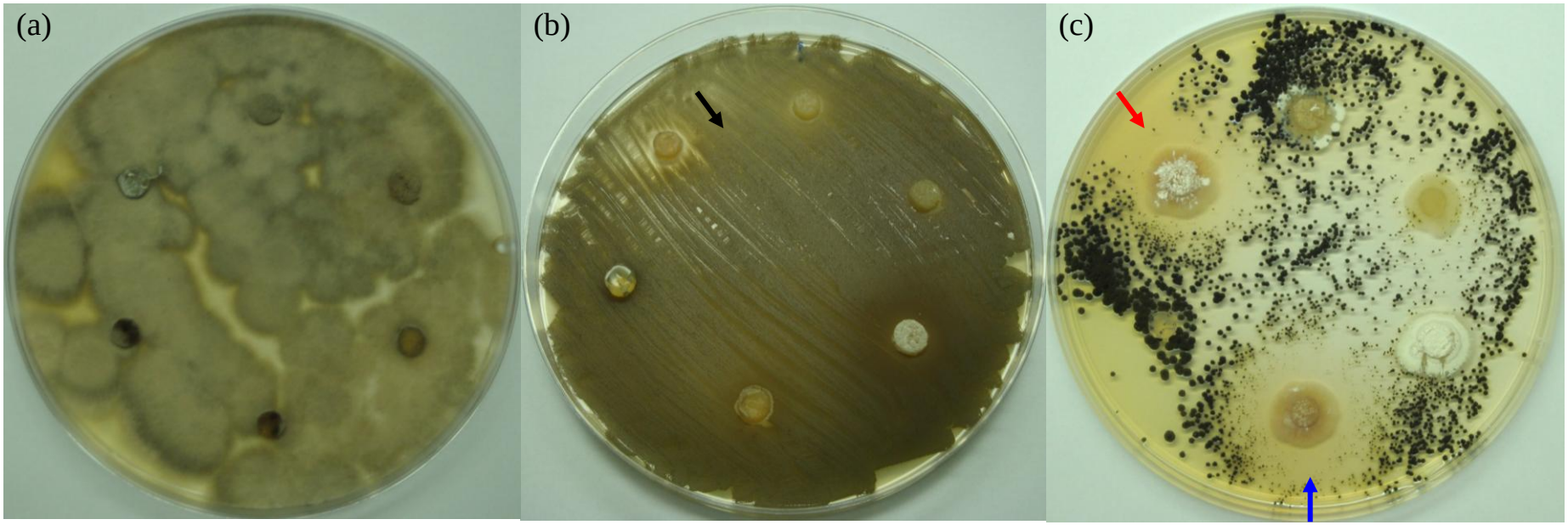
WEBER, N. A. The fungus-culturing behavior of ants. **American Zoologist**, Thousand Oaks, v.12, p.577–587, 1972.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; WHITE, T.; SNINSKY, J. J. (Eds.) **PCR protocols**: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990.

WINK, J.; GANDHI, J.; KROPPENSTEDT, R. M.; SEIBERT, G.; STRÄUBLER, B.; SCHUMANN, P.; STACKEBRANDT, E. *Amycolatopsis decaplanina* sp. nov., a novel member of the genus with unusual morphology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.54, p.235–239, 2004.

5.6 Online Resource

Figure ESM 1 – **(a)** Non-inhibition of *Cochliobolus lunatus* (AP 160) by six actinobacteria after 14 days of incubation at 25 °C; **(b)** Weak inhibition of *Exophiala bergeri* (TO 390) by *Streptomyces* sp. (TD 53), indicated by the black arrow, after 10 days of incubation at 25 °C; (c) Strong inhibition of *Catenulostroma hermanusense* (DOC 337) by *Streptomyces* sp. (TD 37) and *Streptomyces* sp. (TD 53), after 21 days of incubation at 25 °C, indicated by the blue and red arrow, respectively.



6 CONSIDERAÇÕES E PERSPECTIVAS

Os estudos sobre fungos negros em ambientes naturais são escassos e, por isso, a ecologia de muitas espécies ainda é pouco conhecida. A relação desses fungos com as formigas da tribo Attini ampliou o conhecimento sobre seu nicho ecológico e instigou a hipótese de que seu reservatório natural poderia ser os ninhos desses insetos.

O integumento de formigas cortadeiras de folhas abriga uma comunidade muito diversa de fungos negros. A partir deste microambiente, 13 novos táxons de fungos negros já foram descritos e outros se encontram em processo de análise, como *Cladophialophora* e *Exophiala.* Como todas essas novas descobertas vieram de uma única área geográfica, Botucatu (SP), e formigas do gênero *Atta*, muitas outras espécies novas poderão ser encontradas expandindo a pesquisa para outras regiões do país e diferentes espécies de formigas Attini.

A utilização de técnicas de cultivo favoráveis ao crescimento de fungos negros, como a flotação em óleo mineral e o cultivo sem nitrogênio, foi o ponto chave para a ampla diversidade encontrada. Assim, a aplicação desses métodos em formigas *Apterostigma* (tribo Attini) poderá confirmar se de fato existe uma monocultura de leveduras negras no integumento desses insetos.

A premissa de que os fungos negros inibem o crescimento de actinobactérias (gênero *Pseudonocardia*) precisa ser melhor investigada pois outras espécies de actinobactérias presentes no integumento de formigas Attini, como *Amycolatopsis* e *Streptomyces*, mostraram-se eficientes contra esses fungos. O espectro de ação antifúngica dessas actinobactérias sobre os fungos negros é outro tópico a ser aprofundado considerando que existe um número reduzido de agentes antifúngicos no âmbito clínico.

A marcante presença de *Cladosporium* no integumento de formigas cortadeiras de folhas mostra que pode existir uma relação espécie-específica entre esse grupo de fungos e as formigas *Atta capiguara* e *Atta laevigata*. Aspectos como o antagonismo com o fungo parasita *Escovopsis* e o potencial enzimático devem ser investigados para elucidar a relação de *Cladosporium* com esses insetos.

A relação dos fungos negros com as formigas da tribo Attini é um tema promissor a ser explorado para compreender as relações existentes na simbiose dessas formigas e fomentar a literatura com novas espécies de fungos descritas.