

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 26/04/2018.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS



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

JULIO FLAVIO OSTI

**EVIDÊNCIAS EXPERIMENTAIS SUGEREM O GÊNERO *ESCOVOPSIODES* COMO
PARASITA DO FUNGO CULTIVADO PELAS FORMIGAS ATÍNEAS**

Rio Claro
2016

JULIO FLAVIO OSTI

**EVIDÊNCIAS EXPERIMENTAIS SUGEREM O GÊNERO *ESCOVOPSIODES* COMO
PARASITA DO FUNGO CULTIVADO PELAS FORMIGAS ATÍNEAS**

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

Orientador: Prof. Dr. André Rodrigues

**Rio Claro
2016**

576
O85e

Osti, Julio Flavio

Evidencias experimentais sugerem o gênero
Escovopsioides como parasita do fungo cultivado pelas
formigas atíneas / Julio Flavio Osti. - Rio Claro, 2016
37 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: André Rodrigues

1. Micro-organismos. 2. Ecologia microbiana. 3.
Hypocreales. 4. Micoparasitismo. 5. Formigas Attini. 6.
Biocontrole. I. Título.

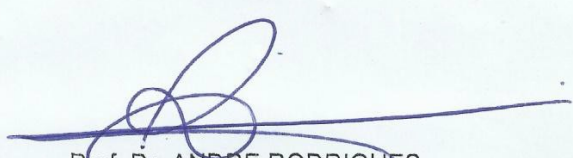
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EVIDÊNCIAS EXPERIMENTAIS REFORÇAM O GÊNERO ESCOVOPSIODES COMO PARASITA DO FUNGO CULTIVADO PELAS FORMIGAS ATÍNEAS

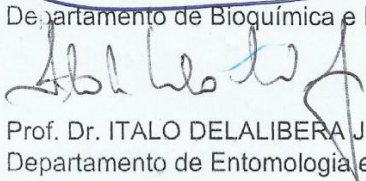
AUTOR: JULIO FLAVIO OSTI

ORIENTADOR: ANDRE RODRIGUES

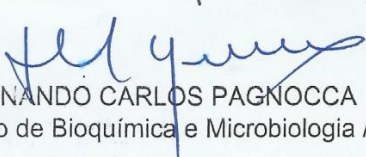
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:



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



Prof. Dr. ITALO DELALIBERA JÚNIOR
Departamento de Entomologia e Acarologia / Universidade de São Paulo



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

Rio Claro, 26 de abril de 2016

TÍTULO ALTERADO PARA: EVIDÊNCIAS EXPERIMENTAIS SUGEREM O GÊNERO ESCOVOPSIODES COMO PARASITA DO FUNGO CULTIVADO PELAS FORMIGAS ATÍNEAS

**Dedico este trabalho aos meus pais, pelo
apoio incondicional.**

Agradecimentos

Agradeço ao professor André Rodrigues, por não ter me abandonado no início, me indicando uma oportunidade de emprego como técnico no LAMAI. Agradeço também, por ter me oferecido um bom projeto para eu desenvolver, bem como por toda sua dedicação e empenho como orientador.

À professora Lara Durães Sette por ter me dado a oportunidade de trabalhar como técnico em seu laboratório.

Ao pessoal do LAMAI Pedro, Alexandre e Gabi, Juzinha. Foram pessoas legais, que possibilitou um ambiente de trabalho muito agradável.

A minha chefe Ju, que é uma pessoa muito querida. Toda sua paciência, compreensão e boa-fé, que foram essenciais no meu aprendizado de toda parte básica do trabalho de bancada.

Aos colegas do LESF, que me ensinaram todos os protocolos básicos de bancada, bem como dicas importantes para o êxito da dissertação. Em especial a Mariana, por ter me ensinado bastante no trabalho com formigas, que foi importante na segunda metade do trabalho.

Ao professor Odair Bueno e suas técnicas, que sempre estiveram a disposição, mesmo em dias não usuais. Também agradeço ao professor Maurício Bacci e seu estudante, Sérgio Kakazu, por oferecerem o acesso e execução dos meus sequenciamentos.

Agradeço ao professor Fernando Pagnocca, por ter me dado completo acesso ao seu laboratório durante os experimentos de jardins de fungo com presença de formigas.

Ao programa de pós-graduação, que oferece um sistema de seleção para o mestrado bastante acessível. Agradeço também à Capes por ter financiado a minha bolsa.

Aos meus pais por todo apoio, inclusive em Rio Claro. Agradeço também minhas irmãs, por toda amizade que elas me oferecem.

Ao Ivo, por toda sua amizade, sua lealdade e atenção, que se mostram resistentes ao tempo e à longa distância.

Sumário

Resumo	8
Abstract	9
Introdução	10
Material e Métodos	11
<i>Origem e manutenção dos fungos</i>	<i>11</i>
<i>Caracterização molecular de Escovopsioides</i>	<i>12</i>
<i>Análises filogenéticas.....</i>	<i>13</i>
<i>Bioensaios de inibição (co-cultivo).....</i>	<i>14</i>
<i>Análise dos dados dos experimentos de co-cultivo</i>	<i>15</i>
<i>Bioensaios com fragmentos de jardim de fungo na ausência de operárias.....</i>	<i>15</i>
<i>Bioensaios com fragmentos de jardim de fungo na presença das operárias.....</i>	<i>16</i>
Resultados.....	17
<i>Filogenia do fungo Escovopsioides</i>	<i>17</i>
<i>Bioensaios in vitro de antagonismo</i>	<i>18</i>
<i>Bioensaios com fragmentos de jardim de fungo na ausência das operárias.....</i>	<i>18</i>
<i>Bioensaios de fragmentos de jardim de fungo na presença das operárias</i>	<i>19</i>
Discussão.....	20
Considerações.....	24
Referências	24
Legenda das Figuras.....	29
Tabelas	30
Figuras	32
Material Suplementar	36

EVIDÊNCIAS EXPERIMENTAIS SUGEREM O GÊNERO *ESCOVOPSIODES* COMO PARASITA DO FUNGO CULTIVADO PELAS FORMIGAS ATÍNEAS

Julio Flavio Osti¹, André Rodrigues^{1,2*}

¹Departamento de Bioquímica e Microbiologia, UNESP- Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, Brasil.

²Centro de Estudos de Insetos Sociais, UNESP- Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, Brasil.

* Autor correspondente:

andrer@rc.unesp.br

Universidade Estadual Paulista, UNESP, Departamento de Bioquímica e Microbiologia
Avenida 24-A, n.1515, Bela Vista, Rio Claro, SP, CEP:13.506-900

Tel: +55 19 3526-4364 e Fax: +55 19 3526-4176

Resumo

Os jardins de fungo das formigas da tribo Attini abrigam uma microbiota diversa, além do fungo mutualista cultivado como alimento por esses insetos. Fungos do gênero *Escovopsioides* foram recentemente descritos como membros dessa microbiota. Relacionado filogeneticamente com os fungos parasitas *Escovopsis*, nada se sabe sobre a biologia e o potencial parasita de *Escovopsioides* nos jardins de fungo das formigas atíneas. Neste contexto, acessamos a diversidade genética de 21 isolados de *Escovopsioides* obtidos de colônias de formigas cortadeiras (gêneros *Atta* e *Acromyrmex*) e não cortadeiras (gêneros *Trachymyrmex* e *Apterostigma*), provenientes de diferentes regiões do Brasil. Independente da origem dos isolados, foi observada uma baixa diversidade genética entre 20 dos 21 isolados de *Escovopsioides* examinados, o que permitiu identifica-los como *Escovopsioides nivea* (a única espécie descrita para o gênero). Em contrapartida, o isolado obtido da colônia de *Apterostigma megacephala* apresentou baixa similaridade genética em relação à *E. nivea*, o que aponta para uma nova espécie filogenética. Segundo os marcadores moleculares *tef1* e ITS, *Escovopsioides* ocupa uma posição intermediária na filogenia de *Escovopsis*, o que sugere a possível reclassificação do gênero *Escovopsioides* como *Escovopsis*. Adicionalmente, nosso estudo confirmou o antagonismo de *Escovopsioides* frente ao fungo mutualista de formigas cortadeiras (*Leucoagaricus gongylophorus*). Esse resultado sugere que *Escovopsioides* seja um micoparasita do fungo cultivado pelas formigas. Baseado em dados de crescimento de *Escovopsioides* em jardim de fungo, tanto na ausência, quanto na presença de operárias podemos apontar fortes evidências do parasitismo de *Escovopsioides* frente ao jardim de fungo das formigas atíneas.

Palavras-chaves: Hypocreales. *Escovopsis*. Micoparasitismo. Formigas Attini. Biocontrole.

Abstract

Fungus gardens of attine ants harbor a rich microbiome, besides the mutualistic fungus cultivated by these insects for food. Fungi in the genus *Escovopsioides* were recently described as members of this microbiome. Closely related to the parasitic fungal genus *Escovopsis*, nothing is known about the biology and the parasitic potential of *Escovopsioides* in the fungus gardens of attine ants. In this sense, we accessed the genetic diversity of 21 *Escovopsioides* isolates obtained from leaf-cutting ants (*Atta* and *Acromyrmex* genera) and no leaf cutting ant colonies (*Trachymyrmex* and *Apterostigma* genera), originated from distinct regions of Brazil. Independent of the origin of the isolate, we observed a low genetic diversity among 20 out of 21 isolates, which prompted the identification of these isolates as *Escovopsioides nivea* (the only described species for the genus). In contrast, the isolate obtained from the colony of *Apterostigma megacephala* showed low genetic similarity in relation with *E. nivea*, indicating a new phylogenetic species. According to the *tef1* and ITS molecular markers, *Escovopsioides* exhibit an intermediate placement in the *Escovopsis* phylogeny, suggesting the putative reclassification of the genus *Escovopsioides* as *Escovopsis*. In addition, our study confirmed the antagonism of *Escovopsioides* towards the mutualistic fungus of leaf cutting ants (*Leucoagaricus gongylophorus*). This indicate that *Escovopsioides* is a mycoparasite of the ant fungal cultivar. Based in growth experiments of *Escovopsioides* in the fungus gardens, in the absence and in the presence of ant workers, we provide strong evidences of *Escovopsioides* parasitism in the fungus gardens of attini ants.

Keywords: Hypocreales. *Escovopsis*. Mycoparasitism. Attine ants. Biocontrol

Introdução

As formigas cultivadoras de fungos da tribo Attini são encontradas somente no continente americano (MAYHÉ-NUNES; JAFFÉ, 1998). Esses insetos se destacam pela habilidade de cultivar fungos como a principal fonte de alimento (WEBER, 1972). As formigas cortadeiras dos gêneros *Acromyrmex* e *Atta*, popularmente conhecidas como quenquéns e saúvas, compreendem um subgrupo das formigas atíneas. Elas apresentam como característica distintiva a utilização de folhas e flores frescas como substrato para o cultivo do fungo mutualista, *Leucoagaricus gongylophorus* (Basidiomycota: Agaricales). O parceiro fúngico, por sua vez, é cultivado pelas operárias em uma estrutura denominada de jardim de fungo, que compreende fragmentos do substrato vegetal processado pelas formigas e o micélio do fungo mutualista (WEBER, 1972; MUELLER et al., 2010). Devido à elevada quantidade de folhas que as formigas cortadeiras utilizam, esses insetos são considerados pragas agrícolas, ocasionando sérios prejuízos na agricultura, especialmente à de nosso país (DELLA LUCIA et al., 2014).

Ao contrário do proposto por Weber (1972), o fungo mutualista não é o único micro-organismo ativo no jardim de fungo. Na realidade uma diversa e rica comunidade microbiana constituída de bactérias, leveduras e fungos filamentosos também faz parte dos jardins de fungo (MÖLLER, 1893; CRAVEN et al., 1970; BACCI et al., 1995). Alguns desses micro-organismos podem competir por nutrientes com o fungo mutualista (SILVA et al., 2006); outros, parasitam o próprio fungo cultivado pelas formigas (REYNOLDS, CURRIE, 2004). Existem também aqueles micro-organismos benéficos nos jardins de fungo, os quais auxiliam o fungo mutualista na proteção frente a patógenos (SANTOS et al., 2004; RODRIGUES et al., 2009). Além disso, existem bactérias filamentosas do gênero *Pseudonocardia*, presentes nas cutículas das operárias, que também auxiliam na proteção da colônia frente a micro-organismos invasores (CURRIE et al., 1999a; SEN et al., 2009; MEIRELLES et al., 2014).

Currie e colaboradores (1999b) observaram que fungos do gênero *Escovopsis* (Ascomycota: Hypocreales) ocasionam um impacto negativo nas colônias das formigas atíneas, pois atuam como uma parasita no jardim de fungo. Tal descoberta se mostrou relevante, uma vez que não havia relatos de parasitas nos jardins desses insetos. É sabido que o parasitismo de *Escovopsis* é dá-se por mecanismos químicos e físicos, com estruturas especializadas para atuar nas hifas do hospedeiro (REYNOLDS, CURRIE, 2004; MARFETÁN et al., 2015).

Estudos sugerem que *Escovopsis* compartilha uma antiga história evolutiva com o fungo mutualista e as formigas, indicando que a origem do parasitismo ocorreu concomitante com início da associação formiga-fungo, há cerca de 50-65 milhões de anos (CURRIE et al., 2003; SCHULTZ; BRADY, 2008). Gerardo e colaboradores (2006) propuseram uma classificação

informal de diferentes tipos morfológicos de *Escovopsis*. Esta se baseia na coloração dos esporos, que em massa, produzem uma coloração típica da colônia. Tal marcador morfológico separa *Escovopsis* pertencentes aos diferentes clados filogenéticos (GERARDO et al., 2006). Assim, os autores descrevem *Escovopsis* com esporulação marrom, amarela, branca e rosa.

Recentemente, Augustin e colaboradores (2013) descreveram um segundo gênero de fungo (*Escovopsioides*) provenientes de jardins de *Acromyrmex niger*, *Acromyrmex subterraneus molestans* e *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. Esse fungo foi encontrado em 24% a 72% das colônias de atíneas amostradas (AUGUSTIN et al. 2013; REIS et al. 2015; PEREIRA et al. 2016). Tal fungo apresenta características morfológicas semelhantes aos fungos do gênero *Escovopsis* (Figura S1). Análises moleculares realizadas pelos autores comprovaram que *Escovopsioides* é um gênero filogeneticamente relacionado à *Escovopsis*.

A descoberta de *Escovopsioides* lançou novas janelas de pesquisas sobre a associação formiga – fungo mutualista. Primeiro, nada se conhece a respeito da diversidade e taxonomia de *Escovopsioides*. Até o momento, apenas uma espécie (*E. nivea*) foi descrita, porém, é provável que existam outras espécies desse gênero ainda desconhecidas para a ciência. Segundo, estudos de taxonomia e sistemática também são incipientes no que tange à classificação desse grupo. Terceiro, se *Escovopsioides* é um parasita do fungo mutualista, então novas oportunidades se abrirão para estudar a dinâmica da evolução (especificidade e virulência) de patógenos associados aos jardins das formigas atíneas.

Com a disponibilidade de vários isolados de *Escovopsioides* obtidos de diferentes formigas atíneas (gêneros *Atta*, *Acromyrmex*, *Trachymyrmex* e *Apterostigma*), o presente trabalho avaliou as seguintes questões: (i) Tendo em vista que o gênero *Escovopsioides* foi descrito de jardins de *Acromyrmex*, isolados desse fungo que infectam outros gêneros de atíneas formam um clado monofilético? (ii) Qual é a relação filogenética de *Escovopsioides* e *Escovopsis*? e (iii) *Escovopsioides* seria um parasita do jardim de fungo das formigas atíneas?

Considerações

Neste estudo foi apontado uma baixa diversidade genética entre os isolados de *Escovopsioides* de atíneas derivadas, mostrando uma distribuição ampla de *E. nivea* em diferentes atíneas de diferentes localidades. Em contrapartida, uma linhagem filogenética nova desse fungo foi descoberta nesse estudo. Considerando o posicionamento intermediário na filogenia de *Escovopsis*, torna-se necessária a reclassificação do gênero *Escovopsioides*; entretanto, outros marcadores moleculares devem ser analisados. Embora o atual estágio da taxonomia de *Escovopsioides* ainda não permita a clara distinção de *Escovopsis*, o presente estudo demonstrou que esse fungo é um antagonista do fungo cultivado pelas formigas atíneas.

Referências

AUGUSTIN, J. O.; GROENWALD, J. Z.; NASCIMENTO, R. J.; MIZBURTI, E. S. G.; BARRETO, R. W.; ELLIOT, S. L.; EVANS, H. C. Yet more "weeds" in the gardens: fungal novelties from nests of leaf-cutting ants. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 9, p. e82265, 2013.

BACCI JR, M.; ANVERSA, M.M.; PAGNOCCA, F.C. Cellulose degradation by *Leucocoprinus gongylophorus*, the fungus cultivated by leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.67, n.4, p.385-386, 1995.

CRAVEN, S.E.; DIX, M.W.; MICHAELS, G.E. Attini fungus gardens contains yeasts. **Science**, Washington, v.169, p.184-186, 1970

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

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

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

CURRIE, C. R.; WONG, B.; STUART, A. E.; SCHULTZ, T. R.; REHNER, S. A.; MUELLER, U. G.; SUNG, GI-HO; SPATAFORA, J. W.; STRAUS, N. A. Ancient tripartite coevolution in the Attine ant-microbe symbiosis. **Science**, Washington, v. 299, n. 5605, p. 386-388, 2003.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, New York, v. 9, n. 8, p. 772-772, 2012.

DELLA LUCIA, T. M. C.; GANDRA, L. C.; GUEDES, R. N. M. C. Managing leaf-cutting ants peculiarities, trends and challenges. **Pest Management Science**, Sussex, v. 70, n. 1, p. 14-23, 2014.

GERARDO, N. M.; CURRIE, C. R.; PRICE, S. L.; MUELLER, U. G. Exploiting a mutualism: parasite specialization on cultivars within the fungus-growing ants symbiosis. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, London, p. 1791-1798, 2004.

GERARDO, N. M.; JACOBS, S. R.; CURRIE, C. R.; MUELLER, U. G. Ancient host-pathogen associations maintained by specificity of chemotaxis and antibiosis. **Plos Biology**, San Francisco, v. 4, n. 8, e 235, 2006.

GRUBER, S; SEIDL-SEIBOTH, V. Self versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. **Microbiology**, Reading, v.158, 26-34, 2012.

HAIFIG, S. S. V. **A natureza do parasitismo de Escovopsis sp. e Escovopsioides sp. sobre Leucoagaricus gongylophorus, fungos associados aos jardins de formigas cortadeiras**. 61f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2014.

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, s/n, p. 95-98, 1999.

KATOH, K., STANDLEY, D. M. Mafft Multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.30, n.4. p.772-780, 2013.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 16, n. 2, p. 111–120, 1980.

MARFETÁN, J.A.; ROMERO, A.I.; FOLGARAIT, P.J. Pathogenic interaction between *Escovopsis weberi* and *Leucoagaricus* sp.: mechanisms involved. **Fungal Ecology**, Exeter, v.17, p.52-61, 2015.

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 attini ant *Mycocepurus goeldii*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.107, n.3, p.731-40, 2015.

MAYHÉ-NUNES, A.J. & K. JAFFÉ. 1998. On the biogeography of Attini (Hymenoptera: Formicidae). **Ecotropicos**. Caracas, v.11, n.1, p.45-54.

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.

MEIRELLES, L.A.; MONTTOYA, 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**, San Francisco, v.10, n.1, 2015a.

MEIRELLES, L.A.; SOLOMON, S.E.; BACCI JR, M.; WRIGHT, A.M.; MUELLER, U.G.; RODRIGUES, A. Shared *Escovopsis* parasites between leaf cutting and non- leaf-cutting ants in the higher attini fungus-growing ant symbiosis. **Royal Society Open Science**. London, v.2:150257, 2015b.

MÖLLER, A. Die Pilzgärten einiger südamerikanischer Ameisen. **Botanische Mitteilungen aus den Tropen**, Jena, v.6, p. 1–127, 1893

MUELLER, U. G.; SCOTT, J. J.; ISHAK, H. D.; COOPER, M.; RODRIGUES, A. Monoculture of leaf cutter ant gardens. **Plos One**, San Francisco, v. 5, n. 9, p. e12668, 2010.

NEWMAYER, D.. Filtering small quantities of conidial suspensions to remove mycelial fragments. **Fungal Genetics Newsletter**, Manhattan, v.37,n. 27. 1990.

PEREIRA, J. S. **Comunidades de fungos em jardins de formigas cortadeiras com diferentes hábitos de forrageamento**. 2014. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2014.

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

REIS, B.M.S.; SILVA, A.; ALVAREZ, M.R.; OLIVEIRA, T.B.; RODRIGUES, A. Fungal communities of the leaf cutter ant *Atta cephalotes* in forest and cabruca agrosystems of Southern Bahia State (Brazil). **Fungal Biology**, Oxford, v.119, n.12, p.1170-1178, 2015.

- RODRIGUES, A.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; PFENNING, L. H.; BACCI JR., M. Assessment of Microfungi in Fungus Gardens Free the Leaf-Cutting Ant *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera : Formicidae). **Sociobiology**, Chico, v.46, n.2, 2005.
- RODRIGUES, A.; BACCI JR., M.; MUELLER, U.G.; ORTIZ, A.; PAGNOCCA, F.C. Microfungal weeds in the leaf-cutter ant symbiosis. **Microbial Ecology**, New York, v.56, n.4, p.604-614, 2008.
- RODRIGUES, A.; CABLE, R.N.; MUELLER, U.G.; BACCI, M.; PAGNOCCA, F.C. Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungal garden pathogens of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.96, n.3, p.333-342, 2009.
- RODRIGUES, A.; SILVA, A.; BACCI JR, M.; FORTI, L.C.; PAGNOCCA, F.C. Filamentous fungi found on foundress queens of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Applied Entomology**. Berlin, v.134, n.4, p.342-345, 2010.
- RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, Oxford, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.
- RASBAND, W. S. **ImageJ**, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, , <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method - a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.
- SANTOS, A.V.; DILLON, V.M.; REYNOLDS, S.E.; SAMUELS, R.I. Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.239, n.2, p.319-323, 2004.
- SCHULTZ, T. R.; BRADY, S. G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 105, n. 14, p. 5435-5440, 2008.
- SCHULTZ, T.R.; SOSA-CALVO, J.; LOPES, C.T.; MUELLER, U.G.; BACCI JR, M.; VASCONCELOS, H.L. The most relictual fungus-farming ant species cultivates the most recently evolved and highly domesticated fungal symbiont species. **The American Naturalist**, Chicago, v.185, n.5, p.693-703, 2015.
- SCOTT, J.J.; BUDSBERG, K.J.; SUEN, G.; WIXON, D.L.; BALSER, T.C.; CURRIE, C.R. Microbial community structure of leaf-cutter ants fungus gardens and refuse dumps. **Plos One**, San Francisco, v.5, n.3, p.e9922, 2010.
- SEN, R.; ISHAK, H. D.; ESTRADA, D.; DOWD, S. E.; HONG, E.; MUELLER, U. G. Generalized antifungal activity and 454-screening of *Pseudonocardia* and *Amycolatopsis* bacteria in nests of fungus-growing ants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 106, n. 42, p. 17805-17810, 2009.
- SILVA, A.; RODRIGUES, A; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; BACCI JR., M. Susceptibility of ant-cultivated fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Agaricales: Basidiomycota) towards microfungi. **Mycopathologia**, Haia, v.162, p. 115-119, 2006.

TAERUM, S. J.; CAFARO, M. J.; LITTLE, A. E. F.; SCHULTZ, T. R.; CURRIE, C. R. Low host-pathogen specificity in the leaf-cutting ant-microbe symbiosis. **Proceedings of The Royal Society B-Biological Sciences**, London, v. 274, n. 1621, p. 1971-1978, 2007.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.30, p.2725, 2013

WALLACE, D.E.; ASENSIO, J.G.; TOMÁS, A.A. Correlation between virulence and genetic structure of Escovopsis strains from leaf-cutting ant colonies in Costa Rica. **Microbiology**, Reading, v.160, n.8, 2015.

WEBER, N. A. **Gardening ants: The Attines**. Philadelphia: American Philosophical Society, v. 92, 1972, 146 p.

WILSON, E.O. Caste and division of labor in leaf cutter ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v.7, n.2, p.143-156, New York, 1980.

ZHANG, Z.; SCHAWARTZ, S.; WAGNER, L.; MILLER, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **Journal of Computational Biology**, New York, v. 7, n.1-2, p. 203-14, 2000.