

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 05/08/2018.

**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
Biotecnologia 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.

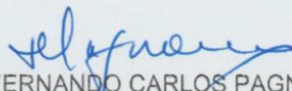
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: ANA PAULA MIRANDA DUARTE TOLEDO

ORIENTADOR: FERNANDO CARLOS PAGNOCCA

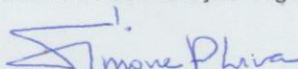
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:



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



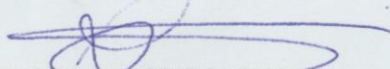
Prof. Dr. LUIZ CARLOS FORTI
Departamento de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu



Profa. Dra. SIMONE POSSELENTE 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 nº 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 contém 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 <i>Formigas-cortadeiras</i>	18
2.2.2 <i>Relações com outros micro-organismos</i>	19
2.2.3 <i>Presença de fungos negros no ambiente das formigas</i>	21
2.2.4 <i>Características dos fungos negros</i>	22
2.3 Materiais e Métodos	23
2.3.1 <i>Local e coleta das formigas</i>	23
2.3.2 <i>Métodos de isolamento</i>	23
2.3.3 <i>Preservação dos fungos isolados</i>	25
2.3.4 <i>Extração de DNA dos fungos</i>	25
2.3.5 <i>Amplificação (PCR)</i>	25
2.3.6 <i>Sequenciamento</i>	26
2.3.7 <i>Análises morfológicas do inventário de fungos negros</i>	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 <i>Cladosporium</i> 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 <i>Study site and sampling</i>	118
3.4.2 <i>Molecular analysis</i>	119
3.4.3 <i>Bioinformatics and data analysis</i>	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 <i>Isolation techniques</i>	145
4.3.2 <i>Fungal isolates</i>	146
4.3.3 <i>DNA extraction</i>	146
4.3.4 <i>Multi-locus PCR amplification and sequencing</i>	146
4.3.5 <i>Alignment and phylogenetic reconstruction</i>	147
4.3.6 <i>Morphology</i>	151
4.4 Results	151
4.4.1 <i>Phylogeny</i>	151
4.4.2 <i>Taxonomy</i>	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 <i>Microorganisms selection</i>	188
5.3.2 <i>DNA extraction and sequencing</i>	188
5.3.3 <i>Bioassay challenges</i>	189
5.4 Results	189
5.4.1 <i>Actinobacteria and black fungi identification</i>	189
5.4.2 <i>Antagonism against black fungi</i>	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

obtem 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 microbiota 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.; GUÛSCHOW, 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 Mitteilungen 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* (Symptoventuriaceae). **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**, Whashington, 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.

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.