



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

**LEVEDURAS ISOLADAS DE NINHOS DE FORMIGAS DA TRIBO ATTINI
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**

TATIANA DE FREITAS COSTA DE CARVALHO

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

Março - 2010

TATIANA DE FREITAS COSTA DE CARVALHO

**LEVEDURAS ISOLADAS DE NINHOS DE FORMIGAS DA TRIBO ATTINI
(HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências do Campus
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. Fernando Carlos Pagnocca

Rio Claro
2010



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE RIO CLARO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE RIO CLARO

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Leveduras associadas às formigas da tribo attini (Hymenoptera:Formicidae)

AUTORA: TATIANA DE FREITAS COSTA DE CARVALHO

ORIENTADOR: Prof. Dr. FERNANDO CARLOS PAGNOCCA

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

Prof. Dr. FERNANDO CARLOS PAGNOCCA

Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências de Rio Claro

Profa. Dra. DERLENE ATTILI DE ANGELIS

Centro de Estudos de Insetos Sociais - CEIS - UNESP - Rio Claro

Profa. Dra. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

Departamento de Tecnologia Agro-Industrial e Sócio-Economia Rural / Centro de Ciências Agrárias / UFSCAR

Data da realização: 17 de junho de 2010.

*Dedico este trabalho a Deus, a minha família e a meus amigos
que me acompanharam na realização deste sonho.*

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer a Deus por ter, num espaço e tempo imensurável, me dado a oportunidade de ter nascido e estar vivendo neste momento, de ter me abençoado com uma família maravilhosa e estar sempre rodeada de pessoas incríveis. A Ele, agradeço por este trabalho.

Agradeço a meus pais, Eloísa e Sergio, que sempre me apoiaram, pela educação que me proporcionaram, pelo amor incondicional, carinho, pela compreensão, mesmo nos momentos difíceis de serem compreendidos, e pelo respeito. Sem essa base essencial, não estaria realizando essa dissertação.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca, agradeço imensamente por ter me acolhido em seu laboratório, mesmo não me conhecendo. Agradeço pela orientação, por me fazer pensar cientificamente, por ter confiado no meu trabalho e, principalmente, pelo seu entusiasmo, dedicação e pelo grande interesse nessa área.

Agradeço ao Pós-doutorando Andre Rodrigues pelos conselhos, pelas opiniões que me proporcionaram novas idéias, pelo interesse, ao apoio quando demonstrei minhas fraquezas e, principalmente, a amizade.

Agradeço a Prof^a Dr^a Derlene Attili pelas opiniões construtivas, pelas “dicas”, amizade e também pelo papel (muito bem exercido) de “segunda mãe”, já que quando me esquecia de fazer uma pausa para lanchar, algumas vezes de madrugada, ela (ou o Abel, seu marido) levava “lanchinhos” sempre bem-vindos.

Agradeço em especial a minha irmã, Gabriela, aos meus avós, tios e primos, pelo amor, pelo interesse em saber um pouco mais sobre o meu trabalho e, principalmente, por compreenderem algumas ausências minhas em reuniões de família. Infelizmente, não somos onipresentes.

A minha amiga Paula Sanchez, agradeço por estar sempre comigo, desde o princípio. Só nós sabemos o quão foi difícil e o quanto aprendemos. Ao meu amigo Fábio Lúcio (Fabiolo), agradeço imensamente pela ajuda na preparação das amostras em algumas madrugadas.

Agradeço a todos os meus amigos do laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos de Insetos Sociais: Thais, Aline Cruz, Castanha, Virginia, Ife, Mara, Liu, Weilan, Dirce, Silvio, Lucas, Ana Paula e Noemi pelo companheirismo, pelas risadas, enfim, por tornarem nosso ambiente de trabalho mais agradável.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Área Microbiologia Aplicada) da UNESP (Rio Claro), agradeço pela oportunidade concedida. Também agradeço aos amigos da Pós-graduação pela companhia durante as aulas e, também, na organização do Simpósio de Microbiologia Aplicada.

Agradeço à CAPES pela concessão da bolsa e à FAPESP e INCT/CNPQ pelo auxílio financeiro deste trabalho.

Aos meus amigos de Rio Claro, Denny (sempre companheiro), Otávio (amigo de Francês e personal chef preferido) e a minha professora de dança Analú, agradeço por me proporcionarem grandes alegrias, tornando minha estada nesta cidade mais divertida.

Aos meus melhores e velhos amigos: Eduardo Peter, pelo companheirismo, pelo amor que sabe demonstrar melhor do que ninguém, por ter me ajudado “n” vezes, por estar sempre me aconselhando e por me ensinar a parar um pouquinho e filosofar sobre a vida; Patrick Deschamps, pelas risadas, por estar sempre por perto, me acolher, tentar me entender e, principalmente, por me deixar sempre mais feliz; Bia Ochandio, pelo interesse demonstrado pelo meu trabalho, pela amizade e por me visitar aqui em Rio Claro sempre que possível; Manoela e Maíra, mesmo distantes fisicamente, são elas que me escutam e dão conselhos em minha vida pessoal. Essas pessoas que eu tanto amo, fazem parte da família que eu pude construir durante a minha vida, e as levarei comigo pra onde eu for.

Não posso deixar de agradecer à Nicole, minha cachorra que eu tanto amo, pelo carinho, conforto, por me escutar, pelas longas caminhadas, por fazer da minha chegada em Sorocaba, aos finais de semana, um evento muito importante, correndo sempre ao meu encontro, me dando lambidas e arranhões doloridos e, principalmente, por ser tão leal.

“A coisa mais bela que podemos experimentar é o mistério. Essa é a fonte de toda a arte e ciências verdadeiras”.
Albert Einstein

“On écrit toujours pour donner la vie, pour libérer la vie là où elle est emprisonnée, pour tracer des lignes de fuite”.
Gilles Deleuze

RESUMO

A simbiose entre as formigas Attini e o fungo cultivado permitiu a expansão das suas colônias e a utilização dos fungos como parte da dieta alimentar dos adultos e como principal alimento das larvas. Em troca, as formigas suprem os fungos com substrato vegetal, dão abrigo, os dispersam para novas localidades e oferecem proteção contra seus predadores e patógenos. Apesar dos diversos mecanismos para manter o ninho livre de outros micro-organismos, bactérias, leveduras e fungos filamentosos podem ser encontrados. Na literatura, há pouca informação sobre a presença e o papel biológico das leveduras em ninhos de Attini. Portanto, neste trabalho a ênfase foi isolar e identificar as leveduras encontradas em jardins de fungo e em alguns materiais de descarte de ninhos de Attini. Esta abordagem permitiu a criação de um banco de estirpes específico que deverá ser utilizado em outras pesquisas que possam possibilitar uma análise mais aprofundada sobre a participação delas na simbiose. Foram analisados quarenta e quatro ninhos pertencentes a espécies de Attini de sete gêneros distintos, a saber: *Mycocepurus*, *Myrmicocrypta*, *Mycetophylax*, *Sericomyrmex*, *Trachymyrmex*, *Acromyrmex* e *Atta*. Deles, foi isolado um total de cento e cinquenta e duas estirpes, distribuídas em trinta e três espécies, as quais foram identificadas por análises morfológicas, fisiológicas e pelo sequenciamento dos domínios D1/D2 da região 26S do rDNA; contudo, em alguns casos, foi necessário sequenciar a região ITS. A espécie mais encontrada nos ninhos de *Mycocepurus goeldii*, *Trachymyrmex* sp e *Acromyrmex* sp foi *Pichia guilliermondii*, prevalente nos ninhos dos dois últimos gêneros. Houve predominância das espécies *Pichia caribbica* e *Candida railenensis* no único ninho de *Myrmicocrypta* sp e de *Cryptococcus flavescens* nos ninhos de *Atta sexdens rubropilosa*. Observamos também a dominância de basidiomicetos em ninhos de Attini cortadoras de folhas (*Atta* spp e *Acromyrmex* spp). Representantes dos gêneros *Moniliella*, *Torulaspora*, *Zygoascus* e *Asterotremella* não haviam sido descritos em associação com ninhos de formigas Attini até o presente trabalho. Outro dado interessante foi o isolamento de representantes de interesse clínico, como *Trichosporon coremiiforme*, *Trichosporon loubieri*, *Asterotremella humicola*, *Trichosporon mycotoxinivorans*, *Cryptococcus flavescens*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Zygoascus hellenicus*. Concluímos que os jardins de fungo de ninhos de Attini são um ambiente propício para desenvolvimento de leveduras. Muitas vezes eles possuem espécies ainda não conhecidas, como foi o caso das estirpes TT12 e TD49, representantes de novas espécies nos gêneros *Candida* e *Sporobolomyces*, respectivamente.

Palavras chave: formigas da tribo Attini, simbiose, jardim de fungo, leveduras, diversidade.

ABSTRACT

The symbiosis between the Attini ants and their cultivated fungi allowed the expansion of their colonies as well as the use of fungi as part of the adults' diet and the main food of the larvae. In return, the ants supply the fungi with plant substrates, provide shelter, disperse the fungi to new locations and offer protection against predators and pathogens. Although several mechanisms to keep the nest free of other microorganisms, several bacteria, yeasts and filamentous fungi can be found. In literature, there is little information about the presence and biological role of yeasts in Attini nests, therefore, the emphasis of this study was to isolate and identify yeasts in fungus gardens and in some waste deposits of Attini ants. This approach permitted a database creation of specific strains which can be used in other researchs that may facilitate a deeper analysis about their participation in symbiosis. Forty-four nests of seven different attine genera were analyzed, which are: *Mycocepurus*, *Myrmicocrypta*, *Mycetophylax*, *Sericomyrmex*, *Trachymyrmex*, *Acromyrmex* e *Atta*. A total of one hundred and fifty-two strains were isolated, belonging to thirty-three yeasts species, wich were identified by morphological and physiological analysis and the D1/D2 domains of the nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA were sequenced; however, in some cases, it was necessary to identify the ITS region of the ribosomal DNA. *Pichia guilliermondii* was the most dominant specie encountered in nests of *Mycocepurus goeldii*, *Trachymyrmex* sp and *Acromyrmex* sp, with prevalence in the nests of the last two genera. *Pichia caribbica* and *Candida railenensis* predominated in the single *Myrmicocrypta* sp nest studied while *Cryptococcus flavescens* dominated in the *Atta sexdens rubropilosa* nests. It was observed that basidiomycete yeasts were most associated with leaf-cutting ant nests. The genera *Moniliella*, *Torulaspora*, *Zygoascus* and *Asterotremella* had not been reported in the attine ant nests up to the present. Another interesting observation was the isolation of clinical strains, such as *Trichosporon coremiiforme*, *Trichosporon loubieri*, *Asterotremella humicola*, *Trichosporon mycotoxinivorans*, *Cryptococcus flavescens*, *Rhodotorula mucilaginosa* and *Zygoascus hellenicus*. We conclude that fungus garden of attine nests is a suitable microenvironment for yeast development. Sometimes within the fungus garden we can find undescribed species such as the case of strains TT12 and TD49, both being representatives of putative new species in the genera *Candida* and *Sporobolomyces*, respectively.

Keyword: Attini ants, symbiosis, fungus garden, yeast, diversity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 As formigas Attini.....	13
2.2 As formigas Attini e a simbiose com fungos	15
2.3 Attini estudadas	17
2.3.1. Paleoattini	17
2.3.1.1. Gênero <i>Mycocepurus</i>	17
2.3.1.2. Gênero <i>Myrmicocrypta</i>	18
2.3.2. Neoattini.....	19
2.3.2.1. Neoattini basal	19
2.3.2.1.1. Gênero <i>Mycetophylax</i>	19
2.3.2.2. Neoattini superiores não cortadoras e cortadoras de folhas	20
2.3.2.2.1. Gênero <i>Sericomyrmex</i>	21
2.3.2.2.2. Gênero <i>Trachymyrmex</i>	21
2.3.2.2.3. O gênero <i>Acromyrmex</i>	22
2.3.2.2.4. O gênero <i>Atta</i>	23
2.4. As Attini e sua associação com outros micro-organismos.....	25
2.5. Leveduras – Ecologia e Distribuição	27
2.6. Leveduras no contexto da simbiose das formigas cultivadoras de fungos.....	31
3. OBJETIVOS.....	35
3.1. Objetivo geral.....	35
3.2. Objetivos específicos.....	35
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1. Coleta das formigas.....	36
4.2. Isolamento e manutenção das leveduras	39
4.3. Caracterização das leveduras utilizando critérios morfológicos e fisiológicos.....	40
4.4. Caracterização por métodos moleculares	41
4.4.1. Extração de DNA genômico	41
4.4.2. Agrupamento das estirpes por MSP-PCR.....	41
4.4.3. Amplificação – PCR.	42
4.4.4. Purificação dos produtos de amplificação	43
4.4.5. Amplificação e Purificação da reação de sequenciamento	43
4.4.6. Aplicação das amostras no gel de poliacrilamida	44
4.4.7. Outros marcadores de rDNA	44
4.5. Análise estatística.....	44
4.6. Análise filogenética.....	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1. Leveduras associadas a ninhos de Paleoattini	46
5.1.1. Leveduras associadas a ninhos de <i>Mycocepurus goeldii</i>	46
5.1.2. Leveduras associadas ao jardim de fungo de ninho de <i>Myrmicocrypta</i> sp.....	51
5.2. Leveduras associadas a ninhos de Neoattini	52
5.2.1. Neoattini basal	52
5.2.1.1. Leveduras associadas a ninhos de <i>Mycetophylax morschi</i> e <i>M. simplex</i>	52
5.2.2. Superiores não cortadoras de folhas	53
5.2.2.1. Leveduras associadas a ninhos de <i>Sericomyrmex</i> sp	53
5.2.2.2. Leveduras associadas a ninhos de <i>Trachymyrmex</i> sp	54

5.2.3. Neoattini cortadoras de folhas	58
5.2.3.1. Leveduras associadas a ninhos de <i>Acromyrmex</i> sp.....	58
5.2.3.2. Leveduras associadas a ninhos de formigas do gênero <i>Atta</i>	59
5.2.3.2.1. <i>Atta sexdens rubropilosa</i>	59
5.2.3.2.2. <i>Atta bisphaerica</i> e <i>Atta capiguara</i>	61
5.3. Composição das espécies representantes dos isolados de leveduras dos ninhos das diferentes Attini.....	62
6. CONCLUSÕES	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
8. APÊNDICE	87

1. INTRODUÇÃO

As formigas da tribo Attini são as únicas capazes de cultivar seu próprio alimento. O mutualismo entre essas formigas e seus fungos permitiu a expansão das colônias e a utilização dos fungos como parte da dieta alimentar dos adultos e como principal alimento das larvas. Em troca, as formigas suprem os fungos com substrato vegetal, dão abrigo, os dispersam para novas localidades e oferecem proteção contra seus predadores e patógenos.

Apesar dos diversos mecanismos para manter seus ninhos livres de outros micro-organismos, bactérias, leveduras e fungos filamentosos podem ser encontrados. Dentre os parasitas que mais ameaçam o jardim de fungo e diminuem o crescimento das colônias encontram-se as espécies de fungos do gênero *Escovopsis*, um possível micoparasita, já que obtêm nutrientes do micélio do fungo mutualista dessas formigas. Outro protagonista que, possivelmente, também atua nesta simbiose, é uma bactéria filamentosa, actinomiceto do gênero *Pseudonocardia*, a qual produz antibióticos capazes de inibir o crescimento do *Escovopsis*.

Apenas alguns poucos estudos foram realizados em relação a presença de leveduras nesse micro-ambiente (ninho). Neles, poucas espécies de Attini foram analisadas e, portanto ainda existem muitas questões em aberto. Por exemplo, ainda pouco se sabe sobre a diversidade das espécies e sobre uma eventual participação desse grupo de micro-organismos na simbiose. Os estudos até o momento realizados permitiram supor que as leveduras estejam participando positivamente nessa simbiose, já que foi observada a produção de enzimas hidrolíticas capazes de degradar substratos presentes no material vegetal levado para o interior dos ninhos, podendo gerar compostos mais assimiláveis pelas formigas. Possivelmente, as leveduras também podem estar detoxificando o ninho, pois foi observada também a utilização de ácido galacturônico por leveduras, composto presente nos ninhos que é tóxico tanto para a formiga quanto para o fungo mutualista. Somado a esse papel benéfico, algumas leveduras podem secretar toxinas killer (micocinas), as quais inibiram o crescimento de outras leveduras isoladas do mesmo ambiente, sugerindo a existência de um mecanismo de controle da população das leveduras e de outros micro-organismos através das micocinas. Esses micro-organismos, também, podem exercer um papel protetor, uma vez que fora observado o antagonismo de algumas espécies desse micro-organismo em relação ao fungo parasita *Escovopsis*.

Neste trabalho, procuramos contribuir para o conhecimento da biodiversidade de leveduras associadas às Attini, à riqueza de espécies presentes e também para o

enriquecimento do acervo de coleções de culturas microbianas. Procuramos concentrar nossos estudos nas espécies de *Attini* que ainda não haviam sido analisadas sob esses aspectos. A partir deste inventário, muitas das estirpes obtidas poderão servir em futuro próximo para outras pesquisas, nas quais as leveduras têm importante papel, como, por exemplo, na indústria de alimentos, em estudos de biorremediação, na decomposição de lixo orgânico, além de serem empregadas também na adsorção de metais e no controle biológico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 As formigas Attini

Poucos animais desenvolveram a habilidade de cultivar o seu próprio alimento (MUELLER, 2002) como as formigas, cupins e besouros, e, também, o homem, que exercem, independentemente, essa aptidão (MUELLER; GERARDO, 2002). Algumas formigas compartilham com térmitas e, possivelmente, com os besouros, o sofisticado hábito de cultivar e alimentar-se de fungos (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Essas formigas estão incluídas na tribo Attini (MAYÉ-NUNES; JAFFÉ, 1998).

Pertencente à família Formicidae e sub-família Myrmicinae, a tribo de formigas Attini compreende 15 gêneros - *Atta*, *Acromyrmex*, *Pseudoatta*, *Trachymyrmex*, *Sericomyrmex*, *Mycetarotes*, *Myrmicocrypta*, *Mycocepurus*, *Apterostigma*, *Cyphomyrmex*, *Mycetosoritis*, *Mycetophylax*, *Paramycetophylax*, *Kalathomyrmex* e *Mycetagroicus* (SCHULTZ; MEIER, 1995; BRANDÃO; MAYÉ-NUNES, 2002; KLINGENBERG; BRANDÃO, 2009) com mais de 230 espécies descritas (SCHULTZ; BRADY, 2008).

Schultz e Brady (2008) dividiram a tribo Attini, recentemente, em cinco grupos biologicamente distintos, baseados em dados do sequenciamento de quatro genes nucleares que codificam proteínas e em informações da filogenia molecular do primeiro fóssil calibrado preservado em âmbar para as formigas dessa tribo (Tabela 1).

Tabela 1 – Divisão dos gêneros das Attini segundo Schultz e Brady (2008) e adaptado de Klingenberg e Brandão (2009)

Grupo	Gêneros de Attini	Fungo cultivado
Attini basal	<i>Mycocepurus</i> , <i>Myrmicocrypta</i> , <i>Mycetosoritis</i> , <i>Mycetophylax</i> , <i>Kalathomyrmex</i> , <i>Paramycetophylax</i> , <i>Mycetarotes</i> , <i>Apterostigma</i> grupo <i>auriculatum</i> e de <i>Cyphomyrmex</i> grupo <i>strigatus</i>	Fungo da tribo Leucocoprineae
Attini cultivadoras de fungos corais	Subdivisão do gênero <i>Apterostigma</i> grupo <i>pilosum</i>	Fungo da tribo Pterulaceae
Attini cultivadoras de leveduras	Subdivisão do gênero <i>Cyphomyrmex</i> grupo <i>rimosus</i>	Fungo da tribo Leucocoprineae que cresce morfológicamente como levedura quando associado a essas Attini
Attini superiores	<i>Trachymyrmex</i> e <i>Sericomyrmex</i>	Fungo da tribo Leucocoprineae, o qual produz gongilídeos (MUELLER et al., 2001)
Attini cortadoras de folhas	<i>Atta</i> , <i>Pseudoatta</i> e <i>Acromyrmex</i>	Fungo da tribo Leucocoprineae derivado do fungo cultivado pelas Attini superiores

O artigo de Schultz e Brady (2008) mostrou a presença de duas clades de Attini que divergiram durante a evolução. A mais antiga, Palleoatini, compreende os gêneros *Mycocepurus*, *Myrmicocrypta* e *Apterostigma*, os quais possuem uma característica peculiar: uma mancha clara na asa das fêmeas, cuja função biológica é desconhecida. A clade mais recente é a Neoattini, a qual teve três sucessivas divergências. A mais basal é composta pelos gêneros *Mycetophylax*, *Mycetarotes*, *Mycetasoritis* e *Cyphomyrmex*, o segundo grupo é de transição, ao qual pertencem as Attini superiores não cortadoras de folhas, *Mycetagroicus*, *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex*, que possivelmente deram origem ao grupo mais derivado, o qual compreende as Attini superiores cortadoras de folhas, constituído pelos gêneros *Acromyrmex* e *Atta*.

As espécies do grupo *rimosus* de *Cyphomyrmex* e do gênero *Mycetagroicus* pertencem a linhagens que divergiram durante a transição das Attini basais para as Attini superiores; portanto, estudos biológicos desses grupos prometem esclarecer a seqüência dessa transição (SCHULTZ; BRADY, 2008).

Exclusivas da América, distribuindo-se desde o sul da América do Norte até o sul da América do Sul (WEBER, 1972; SCHULTZ; BRADY, 2008) em grande concentração na Floresta Amazônica (MAYÉ-NUNES; JAFFÉ, 1998), essas formigas cultivadoras de fungos estão entre as principais pragas da agricultura brasileira (BORBA et al., 2006).

Os ninhos das Attini consistem em formigas e jardins de fungos que são encontrados em uma ou mais câmaras, dependendo do gênero. As basais são caracterizadas por apresentarem colônias de tamanho muito pequeno, com exceção do gênero *Myrmicocrypta*, que apresenta colônias maiores. Já as Attini superiores, cortadoras e não cortadoras de folhas, apresentam grandes colônias, sendo o gênero *Atta* o que apresenta os maiores ninhos dentro da tribo (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

As Attini possuem castas distintas de operárias e indivíduos reprodutores (fêmeas e machos). As operárias são fêmeas, porém não possuem a capacidade de reprodução. Essas, na maioria dos gêneros, são monomórficas tendo pouca variedade de tamanho entre elas. Porém, *Atta* e *Acromyrmex* possuem o grau máximo de polimorfismo dentre os outros gêneros. Essa diferença de tamanho tem uma correlação com as tarefas realizadas dentro e fora do ninho, sendo, por isso, considerada uma forma avançada de organização social. No caso das *Atta*, as maiores operárias, denominadas soldados, possuem como função primária a proteção da colônia contra predadores e objetos perturbadores. As operárias médias fazem todo o trabalho de cortar e transportar folhas e outros pedaços grandes de substratos como também remover o

substrato antigo e as formigas mortas do ninho. As pequenas são consideradas as mais importantes, pois cuidam da ninhada e do jardim de fungo, transportando também pequenos fragmentos de substratos e as operárias pequenas mortas (WEBER, 1972).

Já as fêmeas reprodutoras são aladas quando encontradas no ninho parental e tornam-se rainhas funcionais, perdendo suas asas, após a fundação do novo ninho. Os machos, aparentemente, só fertilizam as fêmeas no vôo nupcial e possuem vida curta, além de não participarem de nenhum trabalho dentro ou fora da colônia (WEBER, 1972).

2.2. As formigas Attini e a simbiose com fungos

A simbiose entre as formigas Attini e seus fungos possui aproximadamente 50 milhões de anos (SCHULTZ; BRADY, 2008). Esse cultivo permitiu-as expandir o tamanho de suas colônias, e algumas são os maiores ninhos de formigas conhecidas, possuindo milhões de indivíduos (WEBER, 1972).

Os fungos da tribo Leucocoprineae, decompositores de serrapilheira e cultivados pela tribo Attini são abundantes nos trópicos e, provavelmente por isso, sua domesticação pelas Attini foi facilitada (MUELLER et al., 2001).

O jardim de fungo é composto por micélio, normalmente, dominado por um único clone de fungo mutualista (WEBER, 1972; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990; POULSEN; BOOMSMA, 2005) e fragmentos de material vegetal ou animal que servem de substrato para o fungo. As formigas utilizam o fungo como uma parte da dieta alimentar dos adultos e como principal alimento das larvas, sendo, por essa razão, dependentes obrigatórias (MUELLER; GERARDO, 2002). Em troca, neste mutualismo obrigatório, as formigas suprem os fungos com substrato vegetal, oferecem proteção contra fungívoros e patógenos, dão abrigo (CURRIE; MUELLER; MALLOCH, 1999) e os dispersam para novas localidades (CURRIE; STUART, 2001).

De acordo com Mueller et al. (2001), há dois principais modelos da co-evolução das Attini e seus fungos mutualistas. O modelo mais tradicional descreve que os fungos, primeiramente, fizeram parte da dieta alimentar das formigas. Posteriormente, as formigas desenvolveram a habilidade de cultivar esse fungo e, finalmente, desenvolveram um mecanismo de transmitir o fungo entre as gerações. O segundo modelo de co-evolução sugere que as formigas foram utilizadas pelos fungos como vetores para sua dispersão. Nessa relação, os fungos tornaram-se parte da dieta alimentar das formigas, e então, estas passaram a cultivá-los.

A exata natureza dessa simbiose ancestral está difícil de ser concluída devido ao tempo e à diversificação desde a sua origem. Sabe-se, contudo, que o sucesso dessa associação dependeu da habilidade das formigas em protegerem os seus jardins de fungos, impossibilitando o crescimento excessivo de micro-organismos associados com o material vegetal que as operárias levam, constantemente, para o jardim (CURRIE; MUELLER; MALLOCH, 1999; CURRIE; STUART, 2001).

Várias hipóteses sobre a origem da associação entre as formigas Attini e seus fungos foram propostas por Mueller et al. (2001), como: (i) a hipótese do alimento armazenado, (ii) dos fungos crescendo nas paredes do ninho, (iii) da madeira em decomposição, (iv) das micorrizas, (v) dos cadáveres de artrópodes, (vi) do fluido fecal das formigas e (vii) dos pellets fúngicos infrabucais.

De acordo com Borba et al. (2006), essas formigas são “verdadeiras agricultoras”, pois são capazes de manipular o fungo sobre o substrato vegetal para otimizar o seu crescimento. As Attini têm capacidade de investir intensivamente no monitoramento de seus jardins, pois possuem uma casta de trabalhadores inférteis, que dedicam grande parte de seu tempo a esse monitoramento (MUELLER, et al., 2005).

Para começar um novo ninho, a rainha jovem carrega consigo, em sua cavidade infrabucal, uma porção do fungo retirada de seu ninho ancestral. Após o vôo nupcial, no qual ela é fertilizada, retorna ao solo, retira suas asas e procura o local ideal para escavar, expelindo o fungo no solo (Figura 1) (MUELLER, 2002). Essa transmissão vertical de clones do fungo do ninho ancestral faz com que a rainha não perca recursos na busca por um novo jardim de fungo durante o período crítico da construção de seu novo ninho (MIKHEYEV; MUELLER; BOOMSMA, 2007).

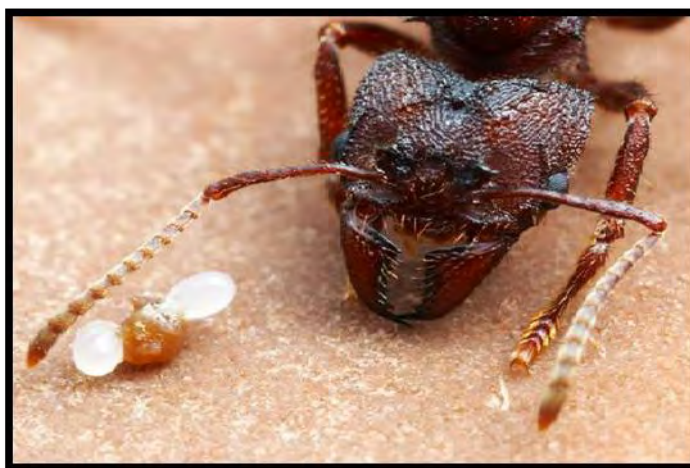


Figura 1 – Rainha jovem de *Acromyrmex versicolor* e o pellet do fungo mutualista com ovos (início da colônia).

Fonte: Alex Wild (<http://www.alexanderwild.com>)

Esses vôos ocorrem, habitualmente, durante uma limitada estação do ano a qual é favorável para a sobrevivência da jovem rainha e de sua nova colônia. Nas áreas tropicais, o começo da estação chuvosa, provavelmente, impulsiona o vôo nupcial (WEBER, 1972).

2.3. Attini estudadas

2.3.1. Paleoattini

As formigas Attini basais, ou Paleoattini, utilizam como substrato materiais orgânicos, fezes e restos de animais em decomposição para nutrir o fungo mutualista (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990).

Pelo fato dessas formigas não causarem danos à colheita, uma vez que não cortam folhas, as Attini basais são pouco estudadas, principalmente, em relação ao comportamento e ecologia da nidificação e forrageamento (ALBUQUERQUE; DIEHL-FLEIG; DIEHL, 2005).

2.3.1.1. Gênero *Mycocepurus*

De acordo com Mackay et al. (2004), as formigas do gênero *Mycocepurus* estão entre as formigas cultivadoras de fungos mais fáceis de serem reconhecidas, uma vez que esse gênero possui uma coroa no promesótono. *Mycocepurus curvispinosus*, *M. tardus*, *M. goeldii* (Figura 2), *M. obsoletus* e *M. smithii* compõem as cinco espécies desse gênero.

Sabe-se que o ninho de *Mycocepurus* possui tamanho irregular (RABELING; VERHHAGH; ENGELS, 2007) e é pequeno. Os substratos, basicamente, fezes e carcaças de insetos, coletados por essas formigas são levados para dentro do ninho (BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES, 2002). Mackay et al. (2004) supõem que esses substratos possuem um importante papel ecológico no ambiente físico-químico do solo dos sistemas agroflorestais da Amazônia.

Essas formigas primitivas geralmente são imperceptíveis e não atacam plantas. Por isso, pouca atenção tem recebido e sua filogenia, ecologia e história são escassamente estudadas (MUELLER et al., 2001).



Figura 2 – Vista lateral de uma operária de *Mycocepurus goeldii*
Fonte: April Nobile (<http://www.antweb.org>)

2.3.1.2. Gênero *Myrmicocrypta*

As vinte e quatro espécies desse gênero são pequenas, possuindo a cabeça fina e comprida. Os espinhos e tubérculos são predominantes no tórax e sustentam pelos escamosos característicos desse gênero (Figura 3) (WEBER, 1972).

Seus ninhos são de tamanho intermediário e apresentam mais que uma câmara. Essas formigas são encontradas em florestas (WEBER, 1972) e no cerrado (LEAL; OLIVEIRA, 2000) e foram observadas coletando fezes de insetos, frutos e flores em decomposição como substrato para o jardim de fungo (LEAL; OLIVEIRA, 2000).



Figura 3 - Vista lateral de uma operária do gênero *Myrmicocrypta*

Fonte: April Nobile (<http://www.antweb.org>)

2.3.2. Neoattini

2.3.2.1. *Neoattini basal*

2.3.2.1.1. Gênero *Mycetophylax*

De acordo com Klingenberg (2006), o gênero *Mycetophylax*, o qual possui três espécies, é o menos conhecido da tribo Attini. Seus ninhos situam-se, principalmente, em solos arenosos, pobres em nutrientes e susceptíveis a grandes distúrbios, podendo ser encontrados em toda a América do Sul (ALBUQUERQUE; DIEHL-FLEIG; DIEHL, 2005).

Klingenberg (2006) relatou que são raras as informações sobre a biologia de *Mycetophylax simplex* (Figura 5). Ninhos dessa espécie são comuns em dunas móveis da Costa Atlântica do Sul Brasileiro notadamente no Estado do Rio Grande do Sul (DIEHL-FLEIG; DIEHL, 2007) e em Florianópolis, Estado de Santa Catarina (Brasil). Essa espécie é facilmente reconhecida, entre as outras espécies desse gênero, devido à sua cor marrom-amarelada e o propódeo sem espinhos (KLINGENBERG, 2006).

A espécie *Mycetophylax morschi* (Figura 4), anteriormente, era pertencente ao gênero *Cyphomyrmex*. Klingenberg (2006) propôs a mudança de gênero baseada em características apomórficas compartilhadas com outras espécies de *Mycetophylax*. Entre elas, está a falta de definição dos soquetes das antenas, já que, em espécies de *Cyphomyrmex*, essa característica é peculiar. Outro fator de grande relevância é a arquitetura do ninho e a escolha do habitat. Como em *M. conformis* e *M. simplex*, os ninhos de *M. morschi* possuem tamanhos similares e são construídos em solos arenosos das praias do Atlântico (KLINGENBERG; BRANDÃO, 2009).



Figura 4 - Vista lateral de uma operária de *Mycetophylax morschi*
 Fonte: Klingenberg e Brandão (2009)



Figura 5 - Vista lateral de uma operária de *Mycetophylax simplex*
 Fonte: Klingenberg e Brandão (2009)

2.3.2.2. *Neoattini superiores não cortadoras e cortadoras de folhas*

Uma adaptação entre as formigas e o fungo mutualista pode ser observada no fungo cultivado pelas formigas superiores, pois estes apresentam estruturas, denominadas gongilídeos, que são ricas em nutrientes necessários para a alimentação, principalmente, das larvas e estão localizadas nas extremidades das hifas (WEBER, 1972; MUELLER, 2002).

A fungicultura dos gêneros *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex*, que são as Attini superiores não cortadoras de folhas, foi base para a evolução das Attini mais derivadas, pertencentes aos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*. As formigas desses gêneros se caracterizam por cortar e coletar folhas e flores de diferentes espécies de plantas com a finalidade de sustentar o fungo mutualista (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Essa característica peculiar as torna rotuladas como pragas na agricultura e em reflorestamentos e, por isso, são as formigas Attini mais estudadas (MARICONI, 1970; DELLA LUCIA, 1993).

Como comentado anteriormente, as cortadeiras possuem um polimorfismo acentuado (DIEHL-FLEIG, 1995), existindo, portanto, uma relação entre o tamanho das operárias e as

tarefas as quais realizam dentro e fora do ninho, sendo, então, uma avançada forma de organização social (WEBER, 1972).

As colônias de *Atta* geralmente são maiores que as de *Acromyrmex*, assim como as operárias. Contudo, suas atividades são similares e quando colônias de ambos os gêneros se concentram em uma árvore ou arbusto, em particular, o dano é comparável (WEBER, 1972).

2.3.2.2.1. Gênero *Sericomyrmex*

Esse gênero compreende dezenove espécies (FERNÁNDEZ; OSPINA, 2003) as quais são caracterizadas por seus abundantes pêlos compridos e lisos que cobrem toda a sua extensão corpórea, dando a elas aparência sedosa (Figura 6) (FELDMANN; VERHAAGH; HEYMANN, 2000).

Em campo, *Sericomyrmex* é pouco notado, já que essa formiga é bem lenta e cuidadosa em seus movimentos, fingindo estar morta caso ocorram pequenas perturbações. Podem ser encontradas desde o sul da América do Sul ao sul da América do Norte. Seus ninhos são construídos no solo e habitados por várias centenas ou até uma ou duas mil operárias (FELDMANN; VERHAAGH; HEYMANN, 2000). Coletam flores, folhas em decomposição, além de sementes como substrato (LEAL; OLIVEIRA, 2000) e, como todas as Attini não cortadeiras, pouco é sabido sobre sua ecologia.



Figura 6 - Vista lateral de uma operária de *Sericomyrmex* sp.

Fonte: April Nobile (<http://www.antweb.org>)

2.3.2.2.2. Gênero *Trachymyrmex*

O gênero *Trachymyrmex* é o mais abundante e diverso dentre os outros desta tribo (RABELING; VERHAAGH; ENGELS, 2007) e sua distribuição vai dos Estados Unidos a

Argentina (WEBER, 1972), com a presença da maioria das espécies na América do Sul e Central em ambiente tropical (RABELING; VERHHAGH; ENGELS, 2007).

O estudo taxonômico mais atual deste gênero o divide em seis grupos de acordo com a morfologia das operárias e com análises filogenéticas: Cornetzi (seis espécies), Urichi (dez espécies), Septentrionalis (cinco espécies), Jamaicensis (duas espécies), Opulentus (três espécies) e Iheringi (quatro espécies) (BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES, 2007; MAYHÉ-NUNES; BRANDÃO, 2007).

As espécies desse gênero são monomórficas e possuem, geralmente, muitos espinhos (Figura 7). A cabeça dessas formigas apresenta espinhos ou tubérculos pontudos na região posterior. Já os machos se diferenciam da casta por serem menores e mais escuros (WEBER, 1972).

As operárias possuem diferenças na coloração dependendo da idade e alimentam o fungo com fezes de insetos, madeira podre e material vegetal seco (JAFFÉ; VILLEGAS, 1985).



Figura 7 - Vista lateral de *Trachymyrmex* sp
April Nobile (<http://www.antweb.org>)

2.3.2.2.3. O gênero *Acromyrmex*

Esse gênero possui, aproximadamente, vinte e cinco espécies (FERNÁNDEZ; OSPINA, 2003) que se caracterizam por apresentarem um polimorfismo bem acentuado das operárias, com exemplares de diversos tamanhos ocorrendo num mesmo ninho. Os machos e as fêmeas, sempre alados, são bastante diferentes das operárias e menores que no gênero *Atta* (GONÇALVES, 1961).

Os espinhos da cabeça e do tórax são características sistemáticas muito importantes (Figura 8), mas as proporções podem variar de acordo com as colônias. Indivíduos com assimetria bilateral da cabeça são comuns (DIEHL; CAVALLI-MOLINA; ARAUJO, 2002).

O gênero *Acromyrmex* é próprio da América e sua distribuição vai desde a Califórnia (EUA), seguindo pelo México, continuando pela América Central e por todos os países da América do Sul (exceto o Chile), até a Patagônia (Argentina). No Brasil, ocorre em todos os Estados e territórios continentais (DELLA LUCIA, 1993). Essas cortadeiras vêm chamando atenção crescentemente devido ao estrago que causam nas lavouras (DIEHL; CAVALLI-MOLINA; ARAUJO, 2002).

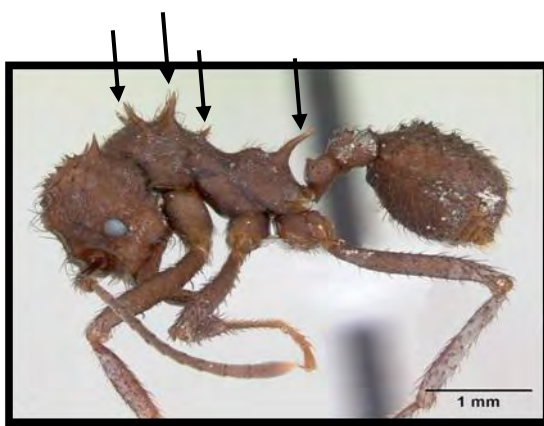


Figura 8 - Vista lateral de *Acromyrmex* sp. As setas indicam os quatro pares de espinhos característicos deste gênero.

Fonte: April Nobile (<http://www.antweb.org>)

2.3.2.2.4. O gênero *Atta*

Esse gênero de formiga cortadeira abrange, aproximadamente, quatorze espécies (FERNÁNDEZ; OSPINA, 2003) conhecidas como formigas saúvas (Figura 9), cujos formigueiros subterrâneos são caracterizados por apresentarem numerosos túneis e galerias (MARICONI, 1970).

Os ninhos de *Atta* são grandes, subterrâneos e, quando adultos, externamente na região das câmaras, formam um monte de terra produzido pela escavação das galerias e câmaras. Esses formigueiros se apresentam formados por dezenas ou até centenas de câmaras subterrâneas ligadas entre si e com a superfície do solo por meio de galerias (MARICONI, 1970).

As saúvas cortam plantas e as levam como substrato para o crescimento de seu fungo mutualista. Por isso, esse gênero é o causador dos mais sérios danos na agricultura do país (MARICONI, 1970).

Conhecida popularmente por “saúva parda”, a *Atta capiguara* causa danos em plantações de capins e cana-de-açúcar. O ninho dessa formiga apresenta certo número de áreas secundárias, além do monte de terra principal, tornando-o mais fácil de ser reconhecido (MARICONI, 1970). A cabeça do soldado dessa espécie apresenta escultura grosseira e sua coloração é parda e opaca (Figura 10-A) (BUENO; BUENO; VERZA, 2008).

A cortadeira *Atta sexdens rubropilosa*, chamada popularmente de “saúva-limão” (DELLA LUCIA, 1993), é o inseto que mais causa danos à agricultura nacional, sendo a principal praga de dicotiledôneas cultivadas. Essa espécie foi encontrada no Brasil, Paraguai, Bolívia e Argentina (MARICONI, 1970). O soldado possui cabeça com poucos pelos e é sem brilho (Figura 10-C) (BUENO; BUENO; VERZA, 2008).

A espécie *Atta bisphaerica* é vulgarmente chamada de “saúva mata-pasto”, tendo destaque entre as formigas que mais causam dano nos canaviais do Estado de São Paulo. Essa cortadeira, encontrada no Brasil, apresenta somente um monte de terra no seu saueiro (MARICONI, 1970) e o soldado possui na cabeça um grande sulco, formando duas protuberâncias laterais (Figura 10-B) (BUENO; BUENO; VERZA, 2008).

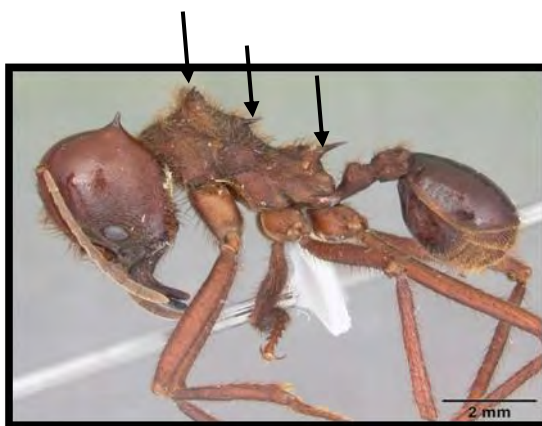


Figura 9 - Vista lateral de *Atta* sp. As setas indicam os três pares de espinhos característicos deste gênero.

Fonte: April Nobile (<http://www.antweb.org>)

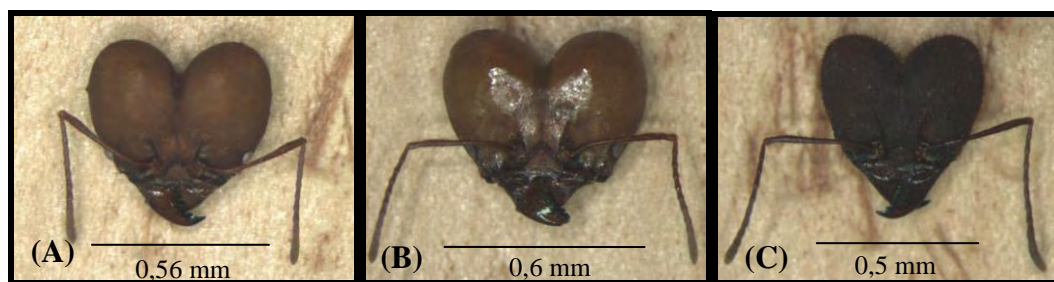


Figura 10 – (A). Cabeça de soldado de *Atta capiguara*; (B). Cabeça de soldado de *Atta bisphaerica*; (C). Cabeça de soldado de *Atta sexdens rubropilosa*.

Fonte: Sandra Verza

2.4. As Attini e sua associação com outros micro-organismos

O sucesso da fungicultura pelas formigas Attini tem sido atribuído ao eficiente controle de parasitas microbianos dos jardins de fungos, atividade esta incessantemente realizada pelas operárias (CURRIE; STUART, 2001; MUELLER; GERARDO, 2002).

Apesar dos diversos mecanismos para manter suas colônias livres de outros micro-organismos, alguns vencem estas barreiras e sobrevivem no interior dos ninhos em conjunto com as formigas e o fungo mutualista (CURRIE; MUELLER; MALLOCH, 1999).

De acordo com Currie e Stuart (2001), as operárias são importantes para o controle microbiológico da colônia, pois alguns fungos filamentosos podem se desenvolver em jardins de fungos nos quais o número de operárias está reduzido.

As formigas Attini manejam ativamente seus jardins, removendo fisicamente micro-organismos estranhos (CURRIE; STUART, 2001). Algumas hipóteses de como as formigas protegem seus jardins contra micro-organismos estranhos são: (i) promover a habilidade competitiva do fungo mutualista; (ii) produção de antibióticos pelas glândulas mandibulares e metapleurais das formigas Attini; (iii) produção de antibióticos pelos fungos mutualistas; (iv) remoção física de micro-organismos indesejáveis pelas operárias e; (v) jardins de fungos como monoculturas, embora algumas dessas hipóteses sejam bastante discutíveis (CURRIE, 2001a).

Estudos de Currie, Mueller e Malloch (1999) mostraram que as Attini são hospedeiras de parasitas especializados, conhecidos somente em jardins de fungos e presentes na maioria de seus ninhos, contrariando a hipótese aceita por muito tempo de que esses jardins são mantidos sem patógenos microbianos e parasitas.

Um desses parasitas que devastam potencialmente os jardins de fungos e diminuem o crescimento das colônias são as espécies de fungos do gênero *Escovopsis* (CURRIE;

MUELLER; MALLOCH, 1999; CURRIE, 2001b; SCHULTZ; BRADY, 2008), o qual só foi encontrado em ninhos dessas formigas (GERARDO; MUELLER; CURRIE, 2006). Esse fungo é comum, abundante e persistente nos jardins das Attini, sendo, possivelmente, um micoparasita, já que obtém nutrientes do micélio do fungo mutualista dessas formigas (CURRIE; MUELLER; MALLOCH, 1999).

Tudo indica que o *Escovopsis* é mantido em forma latente no interior dos ninhos, crescendo rapidamente na ausência ou diminuição do número de operárias. Quando estas são removidas, observa-se que o fungo parasita cresce rapidamente, podendo suprimir o fungo mutualista (CURRIE; MUELLER; MALLOCH, 1999). Esta descoberta nos mostra claramente que as formigas cultivadoras de fungos não conseguem manter seus jardins livres de patógenos. Sugere-se que outros patógenos microbianos podem estar presentes igualmente como o *Escovopsis* nos jardins dessas formigas (CURRIE, 2001a).

Currie e colaboradores (1999) encontraram mais um micro-organismo que também atua nesta simbiose: uma bactéria filamentosa, actinomiceto (Figura 11), a qual produz antibióticos que podem inibir o crescimento do *Escovopsis*. Primeiramente, essa bactéria foi identificada como pertencente ao gênero *Streptomyces* (CURRIE et al., 1999). Porém, análises moleculares revelaram que esse actinomiceto pertence ao gênero *Pseudonocardia* (CURRIE et al., 2003a).

Na pesquisa de Currie e colaboradores (1999), essa actinobactéria foi encontrada em todos os oito gêneros de Attini estudados, incluindo os mais basais (*Myrmicocrypta* e *Apterostigma*) bem como os mais derivados (*Atta* e *Acromyrmex*), e estão localizados na cutícula dessas formigas (CURRIE et al., 2003b).

Segundo os primeiros relatos, essa bactéria é transmitida verticalmente do ninho parental para o novo ninho, já que observou-se a presença de actinomiceto em jovens rainhas durante o vôo nupcial (CURRIE et al., 1999). Entretanto, atualmente estão se acumulando dados que sugerem outras possibilidades de associação com actinobactérias, envolvendo aquisição lateral (MUELLER et al., 2008) e até mesmo a participação de outros gêneros de actinobactérias (SEN et al., 2009). Entre eles, os mais frequentemente isolados na pesquisa de Mueller e colaboradores (2008) foram os gêneros *Mycobacterium* e *Microbacterium*, os quais estavam relacionados à *Atta*. Contudo, não foi confirmada a associação de *Pseudonocardia* com essa cortadeira, já que, em diversas tentativas, essa bactéria não foi encontrada. Esse estudo mostrou também através de análise filogenética que as linhagens de *Pseudonocardia* associadas à Attini estão intimamente relacionadas a actinomicetos endofíticos e encontrados

no solo, propondo um sistema aberto no qual as cepas de *Pseudonocardia* de vida livre podem ser frequentemente adquiridas por essas formigas.



Figura 11 – Actinomiceto na cutícula de uma operária de *Acromyrmex* sp.

Fonte: Thais Demarchi Mendes

Alguns trabalhos analisaram actinomicetos associados à Attini com o intuito de isolar a molécula que produz antibióticos específicos para a defesa do fungo mutualista contra fungos parasitas. Oh e colaboradores (2009) isolaram *Pseudonocardia* sp. da cutícula de *Apterostigma dentigerum* e conseguiram isolar uma molécula ($C_{40}H_{67}N_9O_{13}$) inédita denominada **dentigerumicina**, que inibe o fungo parasita *Escovopsis*. Outro trabalho relacionado foi o de Haeder e colaboradores (2009), os quais isolaram actinomicetos de três espécies de *Acromyrmex* (*A. octospinosus*, *A. echinaior* e *A. volcanus*). Esses autores, selecionaram uma estirpe de *Streptomyces*, já que esta inibiu fortemente o *Escovopsis*, e dela foi isolada **candidicina**, uma molécula que possui alta atividade contra espécies de *Escovopsis*.

Esses estudos recentes mostram que a associação entre formiga-fungo-parasita-bactéria é uma das mais complexas simbioses descobertas na natureza (CURRIE et al., 2003a), e essas interações, provavelmente, mantêm a estabilidade do ninho.

2.5. Leveduras – Ecologia e Distribuição

Leveduras são fungos que se reproduzem principalmente por brotamento (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001). A formação desses brotos, laterais ou apicais, ocorre quando o ambiente está favorável e quando há nutrientes disponíveis, expandindo regiões da parede

celular, dando origem, então, a células-filhas, as quais podem ou não permanecer unidas à célula-mãe.

Apresentam-se de forma variada, de esférica a ovóide, de elipsóide a filamentosa, muitas vezes num mesmo cultivo. Embora algumas poucas espécies possam ser consideradas patogênicas e/ou oportunistas, desde a antigüidade, esses fungos são conhecidos como protagonistas da produção de alimentos e bebidas por fermentação e, atualmente, também são utilizados como fontes de obtenção de vitaminas do complexo B, pigmentos, proteínas de organismos unicelulares, biomassa (RÁTON, 2004).

A vinicultura, a produção de bioetanol, a panificação e a indústria cervejeira utilizam a diversidade de espécies e a variabilidade de estirpes para aumento e melhoramento contínuo na produção. Além disso, muitas estirpes são desenvolvidas por seleção e emprego de técnicas de engenharia genética, acrescentando genes heterólogos para obtenção de metabólitos de interesse (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

Com o advento das técnicas baseadas em análises moleculares, novas espécies têm sido descritas com freqüência. Ao final dos anos 90, havia aproximadamente 600 espécies descritas e atualmente este número excede a 1.000 espécies (KURTZMAN; FELL, 2006).

Esses micro-organismos não ocorrem aleatoriamente pela biosfera, já que formam comunidades de espécies. Os membros dessas comunidades podem habitar diferentes nichos, sendo importante distinguir entre as espécies que são autóctones, isto é, componentes essenciais da comunidade que crescem regularmente em um substrato, das que são alóctones, as quais são meramente transitórias ocupando diferentes substratos, sendo consideradas generalistas (LACHANCE; STARMER, 1998).

A maioria das espécies é de vida livre e pode ser encontrada em ambientes completamente distintos. No solo, reservatório de diversas leveduras, a ocorrência e proporção da população se dá pelo tipo de floresta e pelo pH do solo, além de outros fatores como poluição, plantas e animais em decomposição, entre outros (SLAVIKOVÁ; VADKERTIOVÁ, 2000).

Esses micro-organismos também podem ser observados em ambientes aquáticos, tanto em água doce (VÄÄTÄNEN, 1980) onde podem ser indicadores dos níveis de contaminação (PEÇANHA et al., 1996), quanto em água marinha, cujas leveduras também podem ser encontradas em mamíferos, peixes e invertebrados marinhos, porém esses estudos são mais limitados, sendo os gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces* e *Rhodotorula* os mais freqüentemente observados (KUTTY; PHILIP, 2008).

Em ambientes extremos, como nos glaciais, as leveduras também podem ser encontradas. O estudo de Turchetti e colaboradores (2008) constatou a presença de leveduras em sedimentos supra e subglaciais de duas geleiras dos Alpes Italianos, sendo *Cryptococcus gilvescens* a espécie mais isolada e, aproximadamente, 55% dos cento e seis isolados foram provenientes dos sedimentos subglaciais, o que sustenta a hipótese de que estes sedimentos podem servir de abrigo para esse micro-organismo.

Algumas leveduras também estão diretamente relacionadas com doenças como candidíases, infecções orais e de mucosas (FERRAZZA et al., 2005). Podem causar danos às plantas, também, como o caso dos membros do gênero *Eremothecium* que são, usualmente, transportados por insetos (DEMAIN; PHAFF; KURTZMAN, 1998).

Na filosfera de várias folhas também são encontradas diversas espécies desse micro-organismo, principalmente basidiomicetos, porém alguns ascomicetos como *Candida oleophila*, *Debaryomyces hansenii* e *Metschnikowia pulcherrima* também estão presentes nessa comunidade (GLUSHAKOVA; YURKOV; CHERNOV, 2007). As leveduras epifíticas em plantas variam bastante sazonalmente de acordo com o número de fatores e mudanças durante o ano, dependendo primeiramente de características ecológicas da planta (GLUSHAKOVA; CHERNOV, 2007), contudo há pouca diferença dessa comunidade em folhas de espécies de plantas diferentes quando verificadas em um único período (SLÁVIKOVÁ; VADKERTIOVÁ; VRÁNOVÁ, 2007).

No estudo realizado por Inácio, cerca de 90% dos isolados de leveduras do filoplano de plantas representativas de um ecossistema do tipo mediterrânico no Parque Natural da Arrábida em Portugal (de um total de 850 estirpes) são basidiomicetos, representando aproximadamente 67 espécies, as quais metade são possíveis espécies não conhecidas e 75% do número total de isolados foram observados apenas uma vez ou ocorreram com baixa frequência. As espécies mais preponderantes foram *Cryptococcus* cf. *laurentii*, *Erythrobasidium* cf. *hasegawianum*, *Rhodotorula* cf. *slooffiae*, *Rh. bacarum*, *Sporobolomyces* cf. *roseus*, *Tilletiopsis* spp. e *Lalaria inositophila* sp. nov. (INÁCIO, 2003). Neste trabalho, foram encontradas trinta e cinco estirpes epifíticas com colônias alaranjadas pertencentes à onze espécies de basidiomicetos, as quais posteriormente foram descritas como: *Cryptococcus cistialbidi*, *C. amylolyticus*, *C. armeniacus*, *Dioszegia fristingensis*, *D. buhagiarii*, *D. takashimae* e *D. catarinonii* (INÁCIO et al., 2005). No estudo de leveduras epifíticas em bromélias no Parque de Itapuã no sudeste do Brasil foram isoladas quatro estirpes de uma espécie, até então, não conhecida, *Cryptococcus bromeliarum*. Esses estudos mostram que o

conhecimento da microbiota do filoplano é ainda escasso e requer mais estudos para a caracterização da população nesses ecossistemas (LANDELL et al., 2009).

Leveduras e drosófilas formam uma associação mutualística, na qual esses micro-organismos são fontes de nutrientes para adultos e larvas das moscas, além de ter papel importante na detoxificação dos substratos utilizados como sítios de alimentação e de oviposição (MORAIS; ROSA, 2000). De acordo com esses autores, há diferentes espécies de leveduras associadas à *Drosophila* em regiões temperadas e tropicais, com a prevalência do gênero *Pichia*, *Hanseniaspora* e *Kloeckera* no Brasil e África, e predominância de *Saccharomyces* e *Kluyveromyces* nas regiões temperadas.

A associação entre leveduras e insetos pode ser dividida em dois aspectos. O primeiro pode ser considerado uma relação puramente mecânica, na qual os insetos servem como vetores na sua dispersão sem nenhum benefício nutricional (PHAFF; STARMER, 1987), como no caso da *Drosophila melanogaster* que se alimenta de figo e, conseqüentemente, ingere leveduras presentes nesse fruto. Os esporos dessas leveduras superam a passagem pelo intestino e são depositados através das fezes juntamente com os ovos na cavidade dos frutos de figueiras (*Calimyrna* sp) (MILLER; PHAFF, 1962; COLUCCIO et al., 2008). Os autores acreditam que este tipo de mecanismo de dispersão é mais eficiente quando comparado com o vento ou a água, já que as leveduras são transportadas para ambientes ricos em nutrientes (COLUCCIO et al., 2008). O segundo pode ser considerado como uma associação benéfica onde o inseto não somente age como vetor, mas também se beneficia das leveduras como complemento alimentar (PHAFF; STARMER, 1987), como ocorre com a *Drosophila ampelophila* que utiliza esse micro-organismo como complemento alimentar das larvas, visto que a levedura fornece substâncias, possivelmente através da degradação de compostos maiores em compostos mais simples, que são necessárias para o desenvolvimento delas (NORTHROP, 1917).

Também as abelhas podem formar interessantes associações com leveduras, como mostra o trabalho de Rosa e colaboradores (2003) que observaram a associação de leveduras em abelhas das espécies *Tetragonisca angustula*, *Melipona quadrifasciata*, *Frieseomelitta varia*, pertencentes à tribo Meliponini. A levedura *Starmerella meliponinorum* apresentou forte interação com *Tetragonisca angustula* já que foi encontrada nos adultos, no mel, no pólen, no material de descarte (lixo) e no própolis dessa abelha, totalizando quarenta e três isolados. Nas duas outras espécies de abelhas, esse micro-organismo também foi encontrado, porém com poucos isolados.

Um exemplo notável dessa associação entre leveduras e insetos é o trabalho de Brysch-Herzberg (2004), o qual mostrou que as rainhas da abelha *Bombus* estão associadas a leveduras, particularmente *Metschnikowia gruessii*. É sabido que *M. gruessii* possui uma adaptação morfológica para que suas células possam aderir aos tricomas encontrados na região bucal do inseto e neles permanecer durante o rigoroso inverno da região, quando praticamente desaparecem das flores estudadas. Nesse estudo, observou-se que *M. gruessii* apresenta dependência dessas abelhas para a sua dispersão, já que sua abundância foi grandemente afetada nos nectários florais nos meses de inverno, voltando a aumentar assim que as rainhas saíam da hibernação.

Ainda, Suh et al. (2005) isolaram 650 espécies de leveduras no trato intestinal de 27 famílias de besouros. Esses autores observaram que aproximadamente 200 espécies desses isolados eram espécies ainda não descritas. Este tipo de estudo mostra a importância de realizar pesquisas com insetos, pois esses são essenciais para o estudo da diversidade de leveduras.

2.6. Leveduras no contexto da simbiose das formigas cultivadoras de fungos

Com exceção ao fungo mutualista, aos actinomicetos e ao fungo parasita *Escovopsis*, poucos são os estudos com outros micro-organismos encontrados em associação a ninhos de formigas Attini. Alguns destes foram realizados quanto à comunidade de leveduras presentes nos ninhos dessas formigas, porém, ainda, são escassos e necessitam de mais atenção e pouco se sabe sobre a sua diversidade e participação na simbiose.

Estudos de leveduras em ninhos de cortadeiras foram realizados por Craven, Dix e Michaels (1970), que isolaram e quantificaram leveduras em ninhos de *Acromyrmex octospinosus* e *Atta cephalotes*. Num estudo realizado por Pagnocca et al. (1996) com ninhos de laboratório de *A. sexdens rubropilosa* foi observada a presença e distribuição de leveduras e bactérias no tratamento desses ninhos com folhas de *Sesamum indicum* (planta com atividade antifúngica e inseticida) e *Eucalyptus alba* (controle). Neste trabalho, os autores observaram que a planta *Sesamum indicum* induziu o desequilíbrio e usualmente a morte dos ninhos. Também, Fisher e colaboradores (1996) analisaram o jardim de fungo de três ninhos de *Atta cephalotes*, sendo constatada a presença de levedura em todos os jardins. Contudo, nesses três trabalhos a identificação das estirpes não foi realizada.

Outras pesquisas envolvendo leveduras em ninhos de cortadeiras foram realizadas por Angelis, Serzedello e De Angelis (1983) que analisaram jardins de 50 ninhos de campo de

Atta sexdens rubropilosa e *Atta laevigata* e obtiveram 13 espécies, sendo a mais predominante *Torulopsis (Candida) etchellsii*.

Carreiro e colaboradores (1997) isolaram leveduras de folhas de *Eucalyptus alba*, do jardim de fungo, trato digestivo e das pernas das formigas da espécie *A. sexdens rubropilosa* de ninhos de laboratório, as quais estavam distribuídas em 24 espécies. O perfil dessas leveduras foi de, aproximadamente, 70% de ascomicetos, sendo o gênero *Candida* o mais encontrado, e, aproximadamente 30% de basidiomicetos, com predominância do gênero *Cryptococcus* entre elas. As espécies *Candida homilentoma*, *C. famata*, *C. colliculosa-like* e *C. colliculosa* foram as mais abundantes.

Análises posteriores desses isolados através de técnicas moleculares confirmaram muitas das espécies que haviam sido identificadas por técnicas fenotípicas, ao mesmo tempo em que reposicionaram outras espécies (Carreiro, S.C., comunicação pessoal), algumas das quais ainda desconhecidas como foram os casos de *Cryptococcus haglerorum* (MIDDELHOVEN et al., 2003) e *Sympodiomyces attinorum* (CARREIRO et al., 2004). Outra espécie descrita recentemente foi *Trichosporon chiarellii* (PAGNOCCA et al., 2009) encontrada maciçamente em um ninho de uma espécie recentemente descrita como *Myrmicocrypta camargoi* (SOSA-CALVO; SCHULTZ, 2010).

Em relação a uma participação mais direta na simbiose das formigas, o papel das leveduras permanece obscuro. É sabido que leveduras encontradas no estudo de Carreiro (2000) produziram *in vitro* enzimas hidrolíticas capazes de degradar substratos presentes na matéria vegetal (como pectina e amido) carregada para o interior dos ninhos.

Pode-se supor que esses micro-organismos estão participando de uma forma positiva na simbiose, não apenas facilitando a colonização do substrato pelo fungo mutualista, mas também gerando compostos (açúcares) mais simples e assimiláveis pelas formigas (CARREIRO, 2000). O mesmo pode ser dito em relação à produção de substâncias para controlar outros micro-organismos que podem ameaçar a simbiose ou mesmo, à produção de compostos sinalizadores (cheiro) para a colônia, aspecto este ainda não devidamente estudado (PAGNOCCA; RODRIGUES; BACCI JR., 2010, no prelo).

Entretanto, as leveduras podem estar competindo com o fungo mutualista e outros micro-organismos pelo substrato, ou seja, seriam comensais da associação formiga-fungo, retirando parte da energia do sistema (CARREIRO, 2000).

Um dado bastante significativo em relação à atividade bioquímica das leveduras foi observado por Carreiro (2000). Nele, constatou-se a utilização da xilose para o crescimento da grande maioria das leveduras estudadas, o que indica uma possível competição com o fungo

mutualista, já que este também pode utilizar xilose, para o seu crescimento (SIQUEIRA et al., 1998).

De acordo com Siqueira e colaboradores (1998), o fungo mutualista produz grandes quantidades de pectinases e muitas leveduras encontradas em ninhos de formigas cortadeiras também produzem estas enzimas (CARREIRO, 2000; MENDES, 2007).

O ácido galacturônico, um dos principais produtos de hidrólise da pectina, não é utilizado pelo fungo mutualista (SIQUEIRA et al., 1998) para seu crescimento e é tóxico para a formiga (SILVA et al., 2003). Assim sendo, poderíamos pensar que esse produto estaria se acumulando nos ninhos, porém, Mendes (2007) verificou que uma parcela expressiva das leveduras isoladas de ninhos de *Acromyrmex* sp. (79,73%) e *Atta texana* (62,22%) utiliza ácido galacturônico como fonte de carbono para seu crescimento. Nesse caso, as leveduras estariam detoxificando o jardim de fungos, consumindo compostos indesejáveis e estariam, assim, exercendo uma atividade benéfica para os ninhos. Segundo Carreiro, S.C. (comunicação pessoal), esta mesma conclusão pode ser obtida com as estirpes de leveduras de ninhos de laboratório de *Atta sexdens rubropilosa*.

Algumas leveduras podem secretar compostos (micocinas ou toxinas killer), geralmente glicoproteínas, que são antagônicos para outras espécies de leveduras (MAGLIANI et al., 1997). Dentre as estirpes isoladas de ninhos de *Atta sexdens* por Carreiro e colaboradores (2002), foi constatada a presença de atividade killer em espécies de *Aureobasidium*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Tremella* e *Trichosporon*. Essa atividade killer pode ser um instrumento para a manutenção da estrutura da comunidade de leveduras (CARREIRO et al., 2002).

A pesquisa de Rodrigues e colaboradores (2009) mostrou o antagonismo de leveduras isoladas de ninhos de *Atta texana* em relação ao fungo parasita *Escovopsis*. As espécies *Bullera sinensis*, *Cryptococcus magnus* e espécies de *Pseudozyma* inibiram significativamente as duas estirpes de *Escovopsis* testadas. Esta observação evidenciou um papel biológico das leveduras até então desconhecido em relação à defesa do ninho contra *Escovopsis*.

Por outro lado, Little e Currie (2007) encontraram um possível novo simbiote associado a formigas da espécie *Apterostigma pilosum*, uma Attini basal. Leveduras negras do gênero *Phialophora* foram isoladas da cutícula, na região do tórax, isto é, no mesmo local em que as bactérias simbiotes se encontram. Elas podem utilizar nutrientes diretamente da *Pseudonocardia*, o que promove o crescimento dessas leveduras e diminui o crescimento da *Pseudonocardia*, dessa forma interferindo de modo negativo na proteção aos ninhos. Assim,

poderiam reduzir o crescimento das bactérias produtoras de antibióticos que inibem o fungo *Escovopsis*. Portanto, as leveduras negras podem sinergizar indiretamente a infecção por *Escovopsis* nos ninhos dessas formigas (LITTLE; CURRIE, 2008).

Muitos dos gêneros e espécies de formigas nunca foram estudados quanto à ocorrência e características das leveduras associadas aos seus ninhos, principalmente, com ninhos de Attini não cortadeiras.

Acredita-se que esta dissertação irá contribuir para o conhecimento da biodiversidade de leveduras associadas às Attini e também para o enriquecimento do acervo de coleções de culturas microbianas associadas a insetos sociais existente no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) localizado na Unesp de Rio Claro. Muitas das estirpes obtidas poderão servir em futuro próximo para outras pesquisas, nas quais as leveduras têm importante papel, como, por exemplo, na indústria de alimentos, pois elas são fontes de várias enzimas de interesse industrial (VAKHLU; KOUR, 2006), além de flavorizantes (WELSH; MURRAY; WILLIAMS, 1989; BICAS; DIONÍSIO; PASTORE, 2009), aromas (WELSH; MURRAY; WILLIAMS, 1989), pigmentos (CHAIROTE et al., 2007) e podem fermentar pentoses, como xilose e arabinose, produzindo etanol (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007). Elas também têm sido utilizadas na proteção do meio ambiente, como na biorremediação (MARGESIN, 2007) e decomposição de lixo orgânico (REZENDE; ASSIS; NAHAS, 2004), além da adsorção de metais (PARVATHI; NAGENDRAN; NARESHKUMAR, 2007) e em controle biológico (proteção fitossanitária de lavouras, particularmente na fruticultura (DROBY et al., 1998)).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Conhecer a diversidade de leveduras associadas a ninhos de formigas da tribo Attini.

3.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar e identificar leveduras isoladas de ninhos de formigas representantes da tribo Attini;
2. Descrever possíveis espécies novas encontradas durante o desenvolvimento do presente trabalho;
3. Contribuir, com as estirpes isoladas, para o banco de leveduras específico (temático) do Laboratório de Microbiologia sob responsabilidade do Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca para utilização em estudos futuros e para servir, também, como fonte de exploração genômica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta das formigas

Neste estudo, foram isoladas leveduras de jardins de fungos de: (i) oito ninhos de *Mycocepurus goeldii*; (ii) doze ninhos de *Atta sexdens rubropilosa*; (iii) dois ninhos de *Mycetophylax simplex*; (iv) dois ninhos de *Mycetophylax morschi*; (v) onze ninhos de *Trachymyrmex* sp, (vi) dois ninhos de *Acromyrmex* sp; (vii) um ninho de *Myrmicocrypta* sp; (viii) um ninho de *Sericomyrmex* sp; (ix) um ninho de *Atta capiguara*; e (x) um ninho de *Atta bisphaerica*. Também foram isoladas leveduras de amostras de material de descarte de: (i) dois ninhos de *Trachymyrmex* sp; (ii) um ninho de *Acromyrmex* sp, totalizando quarenta e quatro amostras (Tabela 2).

Os ninhos foram cuidadosamente escavados, preparando-se uma abertura lateral tipo trincheira e dirigindo a escavação para a região onde se esperava encontrar o jardim de fungos, até que este fosse localizado. Essa técnica impede ou minimiza contaminações com partículas do solo. As trincheiras foram fechadas após cada coleta para diminuir o distúrbio e prevenir a migração da colônia para um local não perturbado (RODRIGUES et al., 2009).

Os jardins e algumas formigas foram assepticamente coletados em recipientes esterelizados e transportados para o laboratório. O tempo em que os jardins ficaram armazenados até o momento do processamento do laboratório variou entre as coletas.

Tabela 2 – Ninhos de formigas Attini utilizados para o isolamento das leveduras

Código do ninho	Localização	Coordenadas	Data da coleta	Espécie da formiga
FCPAR270208-01	Fazenda Lageado Botucatu-SP	S22°50'38.16" W48°26'05.10"	27/02/2008	<i>Mycocepurus goeldii</i> *
FCPAR270208-02	Fazenda Lageado Botucatu-SP	S22°50'38.16" W48°26'05.10"	27/02/2008	<i>Mycocepurus goeldii</i> *
FCPAR270208-03	Fazenda Lageado Botucatu-SP	S22°50'38.16" W48°26'05.10"	27/02/2008	<i>Mycocepurus goeldii</i> *
FCPAR270208-04	Fazenda Lageado Botucatu-SP	S22°50'38.16" W48°26'05.10"	27/02/2008	<i>Mycocepurus goeldii</i> *

Tabela 2 (continuação) – Ninhos de formigas Attini utilizados para o isolamento das leveduras

Código do ninho	Localização	Coordenadas	Data da coleta	Espécie da formiga
FCP040308-02	Fazenda Lageado Botucatu-SP	S22°50'43.62" W48°26'03.36"	04/03/2008	<i>Mycocepurus goeldii</i> *
FCP040308-03	Fazenda Lageado Botucatu-SP	S22°50'43.62" W48°26'03.36"	04/03/2008	<i>Mycocepurus goeldii</i> *
FCP040308-04	Fazenda Lageado Botucatu-SP	S22°50'43.62" W48°26'03.36"	04/03/2008	<i>Mycocepurus goeldii</i> *
SES080618-01	Campus UNESP Rio Claro-SP	S22°23'45.30" W47°32'43.08"	18/06/2008	<i>Trachymyrmex</i> sp. *
SES080618-02	Campus UNESP Rio Claro-SP	S22°23'45.30" W47°32'43.08"	18/06/2008	<i>Trachymyrmex</i> sp. *
SES080618-03	Campus UNESP Rio Claro-SP	S22°23'45.30" W47°32'43.08"	18/06/2008	<i>Trachymyrmex</i> sp. *
SES080921-01	Est. Ecológica do Panga Uberlândia-MG	S19°10'22.43" W48°23'48.12"	21/09/2008	<i>Trachymyrmex</i> sp. *
SES080921-03	Est. Ecológica do Panga Uberlândia-MG	S19°10'22.43" W48°23'48.12"	21/09/2008	<i>Trachymyrmex</i> sp. *
SES080922-01	Est. Ecológica do Panga Uberlândia-MG	S19°10'22.43" W48°23'48.12"	22/09/2008	<i>Sericomyrmex</i> sp. *
SES080922-03	Est. Ecológica do Panga Uberlândia-MG	S19°10'22.43" W48°23'48.12"	22/09/2008	<i>Trachymyrmex</i> sp. *
SES080922-04	Est. Ecológica do Panga Uberlândia-MG	S19°10'22.43" W48°23'48.12"	22/09/2008	<i>Trachymyrmex</i> sp. *
JSC080924-01	Est. Ecológica do Panga Uberlândia-MG	S19°10'22.43" W48°23'48.12"	24/09/2008	<i>Myrmicocrypta</i> sp. *
SES080924-02	Est. Ecológica do Panga Uberlândia-MG	S19°10'22.43" W48°23'48.12"	24/09/2008	<i>Trachymyrmex</i> sp. *
SES080925-01	Est. Ecológica do Panga Uberlândia-MG	S19°10'22.43" W48°23'48.12"	25/09/2008	<i>Trachymyrmex dichorus</i> *
AR090306-01	Praia da Joaquina Florianópolis-SC	S27°37'43.32" W48°26'52.24"	06/03/2009	<i>Mycetophylax morschi</i> *
TRS090306-05	Praia da Joaquina Florianópolis-SC	S27°37'43.32" W48°26'52.24"	06/03/2009	<i>Mycetophylax morschi</i> *

Tabela 2 (continuação) – Ninhos de formigas Attini utilizados para o isolamento das leveduras

Código do ninho	Localização	Coordenadas	Data da coleta	Espécie da formiga
SES090307-01	Praia do Moçambique Florianópolis-SC	S27°55'05.40" W48°42'57.72"	07/03/2009	<i>Acromyrmex</i> sp. *
SES090307-02	Praia do Moçambique Florianópolis-SC	S27°55'05.40" W48°42'57.72"	07/03/2009	<i>Acromyrmex</i> sp. **
AR090307-02	Pasto Taquara-RS	S29°42'33.42" W50°50'12.90"	07/03/2009	<i>Mycetophylax simplex</i> *
CTL090307-01	Praia do Moçambique Florianópolis-SC	S27°55'05.40" W48°42'57.72"	07/03/2009	<i>Mycetophylax simplex</i> *
SES090309-02	Pasto Taquara-RS	S29°42'33.42" W50°50'12.90"	09/03/2009	<i>Trachymyrmex</i> sp. **
SES090309-03	Pasto Taquara-RS	S29°42'33.42" W50°50'12.90"	09/03/2009	<i>Trachymyrmex</i> sp. *
SES090309-04	Pasto Taquara-RS	S29°42'33.42" W50°50'12.90"	09/03/2009	<i>Trachymyrmex</i> sp. *
TRS090309-13	Pasto Taquara-RS	S29°42'33.42" W50°50'12.90"	09/03/2009	<i>Acromyrmex</i> sp. *
SES090310-02	Mata Canela-RS	S29°17'23.12" W50°51'17"	10/03/2009	<i>Trachymyrmex</i> sp. **
AR090402-01	Plantação de citrus Corumbataí-SP	S22°17'27.08" W47°39'10.76"	02/04/2009	<i>Atta sexdens rubropilosa</i> *
AR090402-02	Plantação de citrus Corumbataí-SP	S22°17'29.99" W47°39'07.53"	02/04/2009	<i>Atta sexdens rubropilosa</i> *
FCP090402-03	Plantação de citrus Corumbataí-SP	S22°17'22.44" W47°39'09.12"	02/04/2009	<i>Atta sexdens rubropilosa</i> *
FCP090402-04	Plantação de citrus Corumbataí-SP	S22°17'22.44" W47°39'09.12"	02/04/2009	<i>Atta sexdens rubropilosa</i> *
FCP090402-05	Plantação de citrus Corumbataí-SP	S22°17'22.25" W47°39'08.69"	02/04/2009	<i>Atta sexdens rubropilosa</i> *
FCP090402-06	Plantação de citrus Corumbataí-SP	S22°17'21.01" W47°39'08.91"	02/04/2009	<i>Atta sexdens rubropilosa</i> *
FCP090402-07	Plantação de citrus Corumbataí-SP	S22°17'20.98" W47°39'09.28"	02/04/2009	<i>Atta sexdens rubropilosa</i> *

Tabela 2 (continuação) – Ninhos de formigas Attini utilizados para o isolamento das leveduras.

Código do ninho	Localização	Coordenadas	Data da coleta	Espécie da formiga
FCP090402-08	Plantação de citrus Corumbataí-SP	S22°17'20.97" W47°39'09.39"	02/04/2009	<i>Atta sexdens rubropilosa</i> *
FCP090402-09	Plantação de citrus Corumbataí-SP	S22°17'20.92" W47°39'09.35"	02/04/2009	<i>Atta sexdens rubropilosa</i> *
FCP090402-10	Plantação de citrus Corumbataí-SP	S22°17'16.75" W47°39'24.10"	02/04/2009	<i>Atta sexdens rubropilosa</i> *
FCP090402-11	Plantação de citrus Corumbataí-SP	S22°17'20.85" W47°39'24.10"	02/04/2009	<i>Atta sexdens rubropilosa</i> *
FCP090402-12	Plantação de citrus Corumbataí-SP	S22°17'20.91" W47°39'09.43"	02/04/2009	<i>Atta sexdens rubropilosa</i> *
AR090429-01	Botucatu-SP	S22°30'20.54" W48°15'57.14"	29/04/2009	<i>Atta bisphaerica</i> *
AR090429-02	Botucatu-SP	S22°30'22.90" W48°15'43.70"	29/04/2009	<i>Atta capiguara</i> *
(*) material orgânico analisado proveniente do jardim de fungo dos ninhos; (**) material orgânico proveniente do depósito de lixo dos ninhos.				

4.2. Isolamento e manutenção das leveduras

No laboratório, o material constituído pelo jardim de fungos e alguns de material de descarte (Figura 12-A) foi separado em porções de 0,5g e, transferidos para tubos contendo 4,5mL de Yeast Malt Broth (0,3% de extrato de malte; 0,3% de extrato de levedura; 0,5% de peptona; 1,0% de D-glicose) com 0,01% de cloranfenicol e agitados em vórtex (Figura 12-B) (YARROW, 1998). Posteriormente, 200 µL dessas suspensões foram semeadas em placas de petri contendo os meios de isolamento MYP (0,7% de extrato de malte; 0,05% de extrato de levedura; 0,25% de soytone; 1,5% de ágar) (BANDONI, 1972) e YMA (0,3% de extrato de malte; 0,3% de extrato de levedura; 0,5% de peptona; 1,0% de D-glicose; 2,0% de ágar) (YARROW, 1998), ambos com o antibiótico cloranfenicol e pH ajustado para 4,0. As placas foram incubadas a 22°C no escuro e monitoradas diariamente para isolamento das colônias (Figura 12-C). Estas foram selecionadas com base em seus diferentes morfotipos e, purificadas (Figura 12-D). Todas as estirpes foram estocadas em meio Gymp (2,0% de D-

glicose; 1,0% de extrato de malte; 0,5% de extrato de levedura; 0,2% de NaH_2PO_4 ; 2,0% de ágar) a 6° C (Figura 12-E) (ROSA et al., 1995) e em glicerol 15% a -85°C (Figura 12-F) (CENTRAALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURES, 2008).

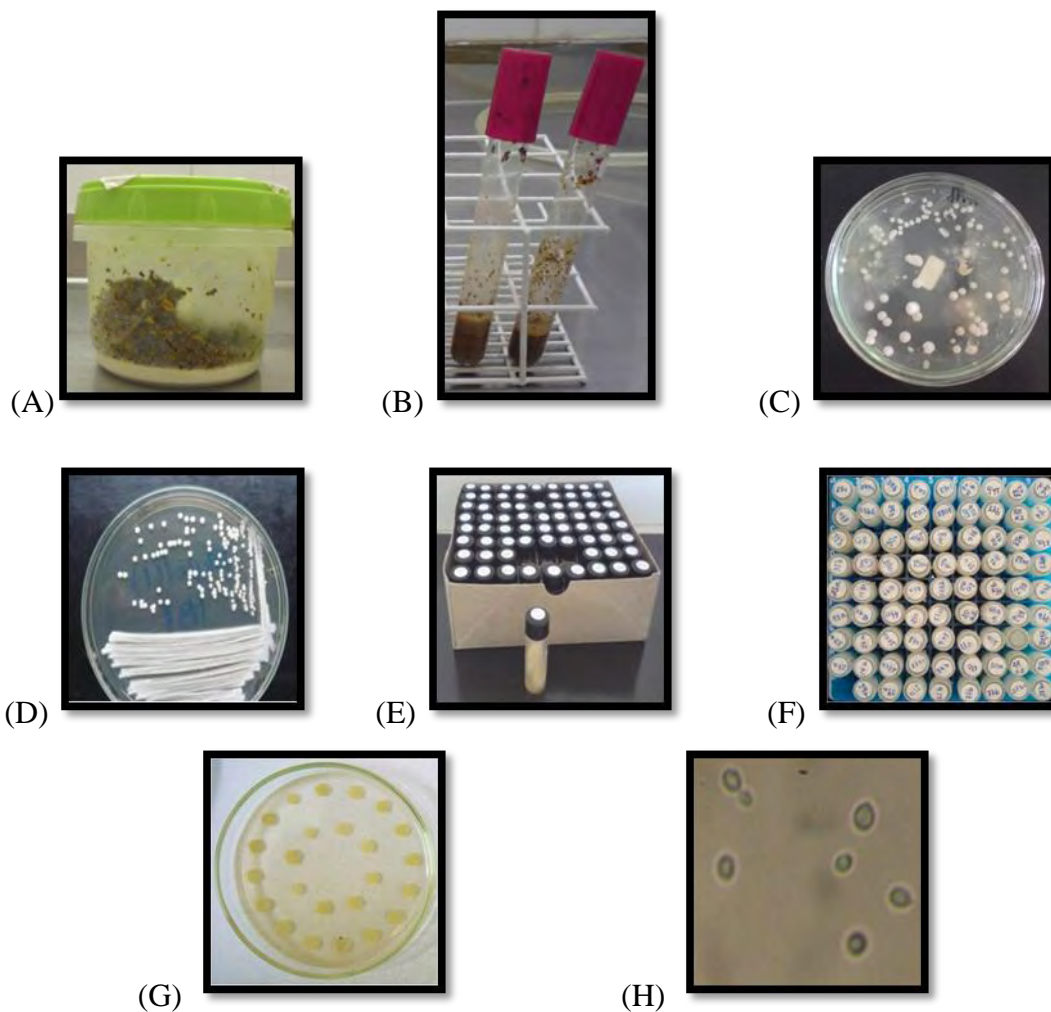


Figura 12 – (A) Recipiente com o jardim de fungo; (B) Tubos com a suspensão dos jardins de fungo; (C) Isolamento dos morfotipos; (D) Purificação da estirpe; (E) Estoque em Gyp; (F) Estoque em ultrafreezer a -80°C; (G) Teste de assimilação; (H) Morfologia celular.

4.3. Caracterização das leveduras utilizando critérios morfológicos e fisiológicos

Inicialmente foi realizada uma caracterização da morfologia colonial (Figura 12-D) e celular (Figura 12-H) de cada estirpe e, em seguida, foram iniciados os testes fisiológicos (Figura 12-G), utilizando metodologia descrita em Barnett, Payne e Yarrow (2000) e Yarrow (1998).

De acordo com essas análises, as estirpes semelhantes foram agrupadas, e representantes dos grupos foram utilizados para caracterização e identificação por métodos moleculares. O mesmo procedimento foi realizado com as estirpes que não se encaixaram nos agrupamentos.

4.4. Caracterização por métodos moleculares

4.4.1. Extração de DNA genômico

Com a intenção de refinar os agrupamentos obtidos na etapa anterior, testes baseados em análises moleculares foram utilizados visando à identificação taxonômica (SAMPAIO et al., 2001; ALMEIDA, 2005).

O DNA genômico de cada isolado foi extraído seguindo a metodologia de Sampaio et al. (2001). Duas alçadas da levedura cultivada em meio ágar YMA por 48 h a 25°C foram suspensas em 500µL do tampão de lise TNES (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 200 µL de micro-esferas de vidro (Sigma-Aldrich ®, 212-300 µm de diâmetro) esterilizadas foram adicionadas. Em seguida, foram levados ao vórtex por 4 minutos e os tubos foram incubados por 1 hora a 65°C, repetindo esse procedimento duas vezes. A suspensão foi, então, centrifugada por 15 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante (~400µL), o qual contém o DNA genômico bruto, foi separado e armazenado em tubos de 1,5mL a -20° C.

Para a confirmação da presença de DNA, utilizou-se a eletroforese em gel de agarose 1,0% (Analytical Grade, Promega Corp.) em tampão TBE 1X. Nos pocinhos, foram aplicados 2,0 µL do DNA bruto misturado com 2,0 µL do corante Loading Buffer. Foi utilizado, também, 4,0 µL do DNA ladder (Promega Corp.) de 1.000 pares de bases (pb) como marcador de peso molecular para análise do tamanho de bandas. Após 40 minutos de corrida do gel a 100 V e 50 mA, ele foi corado em uma solução de brometo de etídeo diluído em TBE 1X por, aproximadamente, 20 minutos. Foi feito o descoramento em tampão TBE 1X por, aproximadamente, 5 minutos e, então, o gel foi fotografado com auxílio do software Kodak Digital Science v.1.0.

4.4.2. Agrupamento das estirpes por MSP-PCR

Estirpes representantes dos vários agrupamentos realizados com base nas características fenotípicas foram utilizadas para um segundo agrupamento através do método

de “fingerprinting” utilizando microsátélites (MSP-PCR) de acordo com Meyer et al. (1993). Nesta etapa, misturou-se 4,0 µL de dNTPs (1,25mM de cada base), 2,5 µl de Buffer 10X, 1,0 µL de MgCl₂ (50mM), 0,2 µL de Taq-polimerase (5 U/µL), 10,3 µL de água Milli-q estéril, 2,0 µL do primer (GTG)₅ e 5 µL de DNA (diluído 750 vezes). O programa utilizado no termociclador (PTC-100TM Programmable Thermal Controller) para a amplificação foi 95°C por 3 minutos, seguidos de 40 ciclos a 93°C por 45 segundos, 50°C por 1 minuto, 72°C por um minuto, com a extensão final de 72°C por 6 minutos.

Para verificar o padrão de bandas, realizou-se uma corrida de gel agarose 1,4% em TBE 0,5X a 90V e 50 mA por 3 horas. Em seguida, o gel foi corado por 25 minutos em brometo de etídeo e descorado a seguir por 5 minutos.

Uma vez concluída esta etapa, foi possível reavaliar e, caso necessário, reagrupar os isolados.

4.4.3. Amplificação – PCR

A partir desse segundo agrupamento, foram selecionadas estirpes representantes de cada grupo para concluir a identificação, a qual foi obtida pela análise dos resultados do sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior (26S) do rDNA (KURTZMAN; ROBNETT, 1998). O mesmo procedimento foi aplicado às estirpes únicas ou que não foram bem caracterizadas pelos testes anteriores.

Para tanto, foi preparada uma mistura com 8,3 µL de água Milli-q estéril, 2,0 µL de cada primer (NL1 e NL4, a 10 mM cada), 2,5 µL de Buffer 10X, 1,0 µL de MgCl₂ (50 mM), 4,0 µL de dNTPs (1,25 mM), 0,2 µL de Taq-polimerase (5 U/µL) e 5,0 µL do DNA diluído (750 vezes), totalizando 25µL de volume final (SAMPAIO et al., 2001). Após, a mistura foi agitada no vórtex por alguns segundos e, logo em seguida, foi realizado uma breve centrifugação. As amostras foram colocadas no termociclador e foi utilizado o programa: 96 °C por 3min, seguido de 35 ciclos a 96 °C por 30s, 61 °C por 45s e 72 °C por 1min.

A amplificação foi realizada com o iniciador forward NL1 (5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG3') e o reverse - NL4 (5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG3') (INÁCIO et al., 2005). Para se conferir a presença e tamanho do fragmento de DNA, os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1% (1g de agarose (Promega Corporation, USA) para cada 100 mL de tampão TBE 1X (Tris-borato-EDTA)), onde foram aplicados 2,0 µL do produto da amplificação e 2,0 µL de corante em cada pocinho, além de 5,0 µL do DNA marcador ladder (Promega – G571A) de

1000 pb. Após 40 minutos de corrida do gel a 100 V e 50 mA, este foi corado em uma solução de brometo de etídeo diluído em TBE 1X por, aproximadamente, 20 minutos. Então, foi feito o descoramento em tampão TBE 1X por, aproximadamente, 5 minutos e o gel foi visualizado através do transiluminador Eletronic MultiwaveTM Transilluminator e fotografado com auxílio do programa Kodak Digital Science ID[®].

4.4.4. Purificação dos produtos de amplificação

O resultado da amplificação foi purificado com o kit “*GFX* PCR DNA and gel band purification kit” (GE Healthcare). O DNA purificado foi quantificado em equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Para confirmar a qualidade da purificação, correu-se o gel de agarose 1% (em TBE 1X), juntamente com o marcador “DNA Ladder 1 kb”, para conferir se o DNA purificado estava presente.

4.4.5. Amplificação e Purificação da reação de seqüenciamento

Para a reação de seqüenciamento da região D1/D2 da subunidade 26S do rDNA foram utilizados os mesmos iniciadores NL1 e NL4 conforme descrito em Inácio et al. (2005).

Preparou-se uma mistura com 2,0 µL de Save Money, 0,5 µL de primer (NL1 ou NL4, a 10mM cada), 4,5 µL de água Milli-q estéril, 2,0 µL de DYEnamic e 1,0 µL do DNA purificado, para uma amostra Forward (F), utilizando o primer NL1, e uma amostra Reverse (R), utilizando o primer NL4, de acordo com as instruções do manual “DYEnamicTM ET Dye Terminator Kit” (GE Healthcare).

Utilizou-se o seqüenciador no programa: 25 ciclos de 95 °C por 20s, seguido de 50 °C por 15s e 60°C por 60s.

Para purificação dessa reação, seguiu-se as instruções do manual de instruções “DYEnamicTM ET Dye Terminator Kit” (GE Healthcare). Logo, adicionou-se 1,0 µL de acetato de sódio (1M) e misturou-se bem. Após esse procedimento, 80 µL de etanol 95% foram adicionados, misturados, com auxílio do vórtex, e centrifugados por 15 minutos a 12.000 rpm. Removeu-se o sobrenadante, e foram adicionados 150 µL de etanol 70%, sendo centrifugado por 8 minutos a 12.000rpm, removendo em seguida o sobrenadante. As amostras foram armazenadas no escuro e em temperatura ambiente por, no mínimo, 1 hora.

4.4.6. Aplicação das amostras no gel de poliacrilamida

As amostras foram ressuspendidas com 3.0 µL de formamida. Após, foram agitadas no vórtex e centrifugadas por alguns segundos. Depois desse procedimento, foram colocadas no gelo e em ambiente escuro até serem aplicadas no sequenciador.

As seqüências foram obtidas com o equipamento ABI Prism® 377 DNA (Applied Biosystems Inc., Foster City, Calif.), corrigidas manualmente e editadas utilizando o programa Bioedit v.7.0.5.3. (HALL, 1999). Os resultados foram comparados com seqüências homólogas obtidas no banco de dados do GenBank/NCBI (National Center for Biotechnology Information) por meio da ferramenta de busca BLAST disponível no site do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) (ALTSCHUL et al., 1997).

4.4.7. Outros marcadores de rDNA

A região ITS1-5.8rDNA-ITS2 de algumas estirpes também foi seqüenciada. Dessa forma, foram realizados os passos 3.4.3, 3.4.4, 3.4.5 e 3.4.6, mudando os iniciadores da região D1/D2 (primers: NL1 e NL4) pelos iniciadores da região ITS (primers ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) e ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG)) (10 µL) (WHITE et al., 1990). Na amplificação do DNA (item 3.4.3.), utilizou-se o seguinte programa no termociclador: 94°C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos.

4.5. Análise estatística

A diversidade de leveduras foi analisada em ninhos das Attini *Mycocrepurus goeldii*, *Trachymyrmex* sp e *Atta sexdens rubropilosa*, em virtude do maior número de ninhos coletados. Para isto, foi utilizado o Índice de Shannon-Weaver, pois é um índice freqüentemente utilizado para calcular a diversidade de espécies, já que é independente do tamanho da amostra e tem distribuição normal, contanto que os valores de N (todos os valores de importância) sejam inteiros (ODUM; BARRETT, 2008).

Este índice dá uma medida do grau de incerteza na identificação de um determinado isolado, a partir de uma determinada amostra, e será tanto maior quanto maior for a

diversidade da população presente na amostra (INÁCIO, 2003). O Índice de Shannon-Weaver foi determinado, por meio do programa Bioestat 5.0., a partir da equação:

$$H = - \sum (p_i \times \ln p_i)$$

em que p_i representa a abundância relativa da i -ésima espécie de levedura numa amostra.

4.6. Análise filogenética

As seqüências dos isolados TT12, TD38 e TD49 foram comparadas com estirpes-tipo depositadas na base de dados do GenBank. As seqüências mais similares foram utilizadas na análise filogenética e foram alinhadas usando o software Bioedit versão 7.0.9.0. Essas análises foram efetuadas utilizando-se o software PAUP versão 4.0b10 (SWOFFORD, 2002) e foram inferidas utilizando o algoritmo Neighbor-joining com modelo de substituição Kimura 2-parâmetros (KIMURA, 1980) e com suporte de valores de bootstrap de 1000 pseudo-réplicas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas 152 estirpes de leveduras a partir de quarenta e quatro ninhos de formigas Attini das seguintes espécies: *Mycocepurus goeldii*, *Myrmicocrypta* sp, *Mycetophyax morschi*, *M. simplex*, *Sericomyrmex* sp, *Trachymyrmex* sp, *Acromyrmex* sp, *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta bisphaerica* e *Atta capiguara*.

5.1. Leveduras associadas a ninhos de Paleoattini

5.1.1. Leveduras associadas a ninhos de *Mycocepurus goeldii*

São escassos os estudos em relação à biologia e comportamento de *Mycocepurus goeldii* e não há relatos na literatura sobre a ocorrência de leveduras em ninhos dessas formigas.

Os jardins de fungos de oito ninhos dessa espécie foram coletados em Botucatu (SP), sendo obtidas **quarenta e quatro** estirpes em sete desses ninhos, uma vez que não foram encontradas leveduras no ninho FCPAR270208-02 (Apêndice A).

Os ninhos FCPAR270208-01, FCPAR270208-02, FCPAR270208-03 e FCPAR270208-04 foram coletados no dia 27/02/2008 e os ninhos FCP040308-01, FCP040308-02, FCP040308-03 e FCP040308-04 foram coletados no dia 04/03/2008. O material coletado foi processado no laboratório após 4-6 dias da coleta.

Após os agrupamentos, as representantes de cada grupo e as estirpes únicas foram seqüenciadas (Apêndice B).

As quarenta e quatro estirpes estavam distribuídas em onze espécies, conforme a tabela 3. Quando a pesquisa no GenBank através da ferramenta Blast resultou em homologia de seqüências igual ou superior a 99%, as espécies foram consideradas idênticas (KURTZMAN; ROBNETT, 1998). Assim, com exceção da estirpe TT12, todas as espécies encontradas já eram conhecidas.

Tabela 3 - Espécies de leveduras isoladas em jardins de fungo de *Mycocepurus goeldii*

Espécies	Total
<i>Candida naeodendra</i>	3
<i>Candida</i> sp	1
<i>Pichia guilliermondii</i>	11
<i>Pichia kluyveri</i>	1
<i>Pichia caribbica</i>	2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	1
<i>Cryptococcus laurentii</i>	21
<i>Cryptococcus cf podzolicus</i>	1
<i>Rhodotorula pacifica</i>	1
<i>Trichosporon coremiiforme</i>	1
Total	44

A predominância do gênero *Cryptococcus* foi evidente nesses ninhos e, em especial, a espécie *C. laurentii*. Esse gênero é um dos mais abundantes na natureza, e essa prevalência se dá, possivelmente, pela presença de uma cápsula protetora que permite resistência a condições adversas do ambiente, como escassez de nutrientes e períodos de dessecação (GATES; THORKILDSON; KOZEL, 2004). Além disso, essas leveduras também são altamente heterogêneas em relação às habilidades nutricionais, permitindo a utilização aeróbica de uma ampla diversidade de compostos orgânicos (RHODE, 2005).

Cryptococcus laurentii representou 47,7% dos isolados. Pelos padrões de bandas apresentados no MSP-PCR, essas estirpes foram distribuídas em 12 grupos (11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 e 24) sendo que estirpes únicas representaram nove grupos (11, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 22 e 24) (Apêndice C). Possivelmente, a constituição desses grupos se deu devido à variabilidade intra-específica dessa espécie, já que houve divergências em algumas bandas (MEYER et al., 1993; LIBKIND et al., 2007). Ao se alinharem as sequências dos 12 representantes identificados como *C. laurentii* observou-se que a maioria das sequências, com exceção da pertencente ao grupo 20, apresentou diferença de pelo menos um par de base em relação aos demais.

C. laurentii possui distribuição bem ampla no ambiente, o que pode explicar a grande prevalência dessa espécie neste caso. No estudo de Slaviková e Vadkertiová (2000), *C. laurentii* foi encontrada no solo de três florestas situadas na Eslováquia e predominante em

duas delas. Ela ocorre também com frequência em pastos, savanas, solos úmidos e ricos em nutrientes, porém também são encontradas em solos pobres em material orgânico e com baixa umidade (SPENCER; SPENCER, 1997). Outros pesquisadores também encontraram essa levedura associada a outras formigas Attini, como em jardim de fungo e em folhas coletadas por *Atta sexdens rubropilosa* (CARREIRO et al., 1997), no exoesqueleto de *Atta capiguara* e *A. laevigata* (PAGNOCCA et al., 2008) e em jardins de fungo de *Atta texana* (RODRIGUES et al., 2009).

Um único isolado de *Cryptococcus* cf *podzolicus* foi também encontrado em jardins de fungo ninhos de formigas Attini, porém da espécie *Atta texana* (RODRIGUES et al., 2009). Essa espécie foi observada na rizosfera de ginseng (*Panax ginseng*) em Chungnam na Coreia (HONG et al., 2006) e também apresentou dominância na rizosfera de duas espécies de plantas, *Taraxacum officinale* e *Ajuga reptans*, em solos podzólicos localizados na cidade de Chernogolovka na Rússia durante 1 ano de pesquisa (GOLUBTSOVA; GLUSHAKOVA; CHERNOV, 2007).

A segunda espécie mais frequente foi *Pichia guilliermondii* com onze isolados (25%). Nessas estirpes, pouca variação em relação aos testes de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio foi encontrada. Também encontramos algumas variações no perfil de bandas do microsatélite (Apêndice D). Após alinhamento das seqüências dos quatro grupos (2-4-5-8) representantes de *Pichia guilliermondii*, observou-se que o grupo 4 foi o que mais divergiu em relação aos outros grupos, apresentando cinco pares de bases diferentes dos demais.

Apenas um isolado da espécie *Pichia kluyveri* foi encontrado nesses ninhos. Ela é comumente encontrada em frutos (STARMER; GANTER; ABERDEEN, 1992), exudatos de árvores, em alimentos e na superfície corpórea de *Drosophila* (PIMENTA et al., 2009).

Também pertencentes ao gênero *Pichia*, duas estirpes de *P. caribbica* foram observadas em ninhos de *Mycocepurus goeldii*. Descrita recentemente, essa espécie tem muita semelhança com *P. guilliermondii*, pois respondem igualmente aos testes fenotípicos, dificultando a diferenciação entre elas (VAUGHAN-MARTINI et al., 2005). As diferenças nas regiões usualmente utilizadas para análise genômica também são poucas, pois *P. caribbica* e *P. guilliermondii* divergem em três nucleotídeos nos domínios D1/D2 da região 26S do rDNA e em quatro pares de base na região ITS (VAUGHAN-MARTINI et al., 2005). Essa levedura foi isolada pela primeira vez em cana-de-açúcar e outro isolado foi observado em um paciente com infecção adquirida possivelmente durante uma viagem ao Caribe (VAUGHAN-MARTINI et al., 2005). Associada a insetos, *P. caribbica* também foi a única

isolada de intestino de *Aedes aegypti* em um estudo pioneiro sobre sua microbiota (GUSMÃO et al., 2007).

Saccharomyces cerevisiae, representada pela estirpe TT11, pode ser encontrada em habitats naturais associada a frutos, solo e insetos (KVITEK; WILL; GASCH, 2008), como no solo de florestas de carvalho (SNIEGOWSKI; DOMBROWSKI; FINGERMAN, 2002), em solos da Califórnia e da Flórida, com alto teor de umidade e de compostos orgânicos (SPENCER; SPENCER, 1997). Até o momento, essa espécie não havia sido encontrada associada a ninhos de Attini, porém o gênero *Saccharomyces*, representado pela espécie *S. exiguus*, foi encontrado em jardim de fungo de *Atta texana* (RODRIGUES et al., 2009). Essa estirpe pode ser de interesse industrial, já que é amplamente utilizada em processos de fermentação de álcool (HAHN- HÄGERDAL et al., 2007), vinho (SODEN et al., 2000; LOPES et al., 2002) e pães (LEGRAS et al., 2007).

Apesar dos gêneros *Candida*, *Trichosporon* e *Rhodotorula* serem isolados tipicamente do solo e encontrados em associação com *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta texana* (CARREIRO et al., 1997; RODRIGUES et al., 2009) e também com *Myrmicocrypta*¹ (PAGNOCCA et al., 2009), nesses ninhos eles ocorreram de forma aparentemente ocasional. Interessante foi o caso da estirpe TC18, identificada como *Rhodotorula pacifica*. Esta espécie foi descrita recentemente, isolada de sedimentos no oceano Pacífico (NAGAHAMA; HAMAMOTO; HORIKOSHI, 2006), evidenciando um novo local de ocorrência.

O gênero *Trichosporon* é habitante comum do solo e apresenta várias espécies consideradas patogênicas (CHOWDHARY et al., 2004; MIDDELHOVEN, 2003; RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2007). A única representante do gênero *Trichosporon* encontrada nesses ninhos foi *T. coremiiforme* (TC16). Trata-se de uma espécie relacionada a casos clínicos, em infecções superficiais e sistêmicas (MIDDELHOVEN, 2003), responsável por infecção do trato gastrointestinal de porcos em fazendas na Alemanha (URUBSCHUROV et al., 2008) e também encontrada em solos e em pássaros (MIDDELHOVEN, 2003). Neste caso, encontrar ninhos de formigas albergando espécies patogênicas é um dado muito interessante. No trabalho de Pagnocca e colaboradores (2009), foi encontrada uma estirpe de *Candida dubliniensis* no depósito de lixo de *Myrmicocrypta camargoi* a qual também vem sendo relacionada a casos clínicos.

Três estirpes do gênero *Candida* (TC1, TC2 e TC3) foram semelhantes entre si e diferiram em apenas dois nucleotídeos (99% de similaridade) de *C. naeodendra*, a qual foi

¹ *Myrmicocrypta camargoi* (SOSA-CALVO; SCHULTZ, 2010). Espécie nova do gênero *Myrmicocrypta*, a qual foi descrita após a publicação do artigo de Pagnocca e colaboradores (2009).

isolada de carcaça de besouro na África do Sul (VAN der WALT; JOHANNSEN; NAKASE, 1973) e, recentemente, encontrada na areia de três praias do sul da Florida, EUA (VOGEL et al., 2007).

No caso específico da estirpe TT12, o sequenciamento dos domínios D1/D2 da região 26S do rDNA divergiu em oito pares de base (98%) em relação à *Pichia mexicana*. Portanto, a fim de se confirmar a possibilidade desta estirpe vir a ser uma espécie ainda não descrita, foi realizado o sequenciamento da região ITS. O resultado mostrou que uma diferença em doze pares de base (97% de identidade) com *Candida insectorum* (Apêndice E). Como os dois sequenciamentos possuem similaridade menor que 99% e os resultados foram divergentes, concluímos que esta estirpe é uma espécie ainda não descrita.

No meio YMA depois de três dias a 25°C, a colônia dessa estirpe apresentou-se de branca a creme, com superfície lisa, redonda e butírica (Apêndice AI-A). No mesmo meio de cultura e com as mesmas condições de armazenamento, a morfologia celular mostrou células redondo-ovaladas, com diâmetro entre de 2,5 a 3,0 µm, brotamento multipolar, sem formação de pseudomicélio ou micélio (Apêndice AI-B). Não foram observados esporos sexuais.

Os testes de assimilação de compostos de carbono e nitrogênio podem ser observados no Apêndice AE e AF, respectivamente.

A análise filogenética mostrou que, nos domínios D1/D2 da região 26S do rDNA, a espécie *Candida* sp apresentou proximidade com *Candida globata* e *C. aaseri* (Apêndice AG). Já na região ITS, apresentou uma grande proximidade com a espécie *Candida insectorum* (Apêndice AH).

O gênero *Candida* é heterogêneo, sendo algumas espécies representadas por apenas um isolado. Esse grupo de ascomicetos anamórficos possui variações nos testes de assimilação de fonte de carbono e nitrogênio, na forma e no tamanho de suas células. Seus representantes podem ou não fermentar açúcares (MEYER; PAYNE; YARROW, 1998). Compreende, aproximadamente, 25% das espécies de leveduras descritas (WANG et al., 2008). As espécies desse gênero estão amplamente distribuídas nos mais diversos habitats, como solo, ambientes marinhos e algumas espécies são patogênicas (WANG et al., 2008; BARBOSA et al., 2009; SUH; NGUYEN; BLACKWELL, 2008).

Candida spp possuem importante potencial biológico e biotecnológico, apresentando aplicações na agricultura, como o caso de *C. tropicalis* e *C. utilis* que utilizam resíduos agrícolas, como farelo de trigo, farelo de aveia e casca de arroz, em processos fermentativos, produzindo biomassa com consideráveis quantidades de proteínas as quais podem ser utilizadas no enriquecimento de compostos agrícolas e em alimentos de animais (DIMOVA et

al., 2010). A espécie *C. tropicalis* mostrou potencial em produzir etanol a partir da xilose (LIN; TANAKA, 2006) e também produziu xilitol através da conversão biológica da xilose (KIM et al., 2002). Em indústrias químicas, *C. rugosa* pode ser utilizada na produção de lipases (MONTESINOS; DAEMAU; CASAS, 2003).

Também algumas espécies desse gênero são patogênicas ao homem. Dentre elas, pode-se enfatizar a *C. albicans*, fungo patogênico mais comum aos seres humanos, que pode causar infecções superficiais e sistêmicas (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003).

Os limites taxonômicos desse gênero continuam amplos e essencialmente qualquer levedura assexuada que não se enquadre nos critérios de outros gêneros, será colocada no gênero *Candida*, com exceção de espécies que produzam ácido acético, possuam brotamento bipolar, células triangulares, formem blastoconídeos e produzam pigmentos carotenóides, entre outros (MEYER; PAYNE; YARROW, 1998).

Nesse trabalho, o gênero *Torulaspora* ocorreu pela primeira vez em associação com ninhos de Attini, apesar de ter sido isolada somente uma estirpe de *T. delbruecki*. Essa espécie foi encontrada na superfície de folhas de mamoeiro em pesquisa realizada em duas áreas geográficas situadas em Camarões (STRINGINI et al., 2008), além de outro estudo que relatou sua existência em exudatos de árvores (PIMENTA et al., 2009). Assim como *Saccharomyces cerevisiae*, essa espécie possui alto potencial industrial na fermentação de vinho, devido à baixa produção de produtos indesejáveis, como o ácido acético (RENAULT et al., 2009).

De acordo com os resultados, o ninho do qual foi isolado um maior número de leveduras foi o FCP040308-03. Entretanto, conforme observado pelo Índice de Shannon-Wiener (Apêndice F), a maior diversidade foi encontrada no ninho FCPAR270208-01.

5.1.2. Leveduras associadas ao jardim de fungo de ninho de *Myrmicocrypta* sp

O jardim de fungo de um ninho único de *Myrmicocrypta* sp (JSC080924-01) foi coletado em Uberlândia no período de 21 a 25/09/2008, sendo analisado no laboratório no dia 29/09/2008. Foram obtidas **dezoito** estirpes de leveduras desse ninho (Apêndice G), sendo este o jardim de fungo que se encontrou o maior número de isolados neste trabalho. Após as análises morfológicas, testes fisiológicos e o resultado do MSP-PCR, estirpes representantes foram escolhidas para serem identificadas (Apêndice H).

De acordo com a Tabela 4, novamente foi encontrada *P. caribbica*, sendo essa espécie a única encontrada nesse estudo em duas Paleoattini.

Tabela 4 - Espécies de leveduras representantes dos isolados em um único jardim de fungo de *Myrmicocrypta* sp

Espécies	Total
<i>Pichia caribbica</i>	9
<i>Candida railenensis</i>	8
<i>Trichosporon loubieri</i>	1
Total	18

Candida railenensis que também foi encontrada com preponderância nesse ninho pode estar associada a plantas (SERJEANT et al., 2008), sendo encontrada em abundância em árvores e frutos de carvalho inglês (*Quercus robur* L.) (ISAEVA et al., 2009). No Brasil foi isolada de frutos e da superfície corpórea de *Drosophila* no Parque Estadual Rio Doce (MG) (PIMENTA et al., 2009). O único isolado de *Trichosporon loubieri* será comentado posteriormente, pois foi encontrado também em ninhos de *Trachymyrmex* sp.

Recentemente, Pagnocca et al. (2009) divulgaram um estudo sobre a presença de leveduras em um ninho da espécie *Myrmicocrypta camargoi*. Nele, foi encontrado um representante de cada uma das seguintes espécies: *Candida dubliniensis*, *C. oleophila*, *Hanseniaspora uvarum*, dois de *Cryptococcus haglerorum* e trinta e quatro de uma espécie, até então não conhecida, a qual foi denominada *Trichosporon chiarelii*. Até o momento, esse estudo é o único relacionado à diversidade de leveduras em ninhos de Attini basais. Os resultados dos dois trabalhos, o de Pagnocca e colaboradores (2009) e este, mostram que não houve similaridade em relação à composição de espécies embora ambos tenham evidenciado baixa diversidade de espécies. Ainda pode ter contribuído para isso o fato de que os ninhos foram coletados de locais muito distantes entre si, ou seja, o ninho descrito em Pagnocca et al. (2009) foi coletado em Botucatu-SP e o ninho pertencente a esse estudo situava-se na Estação Ecológica do Panga, em Uberlândia-MG.

5.2.1. Neoattini basal

5.2.1.1. Leveduras associadas a ninhos de *Mycetophylax morschi* e *M. simplex*

Os jardins de fungo de ninhos dessas Neoattini basais foram coletados no dia 9/03/2009 em Florianópolis-SC, sendo dois da espécie *Mycetophylax morschi* e um de *M.*

simplex. Desta espécie também foi coletado outro jardim de fungo em Taquara-RS. Os quatro ninhos foram recolhidos entre os dias 6 e 7/03/2009 e analisados no laboratório no dia 17/03/2009.

Nos dois jardins de fungo de *Mycetophylax simplex*, CTL090307-01 e AR090307-02, e em um jardim de *M. morschi*, TRS090306-05, não foi possível isolar levedura.

Do ninho de *Mycetophylax morschi* (AR090306-01), foram isoladas **cinco** estirpes, todas com características morfológicas semelhantes. Possuem colônias redondas com margem filamentosa, convexas e com coloração branca, suas células são redondas e formam micélio. O MSP-PCR comprovou a semelhança entre essas estirpes (Apêndice I) e o isolado TE 29 foi aleatoriamente escolhido para seqüenciamento. O resultado mostrou 99% de similaridade com *Trichosporon mycotoxinivorans* (Apêndice J).

Trichosporon mycotoxinivorans foi descrita em 2004 por Molnár e colaboradores, os quais a encontraram associada ao intestino posterior do térmita *Mastotermes darwiniensis*. Ainda, Hickey et al. (2009) relataram, pela primeira vez, um caso de óbito em consequência de uma infecção pulmonar em um paciente com fibrose cística, o que indica que esta espécie pode ser oportunista, assim como outras espécies deste gênero.

Essa espécie está relacionada com *Trichosporon loubieri* com base nas análises filogenéticas baseadas nos domínios D1/D2 da região 26S do rDNA. Nesta região, as duas espécies diferem em nove pares de bases (MOLNÁR et al., 2004).

5.2.2. Superiores não cortadeiras de folhas

5.2.2.1. Leveduras associadas a ninhos de *Sericomyrmex* sp

Somente um jardim de fungo do ninho de *Sericomyrmex* sp (SES080922-01) foi coletado em Uberlândia (MG) no dia 22/09/2008, sendo este analisado no laboratório no dia 29/09/2008 (Apêndice K).

Desse ninho, o único isolado foi identificado como *Sporobolomyces* sp, o qual foi encontrado na filosfera de plantas da Tailândia (Apêndice L). Essa estirpe (TD38) possui colônia cor salmão (Apêndice AL-C), células alongadas (Apêndice AL-A) e não fermenta glicose, além de ter um aroma agradável. Essa estirpe apresentou 99% de similaridade nos domínios D1/D2 da região 26S do rDNA com a estirpe *Sporobolomyces* sp TY-241 (AY313053.1) divergindo em dois nucleotídeos. A região ITS desta estirpe também foi

seqüenciada (Apêndice M), mostrando 98% de similaridade com *Sporobolomyces* sp TY-241 diferindo em oito nucleotídeos.

5.2.2.2. Leveduras associadas a ninhos de *Trachymyrmex* sp

Os treze ninhos de *Trachymyrmex* sp foram coletados em três regiões distintas. Em Rio Claro (SP), três jardins de fungo dessa espécie (SES080618-01, SES080618-02, SES080618-03) foram coletados em 18/06/2008 e analisados no laboratório no dia posterior. Outros seis jardins de fungos (SES080921-01, SES080921-03, SES080922-03, SES080922-04, SES080924-02, SES080925-01) foram coletados na região de Uberlândia (MG) no período de 21 a 25/09/2008, sendo esses analisados no dia 30/09/2008. Da região sul do país, oriundos da cidade de Taquara (RS) foram analisados dois jardins de fungo (SES090309-03 e SES090309-04) e dois materiais de descarte (SES090310-02 e SES090309-02, provenientes de Taquara-RS e Canela-SC, respectivamente), após, aproximadamente, sete dias da coleta.

Desses ninhos foram isoladas **trinta e nove** estirpes, distribuídas em seis ninhos (Tabela 5). Dos ninhos SES080921-01, SES080922-03, SES080922-04, SES080925-01 e SES090309-04 e do material de descarte de SES090310-02 e SES090309-02, não foram isoladas leveduras (Apêndice N). Provavelmente, o tempo em que estes ninhos ficaram armazenados nos recipientes interferiu nessas análises.

Após o agrupamento, realizado através do MSP-PCR, observamos vinte e um grupos, sendo que quatorze deles possuíam estirpes únicas (Apêndice O).

Do jardim de fungo do ninho SES090309-03 coletado na região Sul, apenas três estirpes foram isoladas e, de acordo com os testes fisiológicos e o MSP-PCR essas estirpes são representantes de duas espécies. Dos ninhos SES080618-01, SES080618-02 e SES080618-03, coletados em Rio Claro foram isoladas dezoito estirpes, sendo essas divididas em três espécies. Dos ninhos SES080921-03 e SES080924-02 encontrados em Uberlândia (MG), foram isoladas também dezoito estirpes pertencentes a cinco espécies.

A espécie *Pichia guilliermondii* (38,46%) foi a que predominou nesses ninhos. O gênero *Pichia* tem sido observado constantemente em associações com insetos, podendo ser encontrado no interior do corpo e no intestino de moscas (*Drosophila* sp e *Suilla* sp), tesourinhas (*Labidura* sp), abelhas (*Andrena* sp) e formigas (*Iridomyrmex humilis*), coletados em áreas agrícolas na Itália (ZACCHI; VAUGHAN-MARTINI, 2002). Pôde também ser observada a prevalência de espécies de *Pichia* associadas à *Drosophila* na pesquisa feita por Morais e Rosa (2000). Já em ninhos de formigas Attini, esse gênero foi isolado do

exoesqueleto de *Atta sexdens rubropilosa* (CARREIRO et al., 1997). Essa forte interação entre *Pichia* spp e insetos se dá possivelmente por algumas espécies desse gênero possuírem ascósporos “hat-shaped” (em forma de chapéu), o que pode auxiliar na dispersão do esporo pelos insetos (SPALAFORA, 2002).

P. guilliermondii também foi encontrada (onze isolados) em ninhos de *Mycocephurus goeldii* estudados no presente trabalho. Observando sua distribuição nos ninhos estudados, essa espécie se concentrou nos três ninhos coletados em Rio Claro, sendo a espécie que mais predominou neles, pois de dezoito isolados, quinze pertencem a esta espécie. Possivelmente, essa dominância pode estar relacionada com o substrato utilizado para forrageamento.

Tabela 5 - Espécies de leveduras representantes dos isolados de jardins de fungo de *Trachymyrmex* sp.

Espécies	Total
<i>Candida gorgasii</i>	10
<i>Pichia guilliermondii</i>	15
<i>Asterotremella humicola</i>	2
<i>Cryptococcus laurentii</i>	1
<i>Cryptococcus</i> cf. <i>podzolicus</i>	2
<i>Cryptococcus</i> sp	1
<i>Rhodotorula</i> sp	1
<i>Sporobolomyces</i> sp	1
<i>Trichosporon chiarellii</i>	2
<i>Trichosporon loubieri</i>	4
Total	39

As duas espécies de *Cryptococcus* encontradas nos ninhos de *Trachymyrmex* sp., *C. laurentii* e *C. cf podzolicus* também foram observadas em ninhos de *Mycocephurus goeldii*.

A espécie *Trichosporon loubieri* foi encontrada no ninho SES080924-02 de *Trachymyrmex* sp (TD (34-35-36-37)) e também em ninho de *Myrmicocrypta* sp (TD32). Essa espécie é considerada um patógeno humano capaz de causar infecções invasivas em pacientes imunodeprimidos, com dois casos relatados recentemente (MARTY et al., 2003; PADHYE et al., 2003). *T. loubieri* também foi observado em solo contaminado por diesel na Holanda, em leite produzido por uma vaca com mastite na Austrália, em leite nos Estados Unidos e na estação de tratamento de esgoto no Japão (BARNETT; PAYNE; YARROW, 2000).

Outra espécie de *Trichosporon* encontrada associada a um ninho dessa formiga foi *Trichosporon chiarellii* com duas estirpes encontradas em um ninho coletado em Taquara (RS). Essa espécie, até o momento, só foi encontrada em associação com ninhos de Attini e, neste trabalho, também foi isolada em ninho de *Acromyrmex* sp.

Foi encontrada nesses ninhos, também, a espécie *Candida gorgasii* com dez isolados, todos de um único ninho coletado em Uberlândia (MG) sendo a segunda espécie predominante. De acordo com o seqüenciamento dos domínios D1/D2 da região 26S do rDNA, a estirpe TD2 possui 98% de similaridade com *Candida gorgasii* diferindo em seis pares de bases. Com base nessa diferença, a região ITS da estirpe TD2 foi seqüenciada a fim de verificar se é uma espécie ainda não descrita. Contudo, o seqüenciamento evidenciou a similaridade em 99% com a estirpe-tipo FJ172252.1 da espécie *Candida gorgasii* (Apêndice P). Observando o resultado do microsatélite, pode-se notar a ausência de duas bandas na estirpe TD2 em relação às estirpes TD13 e TD15, as quais também pertencem à mesma espécie, indicando também variação intraespecífica (Apêndice Q).

O resultado do sequenciamento dos domínios D1/D2 da região 26S do rDNA e da região ITS mostrou que a estirpe TD 49 apresenta três (99% de identidade) e oito (98% de identidade) pares de base diferentes, respectivamente, com *Sporobolomyces* sp TY-24, a mesma espécie, ainda não descrita, próxima à estirpe TD38 encontrada em um ninho de *Sericomyrmex* sp. A estirpe TD49 possui, em meio YMA, em três dias à 25°C, colônia de coloração salmão, lisa, redonda (Apêndice AL-D) e suas células se apresentam alongadas, com brotamento bipolar e dimensões aproximadas de 7,0µm x 3,0µm (Apêndice AL-B).

Analizando sua árvore filogenética do domínio D1/D2 da região 26S do rDNA (Apêndice AJ), pode-se notar que essa estirpe fica próxima a *Sporobolomyces* TY-24, porém em clades diferentes. O mesmo ocorreu com a estirpe TD38, já que ela se aproximou tanto da estirpe TD49 quanto de *Sporobolomyces* TY-24, contudo também ficou sozinha. As estirpes TD38 e TD49 possuem divergências de quatro pares de base entre si e para confirmar essa diferença será necessário seqüenciar novamente a estirpe TD38, pois sua seqüência não está confiável.

Observando a árvore filogenética da região ITS (Apêndice AK), pode-se notar que as duas estirpes aqui encontradas, TD38 e TD49, possuem similaridade, pois suas seqüências são semelhantes, divergindo em oito pares de base de *Sporobolomyces* TY-24, e permanecem juntas em uma clade, a qual está próxima de *Sporobolomyces* TY-24. Análises posteriores indicarão se essas duas estirpes ou somente a estirpe TD49 pertencem a uma espécie ainda não conhecida.

Os testes de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio dessa estirpe podem ser observados nos apêndices AM e AN.

O gênero *Sporobolomyces* é anamórfico e se caracteriza pela formação de balistoconídio, por não hidrolizar xilose, por ter CoQ10 e CoQ10(H₂) como principais ubiquinonas e pela incapacidade de fermentar açúcares (BOEKHOUT; NAKASE, 1998). Esse basidiomiceto anamórfico e o seu gênero teleomórfico, *Sporidiobolus*, parecem estar associados à filosfera de plantas (NAKASE, 2000), e são amplamente distribuídos na natureza (BOEKHOUT; NAKASE, 1998). Em ambientes aquáticos, esse gênero também pode ser encontrado, como no trabalho de Libkind e colaboradores (2005), que isolaram espécies desses dois gêneros na Patagônia em ambientes aquáticos oligotróficos. Nesses ambientes, Hagler e Ahearn (1989) comentam que a presença desse gênero pode ser decorrente do escoamento de água da chuva das folhagens.

Dois representantes de *Asterotremella humicola* (*Cryptococcus humicola*) foram encontrados nesse ninho. Esse micro-organismo pode ser observado em vários habitats como plantas, solos e também algumas estirpes são exemplares clínicos (FELL; STATZELL-TALLMAN, 1998). De acordo com Prillinger e colaboradores (2007), as espécies *Cryptococcus longus*, *C. pseudolongus*, *C. musci*, *C. humicola* e *C. ramirezgomezianus* foram analisadas com o intuito de se entender a relação filogenética e taxonômica. Essas espécies possuem ubiquinona Q-9, e os dados filogenéticos baseados nas regiões 18S, domínio D1/D2 da região 26S e ITS1-5.8-ITS2 do DNA ribossômico formaram uma clade homogênea com 100% de confiabilidade, portanto um novo gênero, *Asterotremella*, foi proposto e essas cinco espécies foram aceitas como *Asterotremella albida*, *A. humicola*, *A. longa*, *A. musci* e *A. pseudolongus* (PRILLINGER et al., 2007).

Nesses ninhos, também foi isolada uma estirpe de *Rhodotorula* sp, a qual anteriormente só havia sido observada no reservatório de águas com alta concentração de metais e baixo pH no Cinturão piritoso Ibérico, situado na Península Ibérica. O isolado desse gênero, de acordo com os autores, pode ser autóctone (GADANHO; LIBKIND; SAMPAIO, 2006). O isolamento de *Rhodotorula* sp, até o momento não descrita, associada a ninhos de formiga amplia a sua distribuição e torna plausível a possibilidade dessa espécie vir a ser isolada de outros ambientes não extremos.

O ninho SES080921-03 coletado em Uberlândia (MG), apesar de ter sido analisado no laboratório após nove dias depois da coleta, foi o que mais se isolou leveduras (14 estirpes), sendo elas pertencentes a quatro espécies (*Candida gorgasii*, *Asterotremella humicola*, *Cryptococcus* sp e *Cryptococcus laurentii*). Conforme o Índice de Shannon-Wiener (Apêndice

R), esse ninho foi o que obteve maior diversidade ($H=0,39$). Outro ninho que apresentou diversidade alta em relação aos outros ninhos de *Trachymyrmex* sp foi SES 080921-02 ($H=0,35$) coletado em Rio Claro (SP), contudo somente sete estirpes, pertencentes a três espécies (*Pichia guilliermondii*, *Cryptococcus* cf *podzolicus* e uma estirpe do gênero *Sporobolomyces*), foram isoladas desse ninho.

5.2.3. Neoattini cortadoras de folhas

5.2.3.1. Leveduras associadas a ninhos de *Acromyrmex* sp

Foram estudados dois jardins de fungo de *Acromyrmex* sp. (TRS090309-13 e SES090307-01) coletados entre os dias 06 a 10/03/2009 nas cidades de Taquara (RS) e Florianópolis (SC), respectivamente. Em outro ninho de *Acromyrmex* sp, SES090307-02, coletado em Florianópolis (SC), a presença de levedura foi verificada apenas no material de descarte, já que nesse ninho o jardim de fungo possuía pouca quantidade de material. Esses ninhos foram levados ao laboratório e analisados no dia 17/03/2008.

O jardim de fungo do ninho de *Acromyrmex* sp, SES090307-01, originário da região de Florianópolis (SC) foi o único a não apresentar leveduras. Provavelmente, essa ausência pode ser causada pelo tempo em que esse material orgânico ficou armazenado no recipiente até o momento de sua análise.

Desses dois ninhos de Attini superiores, foram isoladas **treze** estirpes de leveduras, das quais três foram encontradas no material de descarte do ninho de *Acromyrmex* sp (Apêndice S).

No jardim de fungo do ninho *Acromyrmex* sp (TRS090309-13), obtivemos dez isolados de leveduras que possuem características semelhantes tanto na morfologia quanto nos testes fisiológicos. Analisando o perfil de bandas do MSP-PCR desses isolados, confirmou-se essa suposição (Apêndice T).

A única espécie encontrada no jardim de fungo de *Acromyrmex* sp em Taquara (RS) foi *Pichia guilliermondii* ($n=10$), a qual também foi observada associada neste trabalho a ninhos de *Mycocepurus goeldii* e *Trachymyrmex* sp (Apêndice U).

As três estirpes, pertencentes a dois grupos no MSP-PCR, isoladas do material de descarte possuem similaridade de 98% com a espécie recentemente descrita *Trichosporon chiarellii* (PAGNOCCA et al., 2009). Como essas estirpes possuem identidade abaixo de

99%, a região ITS foi seqüenciada e, conforme o resultado do seqüenciamento dessa região, constatou-se que realmente são idênticas à *Trichosporon chiarellii*, já que possuem 99% de similaridade a essa espécie (Apêndice V). Esta espécie foi encontrada recentemente associada a um ninho de *Myrmicocrypta camargoi*, uma Attini basal (PAGNOCCA et al., 2009) e, neste estudo, foi encontrada também em *Trachymyrmex* sp coletado em Taquara (RS). Logo, essa espécie, até o momento, foi encontrada associada a três gêneros de Attini coletados em regiões distintas, podendo indicar que esses ninhos são um micro-ambiente favorável à *T. chiarellii*.

Na literatura, somente o trabalho elaborado por Craven e colaboradores (1970) evidenciou leveduras associadas a ninhos de formigas pertencentes a esse gênero, entretanto, sem identificação das espécies. Portanto, nossos resultados mostram maiores informações sobre a diversidade de leveduras nesses ninhos.

5.2.3.2. Leveduras associadas a ninhos de formigas do gênero *Atta*

5.2.3.2.1. *Atta sexdens rubropilosa*

Foram coletados, também, doze jardins de ninhos jovens de *Atta sexdens rubropilosa* no dia 02/04/2009 em Corumbataí (SP), sendo analisados no laboratório no mesmo dia da coleta. Em nove deles, foram isoladas **vinte e seis** estirpes de leveduras. Nos ninhos AR090402-02, FCP0904022-07 e FCP0904022-12 não foram encontradas leveduras (Apêndice X).

Nos ninhos de *Atta sexdens rubropilosa*, o gênero predominante foi *Cryptococcus* (38,46%), assim como ocorreu nos ninhos de *Mycocepurus goeldii*, contudo com espécies diferentes, pois em *M. goeldii* houve dominância de *C. laurentii* e, nos jardins de fungo de *Atta sexdens rubropilosa*, *C. flavescens* foi a mais observada (Apêndice Z). Essa espécie já foi encontrada em jardins de fungo de ninhos de *Atta texana* (RODRIGUES et al., 2009), e pode estar relacionada a casos clínicos (TAKASHIMA et al., 2003).

Outras espécies de *Cryptococcus* isoladas foram *C. laurentii*, a qual já foi isolada de outros ninhos de diferentes gêneros de formigas neste trabalho, e *C. flavus*, a qual também foi encontrada em jardins de fungos de *Atta texana* (RODRIGUES et al., 2009) e no filoplano de plantas na Estação de Pesquisa Fu-Shan localizada em Taiwan (YANG; WANG, 2003).

O segundo gênero mais freqüente nesses ninhos foi *Candida*, representado por três espécies (Apêndice Z). Foram isoladas três estirpes de *C. quercitrusa*, a qual foi encontrada

também em salinas no Mar Amarelo na China (WANG et al., 2008) e em frutos e vegetais. Esta espécie apresenta antagonismo à *Colletotrichum capsici*, fungo que causa doença em frutos de pimenta malagueta (CHANCHAICHAOVIVAT; RUENWONGSA; PANIJPAN, 2007). Outras duas espécies foram *C. azyma* e *C. materiae*, que foram recentemente descritas, sendo a primeira encontrada em filoplano de *Cybalannopsis championii* em Taiwan (YANG; WANG, 2003), e a segunda em amostras de madeira podre no Patrimônio Natural do Santuário do Caraça, localizado na Serra do Espinhaço, em Minas Gerais (BARBOSA et al., 2009). A descoberta dessas duas últimas espécies em ninhos de Attini amplia a sua área de ocorrência. Ainda, pode-se observar que as três espécies desse gênero podem ter sido levadas para dentro do ninho junto ao substrato, pois foram encontradas em material vegetal em outros trabalhos conforme comentado acima.

As duas espécies de *Trichosporon* observadas nesses ninhos foram encontradas em outros ninhos de Attini. *T. mycotoxinivorans* foi isolada de *Mycetophylax morschi* neste trabalho e *T. jirovecii* foi isolada de ninho de *Atta sexdens rubropilosa* em outro trabalho, no qual apresentou atividade killer contra outras leveduras (CARREIRO et al., 2002).

Os gêneros *Pichia*, *Rhodotorula*, *Hanseniaspora* e *Sporobolomyces*, encontrados com apenas um isolado nesses ninhos (Apêndice Z), já haviam sido observados em ninhos de Attini. As espécies foram: (i) *Pichia caribbica* (TA25), que também foi encontrada neste trabalho em ninhos de *Myrmicocrypta* sp. Como o domínio D1/D2 da região 26S do rDNA dessa estirpe apresentou 97% de identidade com *P. caribbica*, foi necessário analisar a região ITS, resultando em 100% de identidade (Apêndice AA), e assim confirmando a presença de *P. caribbica* nesses ninhos; (ii) *Rhodotorula mucilaginosa*, espécie amplamente distribuída, a qual pode ser observada no solo e na água e que também é oportunista, podendo causar infecções em pacientes imunocomprometidos, como no caso de linfadenite em um paciente com HIV (FUNG et al, 2009); (iii) *Hanseniaspora opuntiae*, a qual foi encontrada pela primeira vez em um cacto (*Opuntia ficus-indica*) (CADEZ et al., 2003) e também foi associada a uvas de uma vinicultura experimental da Universidade Agrônômica de Atenas (NISIOTOU; NYCHAS, 2007); (iv) *Sporobolomyces* sp (FJ515243.1) espécie ainda não descrita que foi isolada recentemente da superfície do oceano em Keelung no nordeste de Taiwan. O isolamento de *Hanseniaspora opuntiae* e *Sporobolomyces* sp mostra um novo ambiente onde essas espécies podem vir a ser encontradas, já que foram descritas recentemente e pouco se sabe sobre a sua distribuição geográfica.

Os gêneros *Moniliella* e *Zygoascus*, ambos com um isolado apenas, não haviam sido encontrados em associação a jardins de formigas cultivadoras de fungos. A espécie *Zygoascus*

hellenicus (anamorfo: *Candida hellenica*) aqui encontrada, foi associada à formiga *Camponotus vinicus* isolada de fezes das mesmas e do material do ninho (substrato) (MANKOWSKI; MORRELL, 2004), e também foi isolada de frutos (AHANSAL et al., 2008). Ela pode ser relacionada também a casos clínicos, tendo sido detectada no sangue de um paciente que havia feito um transplante de células-tronco (BRANDT et al., 2004).

A estirpe (TA12) apresenta as seguintes características fenotípicas: células ovais, brotamento multipolar e forma pseudomicélio. As colônias possuem coloração branca no meio Sabouraud e são redondas com a margem enraizada. Essa estirpe possui 90% de identidade com *M. fonsecae* (DQ400366) (“query coverage” de 99%) e, o seqüenciamento da região ITS confirmou que essa estirpe é uma espécie ainda não conhecida, com 84% de identidade com *Moniliella* sp (AM991100.1) (“query coverage” de 99%). Portanto, esse isolado será analisado futuramente para uma possível descrição da espécie.

M. fonsecae é associada a materiais vegetais, sendo encontrada pela primeira vez associada a flores (ROSA et al., 2009).

Analisando os ninhos coletados, pode-se observar que do ninho FCP090402-08 foi isolado o maior número de estirpes. Conforme o índice de Shannon-Wiener (Apêndice AB), este ninho também foi o que mais apresentou diversidade.

5.2.3.2.2. *Atta bisphaerica* e *Atta capiguara*

Os últimos dois ninhos estudados pertencem à *Atta bisphaerica* (AR090429-01) e *Atta capiguara* (AR090409-02). Essa coleta foi realizada em 29/04/2009 em Botucatu-SP, sendo os ninhos analisados no laboratório no mesmo dia da coleta. Desses ninhos, somente no de *Atta bisphaerica*, foram isoladas estirpes de leveduras (**n=6**) (Apêndice AC).

Dessas estirpes, cinco possuem similaridade a *Trichosporon mycotoxinivorans* que foi comentada anteriormente (ver página 43). Essa espécie foi encontrada também em ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* e *Mycetophylax morschi* nesse trabalho (Apêndice AD).

O gênero *Debaryomyces* foi encontrado pela primeira vez em associação com jardins de formigas cultivadoras de fungos no trabalho de Carreiro e colaboradores (1997), porém com outra espécie representante, *D. hansenii*. A espécie aqui isolada, *D. nepalensis*, foi encontrada no solo (SALUJA; PRASAD, 2007) e também na cavidade oral de cachorros (MORETTI et al., 2007), sendo o jardim de fungos dessa formiga uma outra localidade onde essa espécie pode ser encontrada (Apêndice AD).

5.3. Composição das espécies representantes dos isolados de leveduras dos ninhos das diferentes Attini.

De acordo com a Tabela 6, pode-se observar que muitas das espécies de leveduras foram isoladas em associação com ninhos de uma mesma espécie de formiga e de mesma região. É o caso de *Candida naeodendra*, *Pichia kluyveri*, *P. cf. mexicana*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Rhodotorula pacifica* e *Trichosporon coremiiforme*, as quais foram encontradas exclusivamente nos ninhos de *Mycocepurus goeldii*. Também a espécie *Candida railenensis* foi encontrada somente no ninho de *Myrmicocrypta* sp.

Nos ninhos de *Trachymyrmex* sp, as espécies foram: *C. gorgasii*, *Asterotremella humicola*, *Cryptococcus* sp e *Rhodotorula* sp. As espécies encontradas somente nos ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* foram: *Candida azyma*, *C. materiae*, *C. quercitrusa*, *Hanseniaspora opontiae*, *Moniliella fonscae*, *Zygoascus hellenicus*, *Cryptococcus flavescens*, *C. flavus*, *Pseudozyma jejuensis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sporobolomyces* sp e *Trichosporon jirovecii*. No ninho de *Atta bisphaerica* a espécie exclusiva foi *Debaryomyces nepalensis*.

As espécies *Pichia guilliermondii*, *P. caribbica*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus cf podzolicus* e *Trichosporon loubieri* puderam ser encontradas em ninhos de Paleoattini e Neoattini. Dentre elas, as espécies *P. guilliermondii*, *P. caribbica* e *C. laurentii* foram predominantes em ninhos de Attini basais. Já nas superiores, essa presença pode ser considerada casual, com exceção de *P. guilliermondii* e *Trichosporon loubieri*.

Se compararmos as leveduras encontradas em associação com a formiga cortadeira *Atta sexdens rubropilosa*, observamos que há prevalência de basidiomicetos, diferentemente do resultado observado no trabalho de Carreiro e colaboradores (1997) que analisaram ninhos da mesma espécie, porém mantidos em laboratório, já que nele os ascomicetos predominaram.

O gênero *Trichosporon* foi o mais observado entre os ninhos de diferentes Attini, com exceção do ninho de *Sericomyrmex* sp (Tabela 6).

Tabela 6 - Espécies de leveduras representantes dos isolados encontrados em ninhos de formiga Attini.

Espécies	Paleoattini				Neoattini				TOTAL
	A	B	C	D	E	F	G	H	
<i>Candida azyma</i>							2		2
<i>Candida gorgasii</i>					10				10
<i>Candida materiae</i>							1		1
<i>Candida naeodendra</i>	3								3
<i>Candida quercitrusa</i>							3		3
<i>Candida railenensis</i>		8							8
<i>Candida</i> sp	1								1
<i>Debaryomyces nepalensis</i>								1	1
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>							1		1
<i>Moniliella fONSECAE</i>							1		1
<i>Pichia caribbica</i>	2	9					1		12
<i>Pichia kluyveri</i>	1								1
<i>Pichia guilliermondii</i>	11				15	10			36
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1								1
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	1								1
<i>Zygoascus hellenicus</i>							2		2
<i>Asterotremella humicola</i>					2				2
<i>Cryptococcus flavescens</i>							5		5
<i>Cryptococcus flavus</i>							2		2
<i>Cryptococcus laurentii</i>	21				1		3		25
<i>Cryptococcus</i> cf. <i>podzolicus</i>	1				2				3
<i>Cryptococcus</i> sp					1				1
<i>Pseudozyma jejuensis</i>							1		1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>							1		1
<i>Rhodotorula pacifica</i>	1								1
<i>Rhodotorula</i> sp					1				1
<i>Sporobolomyces</i> sp1				1	1				2
<i>Sporobolomyces</i> sp2							1		1
<i>Trichosporon chiarellii</i>					2	3			5
<i>Trichosporon coremiiforme</i>	1								1
<i>Trichosporon loubieri</i>		1			4				5
<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>			5				1	5	11
<i>Trichosporon jirovecii</i>							1		1
TOTAL	44	18	5	1	39	13	26	6	152

A= *Mycocephalus goeldii*; B= *Myrmicocrypta* sp; C=*Mycetophylax morschi*; D= *Sericomyrmex* sp.; E= *Trachymyrmex* sp; F= *Acromyrmex* sp; G= *Atta sexdens rubropilosa*; H= *Atta bisphaerica*.

A Tabela 7 mostra a aplicação das espécies encontradas nesse trabalho, contudo algumas delas não possuem registros na literatura quanto ao seu emprego biotecnológico. Esse fato indica a necessidade de se estudar e compreender melhor as espécies de leveduras já descritas.

Tabela 7- Espécies encontradas nos ninhos estudados e suas aplicações biotecnológicas

Espécies	Aplicações
<i>Candida azyma</i>	- Produção de toxinas killer contra outras leveduras e produção de protease (TRINDADE et al., 2002)
<i>Candida naeodendra</i>	- Atividade killer contra outras leveduras (SUZUKI et al., 1989)
<i>Candida quercitrusa</i>	- Produção de lipases (WANG et al., 2007)
<i>Candida sp</i>	- Produção de xilitol (KIM et al., 2002) - Produção de etanol (LIN; TANAKA, 2006) - Utilização de resíduos agrícolas em processos fermentativos (DIMOVA et al., 2010) - Produção de lipases (MONTESINOS; DAEMAU; CASAS, 2003)
<i>Debaryomyces nepalensis</i>	- Produção de pectina liase e pectato liase (GUMMADI; KUMAR, 2006)
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	- Processos de fermentação de grapa (BOVO et al., 2009)
<i>Moniliella spp</i>	- Produção de polióis, como eritritol e ribitol (MOMSEN, LEONARDOS & CIA 1984)
<i>Pichia caribbica</i>	- Fermentação artesanal de cachaça (ROMO-SÁNCHEZ et al., 2010)
<i>Pichia kluyveri</i>	- Produção de toxina killer contra outras leveduras (DABHOLE; JOISHY, 2005) - Fermentação de pentoses para a produção de etanol (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	- Produção de ácido láctico (VALLI et al., 2006) - Processos fermentativos de vinhos (SODEN et al., 2000; LOPES et al., 2002) -Produção de toxinas killer contra outras leveduras (TRINDADE et al., 2002)
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	- Processos fermentativos de vinho (RENAULT et al., 2009) - Produção de toxinas killer contra outras leveduras (CARREIRO et al., 2002)
<i>Zygoascus hellenicus</i>	- Produção de fosfolipase (NOVOZYMES, A/S, 2002)
<i>Asterotremella humicola</i>	- Produção de protease (TRINDADE et al., 2002) - Produção de toxinas killer (PUCHKOV; YURKOVA; GOLUBEV, 1998)
<i>Cryptococcus flavescens</i>	-Atividade antagonística contra espécies de <i>Fusarium</i> (ZHANG et al., 2007)
<i>Cryptococcus flavus</i>	- Produção de α -amilase (WANDERLEY et al., 2004) - Produção de xilanase (PARACHIN, 2009)
<i>Cryptococcus laurentii</i>	- Produção de protease (TRINDADE et al., 2002) - Biodegradação de óleo comestível (SUGIMORI, 2009) - Biocontrole em sinergismo de quitosoma de <i>Penicillium expansum</i> (YU; LI; ZENG, 2007)
<i>Cryptococcus podzolicus</i>	- Produção de β -xilosidase (SHUBAKOV, 2000)
<i>Pseudozyma jejuensis</i>	- Produção de cutinase que possivelmente degrada resíduos plásticos (SEO et al., 2007)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	- Produção de carotenóides (AKSU; EREN, 2005) - Produção de ácido rodotorúlico (ANDERSEN; RENSHAN; WIEBE, 2003)
<i>Rhodotorula pacifica</i>	- Biodegradação de óleo comestível (SUGIMORI, 2009)

Tabela 7 (continuação) - Espécies encontradas nos ninhos estudados e suas aplicações biotecnológicas

Espécies	Aplicações
<i>Rhodotorula</i> spp	- Produção de carotenóides, principalmente β -caroteno e toruleno (MALDONADE; SCAMPARINI; RODRIGUEZ-AMAYA, 2007)
<i>Sporobolomyces</i> spp	- Produção de carotenóides, como β -caroteno, torularrodina e toruleno (VALDUGA et al., 2009)
<i>Trichosporon coremiiforme</i>	- Biotransformação de bifenil, dibenzofurano e difenil em compostos monohidroxilados (SIETMANN; HAMMER; SCHAUER, 2002)
<i>Trichosporon loubieri</i>	- Produção de bioemulsificante (MONTEIRO et al., 2010)
<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	- Biotransformação de zearalenona (micotoxina) em metabólitos não tóxicos (VEKIRU et al., 2010) - Produção de bioemulsificante (MONTEIRO et al., 2010)
<i>Trichosporon jirovecii</i>	- Produção de toxinas killer contra outras leveduras (CARREIRO et al., 2002) - Produção de enzima L-cisteína-desulfidrase (SAAD et al., 2007)

Também merece registro o fato de termos isolado várias espécies potencialmente patogênicas, como foi o caso de *Trichosporon coremiiforme* presente no ninho de *Mycocepurus goeldii*, *Trichosporon loubieri* em ninho de *Myrmicocrypta* sp e *Trachymyrmex* sp, *Asterotremella humicola* presente no ninho de *Trachymyrmex* sp, *Trichosporon mycotoxinivorans* em ninhos de *Mycetophylax simplex* e *Cryptococcus flavescens*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Zygoascus hellenicus* presentes em ninhos de *Atta sexdens rubropilosa*. Pagnocca e colaboradores (2009) já haviam demonstrado a ocorrência de *Candida dubliniensis*, uma espécie altamente oportunista em ninho de *Myrmicocrypta camargoi*. É sabido que essas formigas podem dispersar leveduras e outros micro-organismos (Pagnocca et al., 2008) e o fato de que seus ninhos podem abrigar espécies potencialmente patogênicas é preocupante e deve ser objeto de estudos mais aprofundados.

Não há evidências de que alguma espécie de levedura esteja fortemente associada a alguma espécie de formiga Attini. Tudo indica que elas são introduzidas continuamente no interior dos ninhos através do material forrageado e da atividade das formigas. Entretanto, como demonstrado neste trabalho, algumas espécies são encontradas com muita frequência nesses ninhos. Não é possível saber se e como elas participam da simbiose, mas não há dúvidas que algumas espécies se adaptam muito bem ao micro-ambiente e talvez possam estar obtendo algum benefício nessa associação.

6. CONCLUSÕES

- A espécie mais encontrada nos ninhos de *Mycocepurus goeldii*, *Trachymyrmex* sp e *Acromyrmex* sp foi *Pichia guilliermondii*, prevalente nos ninhos dos dois últimos gêneros. Houve predominância das espécies *Pichia caribbica* e *Candida railenensis* no único ninho de *Myrmicocrypta* sp e de *Cryptococcus flavescens* nos ninhos de *Atta sexdens rubropilosa*.
- O gênero mais presente em ninhos de Attini foi *Pichia*, cuja dispersão está relacionada a insetos. Porém, outros gêneros como *Candida*, *Cryptococcus* e *Trichosporon* foram evidentes em ninhos dessas formigas, tanto nas Neoattini como nas Paleoattini.
- Observou-se a predominância de basidiomicetos em ninhos das formigas cortadeiras (gênero *Atta* spp. e *Acromyrmex* spp.). Possivelmente, esta ocorrência se deu devido à dominância de basidiomicetos em filoplano.
- Existem diferenças entre as comunidades de leveduras associadas a esses ninhos de campo e tal variação pode ser resultante do tipo de solo onde o ninho foi construído, do tipo de material coletado como substrato oferecido aos fungos.
- Os gêneros *Torulaspora*, *Asterotremella*, *Moniliella* e *Zygoascus* foram encontrados, pela primeira vez, em associação com ninhos de Attini.
- Este trabalho apontou uma nova localização geográfica para as espécies *Candida materiae*, *Candida azyma*, *Sporobolomyces* sp2, *Hanseniaspora opontiae* e *Rhodotorula* sp, recentemente descritas, além de *Sporobolomyces* sp1, já que estas haviam sido encontradas apenas em um local, porém não relacionado com os ninhos dessas formigas.
- A espécie *Trichosporon chiarellii*, encontrada anteriormente em ninho de *Myrmicocrypta camargoi*, neste trabalho foi observada em associação a ninhos de *Trachymyrmex* sp e *Acromyrmex* sp, em diferentes localidades. Essa espécie, até o momento, só foi encontrada em ninhos da tribo Attini, o que pode indicar uma possível adaptação a esse micro-ambiente.

- É importante salientar também o isolamento de várias espécies potencialmente patogências, como *Trichosporon coremiiforme*, *Trichosporon loubieri*, *Asterotremella humicola*, *Trichosporon mycotoxinivorans*, *Cryptococcus flavescens*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Zygoascus hellenicus* nos ninhos dessas Attini.

- Por fim, notou-se que o jardim de fungo de ninhos de Attini pode vir a ser um amplo reservatório de leveduras, sendo algumas destas ainda não conhecidas, como no caso da estirpe TT12 e TD49.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHANSAL, L. et al. Biodiversity of yeasts isolated from the indigenous forest of Argan (*Argania spinosa* (L.) Skeels) in Morocco. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.24, p.777–782, 2008.

AKSU, Z.; EREN, A.T. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: use of agricultural wastes as a carbon source. **Process Biochemistry**, London, v.40, p.2985–2991, 2005.

ALBUQUERQUE, E.Z.; DIEHL-FLEIG, E.; DIEHL, E. Density and distribution of nests of *Mycetophylax simplex* (Emery) (Hymenoptera, Formicidae) in areas with mobile dunes on the northern coast of Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v.49, n.1, p.123-126, 2005.

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

ALTSCHUL, S.F., et al. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res.* v. 25, p. 3389-3402, 1997. Visualizado Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>>. Acesso em: 14 abr. 2008.

ANDERSEN, D.; RENSHAN, J.; WIEBE, M.G. Rhodotorulic acid production by *Rhodotorula mucilaginosa*. **Mycological Research**, Cambridge, v.107, n.8, p.949–956, 2003.

ANGELIS, C.; SERZEDELLO, A.; DE ANGELIS, D. F. Yeasts found in gardens of *Atta sexdens rubropilosa* and *Atta laevigata*. **Naturalia**, São Paulo, v.8, p.149-151, 1983.

BANDONI, R.J. Terrestrial occurrence of some aquatic hyphomycetes. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 50, p. 2283-2288, 1972.

BARBOSA, A.C. et al. *Candida materiae* sp. nov., a yeast species isolated from rotting wood in the Atlantic Rain Forest. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.59, p.2104-2106, 2009.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts**: characteristics and identification. 3. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. 1152p.

BICAS, J.L.; DIONÍSIO, A.P.; PASTORE, G.M. Bio-oxidation of terpenes: an approach for the flavor industry. **Chemical reviews**, Washington, v.109, p.4518-4531, 2009.

BOEKHOUT, T.; NAKASE, T. *Sporobolomyces* Kluyver & van Niel. In: KURTZMAN, C.P., FELL, J.W. **The Yeasts**, a Taxonomic Study. Amsterdam: Elsevier, 1998. p. 828-843.

BORBA, R.S., et al. Crescimento do fungo simbiote de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* em meios de cultura com diferentes extratos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n.3, p. 725-730, 2006.

BOVO, B. et al. Yeast population dynamics during pilot-scales to range of grape marcs for the production of Grappa, a traditional Italian alcoholic beverage. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.129, p.221–228, 2009.

BRANDÃO, C.R.F.; MAYHÉ-NUNES, A.J. A new fungus-growing ant genus, *Mycetagroicus* gen. n., with the description of three new species and comments on the monophyletic of the Attini (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, California, v. 38, n.3B, p. 639-665, 2002.

BRANDÃO, C.R.F.; MAYHÉ-NUNES, A.J. A phylogenetic hypothesis for the trachymyrmex species groups, and the transition from fungus-growing to leaf-cutting in the Attini. In: Snelling, R.R.; Fisher, B.L.; Ward, P.S. **Advances In Ant Systematics (Hymenoptera: Formicidae): Homage To E. O. Wilson – 50 Years Of Contributions**. Memoirs of the American Entomological Institute, Gainesville, v.80, p.72-88, 2007.

BRANDT, M.E. et al. Fungemia caused by *Zygoascus hellenicus* in an allogeneic stem cell transplant recipient. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.42, n.7, p.3363-3365, 2004.

BRYSCH-HERZBERG, M. Ecology of yeasts in plant–bumblebee mutualism in Central Europe. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.50, p.87-100, 2004.

BUENO, O.C.; BUENO, F.C.; VERZA, S.S. **Controle de formigas cortadeiras**. São Paulo: Senar, 2008. 39p.

CADEZ, N. et al. *Hanseniaspora meyeri* sp. nov., *Hanseniaspora clermontiae* sp. nov., *Hanseniaspora lachancei* sp. nov. and *Hanseniaspora opuntiae* sp. nov., novel apiculate yeast species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.53, p.1671-1680, 2003.

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

CARREIRO, S.C., et al. Yeasts associated with nests of leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 71, p. 243-248, 1997.

CARREIRO, S.C. et al. Occurrence of killer yeasts in leaf-cutting ants nests. **Folia microbiologica**, Praha, v.47, n.3, p.259-262, 2002.

CARREIRO, S.C., et al. *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.

CENTRAALBUREAU VOOR SCHIMMELCULTURESBS. **CBS Yeast Collections: Maintenance and storage of cultures**. Disponível em: <<http://www.cbs.knaw.nl/yeast/Defaultpage.aspx>>. Acesso em: 30 mai. 2008.

CHAIROTE, E. et al. Preparation of red yeast rice using various thai glutinous rice and *Monascus purpureus* CMU001 isolated from commercial Chinese red yeast rice sample. **KMITL Science and Technology Journal**, Thailand, v.7, n.S1, 28-37, 2007.

CHANCHACHAOVIVAT, A.; RUENWONGSA, P.; PANIJPAN, B. Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: Potential for biological control of postharvestchilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*). **Biological control**, Orlando, v.42, n.326–335, 2007.

CHOWDHARY, A. et al. *Trichosporon asahii* as an emerging etiologic agent of disseminated trichosporonosis: a case report and an update. **Indian Journal of Medical Microbiology**, Pondicherry, v.22, n.1, p.16-22, 2004.

COLUCCIO, A.E. et al. The yeast spore wall enables spores to survive passage through the digestive tract of *Drosophila*. **Public Library of Science One**, San Francisco, v.3, n.3, p.1-7, 2008.

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

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, 2001a.

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

CURRIE, C.R.; MUELLER, U.G.; MALLOCH, D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceedings of the National Academic Society**, Washington, v.96, p.7998-8002, 1999.

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

CURRIE, C.R. et al. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, London, v.398, p.701-704, 1999.

CURRIE, C.R. et al. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, London, v.423, p.461, 2003a.

CURRIE, C. R. et al. Ancient tripartite coevolution in the Attine ant-microbe symbiosis. **Science**, Washington, v. 299, p. 386-388, 2003b.

DABHOLE, M.P.; JOISHY, K.N. Production and effect of killer toxin by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kluyveri* on sensitive yeasts and fungal pathogens. **Indian Journal of Biotechnology**, New Delhi, v.4, p.290-292, 2005.

DEMAIN, A.L.; PHAFF, H.J.; KURTZMAN, C.P. The industrial and agricultural significance of yeasts. In: KURTZMAN, C.P., FELL, J.W. **The Yeasts**, a Taxonomic Study. Amsterdam: Elsevier, 1998. p.13-20.

DELLA LUCIA, T.M.C. **As formigas cortadeiras**. Viçosa: Folha de Viçosa, 1993. 262p.

DIAS, L. et al. Identification of yeasts isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol. **Food Microbiology**, Amsterdam, v.20, p.567-574, 2003.

DIEHL, E.; CAVALLI-MOLINA, S.; ARAÚJO, A.M. Isoenzyme variation in the leaf-cutting ants *Acromyrmex heyeri* and *Acromyrmex striatus* (Hymenoptera, formicidae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n.2, p.173-178, 2002.

DIEHL-FLEIG, E. **Formigas: Organização Social e Ecologia comportamental**. São Leopoldo: Unisinos, p.13-47, 1995.

DIEHL-FLEIG, E.; DIEHL, E. Nest architecture and colony size of the fungus-growing ant *Mycetophylax simplex* Emery, 1888 (Formicidae, Attini). **Insectes Sociaux**, Paris, v.54, p.242-247, 2007.

DIMOVA, N.D. et al. Production of *Candida* biomass from hydrolysed agricultural biowaste. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, Bulgaria, v.24, n.1, p. 1577-1581, 2010.

DROBY, S. et al. Commercial testing of Aspire: a yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus. **Biological Control**, Orlando, v.12, p.97–101, 1998.

FELDMANN, M.; VERHAAGH, M.; HEYMANN, E. *Sericomyrmex* ants as seeds predators. **Ecotropica**, Bonn, v.6, p.207-209, 2000.

FELL, J.W.; STATZELL-TALLMAN, A. *Cryptococcus* Vuillemin. In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. **The Yeasts**, a Taxonomic Study, 4^a ed. Amsterdam: Elsevier, 1998. p.742-767.

FERNÁNDEZ, F.; OSPINA, M. Sinopsis de las hormigas de la región Neotropical. In: FERNÁNDEZ, F. **Introducción a las hormigas de la región Neotropical**. Bogotá: Smithsonian Institution Press, 2003. p.49-64.

FERRAZZA, M.H.S.H., et al. Characterization of yeasts isolated from the vagina and their association with vulvovaginal candidiasis in two cities of the South of Brazil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v.27, n.2, p.58-63, 2005.

FISHER, P. J., et al. Microfungi in the fungus gardens of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*: a preliminary study. **Mycological Research**, Cambridge, v.100, n.5, p. 541-546, 1996.

FUNG, H.B. et al. *Rhodotorula mucilaginosa* lymphadenitis in an HIV-infected patient. **International Journal of Infectious Diseases**, New York, v.13, p.e27-e29, 2009.

GADANHÓ, M.; LIBKIND, D.; SAMPAIO, J.P. Yeast diversity in the extreme acidic environments of the Iberian Pyrite Belt. **Microbial Ecology**, New York, v.52, p.552-563, 2006.

GATES, M.A.; THORKILDSON, P.; KOZEL, T.R. Molecular architecture of the *Cryptococcus neoformans* capsule. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 52, n.1, p. 13–24, 2004.

GERARDO, N.M.; MUELLER, U.G.; CURRIE, C.R. Complex host-pathogen coevolution in the *Apterostigma* fungus-growing ant-microbe symbiosis. **BMC Evolutionary Biology**, Washington, v.6, n.88, p.1-9, 2006.

GONÇALVES, C.R. O gênero *Acromyrmex* no Brasil (Hym. Formicidae). **Studia Entomologica**, Petrópolis, v.4, fasc.1-4, p.113-180, 1961.

GOLUBTSOVA, YU. V.; GLUSHAKOVA, A. M.; CHERNOV, I. YU. The seasonal dynamics of yeast communities in the rhizosphere of soddy-podzolic soils. **Eurasian Soil Science**, Silver Spring, v.40, n.8, p. 875–879, 2007.

GONG, F. et al. Inulinase production by a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the crude inulinase. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v.34, p.179–185, 2007.

GLUSHAKOVA, A.M.; CHERNOV, 2007. Seasonal dynamic of the numbers of epiphytic yeasts. **Microbiology**, Reading, v.76, n.5, p.590-595, 2007.

GLUSHAKOVA, A.M.; YURKOV, A.M.; CHERNOV, I.YU. Massive isolation of anamorphous ascomycete yeasts *Candida oleophila* from plant phyllosphere. **Microbiology**, Reading, v.76, n.6, p.799-803, 2007a.

GUMMADI, S.N.; KUMAR, D.S. Enhanced production of pectin lyase and pectate lyase by *Debaryomyces nepalensis* in submerged fermentation by statistical methods. **American Journal of Food Technology**, New York, v.1, n.1, p.19-33, 2006.

GUSMÃO, D.S., et al. First isolation of microorganisms from the gut diverticulum of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): new perspectives for an insect-bacteria association. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.102, n.8, p.919-924, 2007.

HAEDER, S. et al. Candicidin-producing *Streptomyces* support leaf-cutting ants to protect their fungus garden against the pathogenic fungus *Escovopsis*. **Proceedings of the National Academic Society**, Washington, v.106, n.12, p.4742-4746, 2009.

HAGLER, A.N.; AHEARN, DG. Distribution of yeasts in aquatic environments. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. **The yeasts**, 2.ed. London: Academic Press, 1987. cap.6, v.1, p.185-194.

HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.74, p.937-953, 2007.

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.

HASSAN, S.M; EL-BAZ, A.F; ABD-RABBOH, H.S.M. A novel potentiometric biosensor for selective l-cysteine determination using l-cysteine-desulphydrase producing *Trichosporon jirovecii* yeast cells coupled with sulfide electrode. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 602, p. 108-113, 2007.

HICKEY, P.W. et al. *Trichosporon mycotoxinivorans*, a novel respiratory pathogen in patients with cystic fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.47, n.10, p. 3091–3097, 2009.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants**. Cambridge: Havard Univ. Press, 1990. p.596-608.

HONG, S.G. et al. Diversity of yeasts associated with *Panax ginseng*. **Journal of Microbiology**, Korea, v.44, n.6, p.674-679, 2006.

INÁCIO, J. **Ocorrência e diversidade de leveduras no filoplano de plantas seleccionadas do Parque Natural da Serra da Arrábida**. 2003. 139f. Tese (Doutorado em Biologia). Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.

INÁCIO, J. et al. Phylloplane yeasts from Portugal: Seven novel anamorphic species in the Tremellales lineage of the Hymenomycetes (Basidiomycota) producing orange-colored colonies. **FEMS Yeasts Research**, Oxford, v. 5, p.1167-1183, 2005.

ISAEVA, O.V. et al. The yeast *Candida railenensis* in the fruits of English oak (*Quercus robur* L.). **Microbiology**, Reading, v.78, n.3, p.355-359, 2009.

JAFFÉ, K.; VILLEGAS, G. On the communication systems of the fungus-growing ant *Trachymyrmex urichi*. **Insectes sociaux**, Paris, v.32, n.3, p. 257-274, 1985.

KIM, J.H. et al. Optimization of fed-batch fermentation for xylitol production by *Candida tropicalis*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Berlin, v.29, p.16–19, 2002.

KIMURA, M. A simple method for estimations 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.

KLINGENBERG, C. **Brasilianische Pilzzüchter-Ameisen der Gattung *Mycetophylax* – Lebensweise und Taxonomie**. 2006. 138f. Tese (Doutorado em Ciências) Faculdade de Biologia, Eberhard Karls Universität Tübingen, Tübingen, Alemanha.

KLINGENBERG, C; BRANDÃO, R.F. Revision of the fungus-growing ant genera *Mycetophylax* Emery and *Paramycetophylax* Kusnezov rev. stat., and description of *Kalathomyrmex* n. gen. (Formicidae: Myrmicinae: Attini). **Zootaxa**, New Zealand, v.2052, p.1-31, 2009.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. Yeast systematics and phylogeny – Implications of molecular identification methods for studies in ecology. In: ROSA, C.A.; PÉTER, G. **The yeast handbook: Biodiversity and ecophysiology of yeasts**. Germany: Springer-Verlag Berlin Herdelberg, 2006. p.11-30.

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, p.331–371, 1998.

KUTTY, S.N.; PHILIP, R. Marine yeasts - a review. **Yeast**, Chichester, v.25, p.465-483, 2008.

KVITEK, D.J.; WILL, J.L.; GASCH, A.P. Variations in stress sensitivity and genomic expressions in diverse *S. cerevisiae* isolates. **PLOS Genetics**, v.4, n.10, p.1-11, 2008.

LACHANCE, M.A.; STARMER, W.T. Ecology and yeasts. In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. **The Yeasts**, a Taxonomic Study. Amsterdam: Elsevier, 1998. p.21-30.

LANDELL, M.F. et al. *Cryptococcus bromeliarum* sp. nov., an orange-coloured basidiomycetous yeast isolated from bromeliads in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.59, p.910-913, 2009.

LEAL, I.R.; OLIVEIRA, P.S. Foraging ecology of attine ants in a Neotropical savanna: seasonal use of fungal substrate in the cerrado vegetation of Brazil. **Insectes Sociaux**, v.47, p.376-382, 2000.

LEATHERS, T.D.; GUPTA, S.C. Xylitol and riboflavin accumulation in xylose-grown cultures of *Pichia guilliermondii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.47, p.58-61, 1997.

LEGRAS, J.L. et al. Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. **Molecular Ecology**, Oxford, v.16, p.2091-2101, 2007.

LIBKIND, D. et al. *Sporidiobolus longiusculus* sp. nov. and *Sporobolomyces patagonicus* sp. nov., novel yeasts of the Sporidiobolales isolated from aquatic environments in Patagonia, Argentina. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p.503–509, 2005.

LIBKIND, D. et al. Biogeography, host specificity, and molecular phylogeny of the basidiomycetous yeast *Phaffia rhodozyma* and its sexual form, *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v.73, n.4, p. 1120–1125, 2007.

LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.69, p.627-642, 2006.

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

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

LOPES, C.A. et al. *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast populations in a cold region in Argentinean Patagonia. A study at different fermentation scales. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.93, p.608–615, 2002.

MACKAY, W.P. et al. The ants of North and Central America: the genus *Mycocepurus* (Hymenoptera: Formicidae). **Journal Insect Science**, Tucson, v. 4, p. 27-37, 2004.

MAGLIANI, W. et al. Yeast killer systems. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.10, n.3, p.369-400, 1997.

MALDONADE, I.R.; SCAMPARINI, A.R.P; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Selection and characterization of carotenoid-producing yeasts from Campinas region, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, p. 65-70, 2007.

MANKOWSKI, M.E.; MORRELL, J.J. Yeasts associated with the infrabuccal pocket and colonies of the carpenter ant *Camponotus vicinus*. **Mycologia**, New York, v.96, n.2, p.226-231, 2004.

MARGESIN, R. Alpine microorganisms: useful tools for low-temperature bioremediation. **The Journal of Microbiology**, Korea, v.45, n.4, p. 281-285, 2007.

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

MARTY, F.M. et al. Disseminated trichosporonosis caused by *Trichosporon loubieri*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, n.11, p.5317-5320, 2003.

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

MAYÉ-NUNES, A.J.; BRANDÃO, R.F. Revisionary studies on the attine ant genus *Trachymyrmex* Forel. Part 3: The Jamaicensis group (Hymenoptera: Formicidae). **Zootaxa**, New Zealand, v.1444, p.1-21, 2007.

MENDES, T.D. Produção de polissacaridases por leveduras isoladas de ninhos de formiga Attini. 2007. 73f. TCC (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.

MEYER, S.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. *Candida* Berkhout. In: KURTZMAN, C.P., FELL, J.W. **The Yeasts**, a Taxonomic Study. Amsterdam: Elsevier, 1998. p. 454 a 573.

MEYER, W., et al. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the Polymerase Chain Reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.31, n.9, p. 2274-2280, 1993.

MIDDELHOVEN, W.J. Identification of clinically relevant *Trichosporon* species. **Mycoses**, Berlin, v.46, p.7-11, 2003.

MIDDELHOVEN, W.J. et al. *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.

MIKHEYEV, A.S.; MUELLER, U.G.; BOOMSMA, J.J. Population genetic signatures of diffuse co-evolution between leaf-cutting ants and their cultivar fungi. **Molecular Ecology**, Oxford, v.16, p.209-216, 2007.

MILLER, M.W. ; PHAFF, H.J. Successive Microbial Populations in Calimyrna Figs. **Applied Microbiology**, Washington, v.10, p.394-400, 1962.

MOLNÁR, O. et al. *Trichosporon mycotoxinivorans* sp. nov., a new yeast species useful in biological detoxification of various micotoxins. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.27, p.661–671, 2004.

MOMSEN, LEONARDOS & CIA (United Kingdom). Françoise Oudenne , Jean-Claude de Troostenbergh e Luc Reuliaux. Industrial process for the production of polyols, especially erythritol and/or ribitol by aerobic fermentation of a sugar appropriate for *Moniliella tomentosa* var. *Pollini*, and culture broth containing polyol. PI8404195-1, 22 Ago. 1984. 23 Out. 1984.

MONTEIRO, A.S. et al. Identification and characterization of bioemulsifier-producing yeasts isolated from effluents of a dairy industry. **Bioresource Technology**, Essex, v.101, p. 5186–5193, 2010.

MONTESINOS, J.L.; DAEMAU, E.; CASAS, C. Lipase production in continuous culture of *Candida rugosa*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v.78, p.753-761, 2003.

MORAIS, P.B.; ROSA, C.A. Interações entre *Drosophila* e leveduras em ambientes tropicais. In: MARTINS, R.P., LEWINSOHN, T.M.; BARBEITOS, M.S. **Ecologia e comportamento de insetos**. Rio de Janeiro, 2000. v. 8, p.321-336 (Série Oecologia Brasiliensis).

MORETTI, A. et al. First report of oral colonization by *Debaryomyces nepalensis* in a dog. **Mycopathologia**, Den Haag, v.164, p.189-192, 2007.

MUELLER, U.G., et al. The evolution of agriculture in insects. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, Palo Alto, v.36, p.563-595, 2005.

MUELLER, U.G., et al. The origin of the attine ant-fungus mutualism. **Quarterly Review of Biology**, Washington, v.76, n.2, p. 169-197, 2001.

MUELLER, U.G.; Ant versus fungus versus mutualism: Ant-cultivar conflict and the deconstruction of the Attine ant-fungus symbiosis. **Western North American Naturalist**, Chicago, v.160, p. S67-S98, 2002.

MUELLER, U.G.; GERARDO, N. Fungus-farming insects: Multiple origins and diverse evolutionary histories. **Proceedings of the National Academic Society**, Washington, v.99, n.24, p. 15247-15249, 2002.

MUELLER, U.G. et al. Coevolution between attine ants and actinomycete bacteria: a reevaluation. **Evolution**, Lancaster, v.62, n.11, p.2894-2912, 2008.

NAGAHAMA, T.; HAMAMOTO, M.; HORIKOSHI, K. *Rhodotorula pacifica* sp. nov., a novel yeast species from sediment collected on the deep-sea floor of the north-west Pacific Ocean. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, p. 295–299, 2006.

NAGLIK, J.R.; CHALLACOMBE, S.J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n.3, p.400–428, 2003.

NAKASE, T. Expanding world of ballistospore yeasts: Distribution in the phyllosphere, systematics and phylogeny. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokio, v.46, p.189-216, 2000.

NISIOTOU, A.A.; NYCHAS, G.J.E. Yeast populations residing on healthy or *Botrytis*-infected grapes from a vineyard in Attica, Greece. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.73, n.8, p.2765-2768, 2007.

NORTHROP, J. H. The role of yeast in the nutrition of an insect (*Drosophila*). **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.30, n.181, p.181-187, 1917.

NOVOZYMES, A/S (Chiba). Tom Anton Busk Nielsen, Michiyo Ishii, Shamkant Anant Patkar, Noriko Tsutsumi. Phospholipase from *Zygoascus hellenicus*. WO/2002/024881, 18 Set. 2001. 28 Mar 2002.

OH, D.C. et al. Dentigerumycin: a bacterial mediator of an ant-fungus symbiosis. **Nature Chemical Biology**, London, v.5, p.391-393, 2009.

ODUM, E.P.; BARRET, G.W. **Diversidade do Ecossistema**. In: ODUM, E.P.; BARRET, G.W. Fundamentos em Ecologia. 5ªed. São Paulo: Cengage Learning. 2008. p.38-41.

PADHYE, A.A. et al. *Trichosporon loubieri* infection in a patient with adult polycystic kidney disease. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, n.1, p. 479-482, 2003.

PAGNOCCA, F.C. et al. Microbiological changes in the nests of leaf-cutting ant fed on sesame leaves. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v.120, p.317-320, 1996.

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

PAGNOCCA, F.C. et al. Yeast 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. DOI: 10.1099/ijs.0.015727-0, 2009.

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

PARACHIN, N.S. et al. Xylanases from *Cryptococcus flavus* isolate I-11: Enzymatic profile, isolation and heterologous expression of CfXYN1 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic**, Amsterdam, v.59, p.52–57, 2009.

PARVATHI, K.; NAGENDRAN, R.; NARESHKUMAR, R. Lead biosorption onto waste beer yeast by-product, a means to decontaminate effluent generated from battery manufacturing industry. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.10, n.1, p.92-105, 2007.

PEÇANHA, M.M. et al. Yeasts and others parameters of pollution of the Ribeirão Claro stream in Rio Claro, São Paulo. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.27, p.177-181, 1996.

PETERSSON, S.; SCHNÜRER, J. Biocontrol of mold growth in high-moisture wheat stored under airtight conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii*, and *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.3, p.1027–103, 1995.

PHAFF, H. J.; STARMER, W. T. Yeasts associated with plants, insects and soil. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. **The yeasts**, 2.ed. London: Academic Press, 1987. cap.5, v.1, p.123-180.

PIMENTA, R.S., et al. Yeast communities in two atlantic rain forest fragments in southeast Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.40, p.90-95, 2009.

POULSEN, M.; BOOMSMA, J.J. Mutualistic fungi control crop diversity in fungus-growing ants. **Science**, Washington, v.307, p.741-744, 2005.

PRILLINGER, H. et al. *Asterotremella* gen. nov. albida, an anamorphic tremelloid yeast isolated from the agarics *Asterophora lycoperdoides* and *Asterophora parasítica*. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokio, v.53, p.167-175, 2007.

PUCHKOV, E.O.; YURKOVA, T.V.; GOLUBEV, W.I. Effects of *Cryptococcus humicola* killer toxin upon *Cryptococcus terreus* envelope: combined fluorometric and microscopic studies. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1381, p.61–67, 1998.

RABELING, C.; VERHHAGH, M.; ENGELS, W. Comparative study of nest architecture and colony structure of the fungus-growing ants, *Mycocepurus goeldii* and *M. smithii*. **Journal of Insect Science**, Tucson, v.7, n. 40, 2007.

RATÓN, T. O. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interesse biotecnológico. **Revista Iberoamericana de Micología**, Barcelona, v.21, p.15-19, 2004.

RAVEN, P. H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 2001. 906p.

RENAULT, P. et al. Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspora delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.134, p.201-210, 2009.

REZENDE, L.A.; ASSIS, L.C.; NAHAS, E. Carbon, nitrogen and phosphorus mineralization in two soils amended with distillery yeast. **Bioresource Technology**, Essex, v.94, p.159–167, 2004.

RHODE, O.H.J. **Intraspecies diversity of *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) C.E. Skinner and *Cryptococcus podzolicus* (Bab'eva & Reshetova) originating from a single soil sample**. 2005. 99f. Tese (Mestrado) – Department of Microbiology, University of Stellenbosch, Stellenbosch.

RODRIGUES, A., et al. Antagonistic interactions between garden yeasts and microfungus garden pathogens of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 96, p. 331-342, 2009.

RODRIGUEZ-TUDELA, J.L. et al. Genotype distribution of clinical isolates of *Trichosporon asahii* based on sequencing of intergenic spacer 1. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v.58, p.435-440, 2007.

ROSA, C.A. et al. Yeast communities associated with stingless bees. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v.4, p.271-275, 2003.

ROSA, C.A. et al. Yeast communities associated with different plant resources in sandy coastal plains of south eastern Brazil. **Mycological Research**, Oxford, v. 99, n. 9, p. 1047-1054, 1995.

ROSA, C.A. et al. Synonymy of the yeast genera *Moniliella* and *Trichosporonoides* and proposal of *Moniliella fonsecae* sp. nov. and five new species combinations. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.59, p.425-429, 2009.

SALUJA, P.; PRASAD, G.S. *Debaryomyces singareniensis* sp. nov., a novel yeast species isolated from a coal mine soil in India. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v.7, p.482-488, 2007.

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

SCHULTZ, T.R.; BRADY, S.G. Major evolutionary transitions in ant agriculture. **Proceedings of the National Academic Society**, Washington, v.105, n.14, p. 5435-5440, 2008.

SCHULTZ, T.R.; MEIER, R.A. Phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. **Systematic Entomology**, Oxford, v.20, n.4, p. 337-370, 1995.

SEN, R. et al. Generalized antifungal activity and 454-screening of *Pseudonocardia* and *Amycolatopsis* bacteria in nests of fungus-growing ants. **Proceedings of the National Academic Society**, Washington, v.106, n.42, p.17805-17810, 2009.

SEO, H.S. et al. *Pseudozyma jejuensis* sp.nov., a novel cutinolytic ustilaginomycetous yeast species that is able to degrade plastic waste. **FEMS Yeast Research**, Utrecht, v.7, p.1035–1045, 2007.

SERJEANT, K. et al. Yeasts associated with the New Zealand *Nothofagus* honeydew system. **New Zealand Journal of Ecology**, Nova Zelândia, v. 32, n.2, p. 209-213, 2008.

SIETMANN, R; HAMMER, E; SCHAUER, F. Biotransformation of bioaryllic compounds by yeasts of the genus *Trihosporon*. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 25, p. 332–339, 2002.

SIQUEIRA, et al. Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.12, p.4820–4822, 1998.

SILVA, A. et al. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. **Journal of Insect Physiology**, n.49, p.307-313, 2003.

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

SLÁVIKOVÁ, E.; VADKERTIOVÁ, R.; VRÁNOVÁ, D. Yeasts colonizing the leaf surfaces. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v.47, p.344-350, 2007.

SNIEGOWSKI, P.D., DOMBROWSKI, P. G., FINGERMAN, E. *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* coexist in a natural woodland site in North America and display diferent levels of reproductive isolation from European conspecifics. **FEMS Yeast Research**. Amsterdam, n. 1, p. 299-306, 2002.

SODEN, A. et al. Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Adelaide, v.6, p.21–30, 2000.

SOSA-CALVO, J.; SCHULTZ, T.R. Three remarkable new fungus-growing ant species of the genus *Myrmicocrypta* (Hymenoptera: Formicidae), with a reassessment of the characters that define the genus and its position within the Attini. **Annals of Entomological Society of America**, Lexington, v.103, n.2, p.181-195, 2010.

SPALAFORA, J.W. Evolution of ascomycota-arthropoda symbioses. In: SECKBACH, J. **Symbiosis: Mechanisms and model systems**. Dordrecht: Kluwer, p. 589-610, 2002.

SPENCER, J.F.T.; SPENCER, D.M. **Yeasts in natural and artificial habitats**. Berlin: Springer, 1997. p.33-58.

STARMER, W.T.; GANTER, P.F.; ABERDEEN, V. Geographic Distribution and Genetics of Killer Phenotypes for the Yeast *Pichia kluyveri* across the United States. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 58, n. 3, p. 990-997, 1992.

STRINGINI, M., et al. Yeast diversity in crop-growing environments in Cameroon. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.127, p.184-189, 2008.

SUGIMORI, D. Edible oil degradation by using yeast coculture of *Rhodotorula pacifica* ST3411 and *Cryptococcus laurentii* ST3412. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.82, p.351–357, 2009.

SUH, S.O., et al. The beetle gut: a hyperdiverse source of novel yeasts. **Mycology Research**, Oxford, v.9, p. 261-265, 2005.

SUH, S.O.; NGUYEN, N.H.; BLACKWELL, M. Yeasts isolated from plant-associated Beetles and other insects: seven novel *Candida* species near *Candida albicans*. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v.8, p. 88-102, 2008.

SUZUKI, C. et al. Isolation and characterization of halotolerant killer yeasts from fermented foods. **Agricultural and Biological Chemistry**, Korea, v.53, n.10, p.2593-2597, 1989.

SWOFFORD, D. L. PAUP*: **Phylogenetic analysis using parsimony** (*: and other methods). Version 4. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.

TAKASHIMA, M. et al. Three new combinations from the *Cryptococcus laurentii* complex: *Cryptococcus aureus*, *Cryptococcus carnescentis* and *Cryptococcus peneaus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.53, p.1187–1194, 2003.

TURCHETTI, B., et al. Psychrophilic yeasts in glacial environments of Alpine glaciers. **FEMS Microbiology Ecology**, v.68, p.73-83, 2008.

TRINDADE, R.C. Yeasts associated with fresh and frozen pulps of brazilian tropical fruits. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.25, p.294–300, 2002.

URUBSCHUROV, V., et al. Biological diversity of yeasts in the gastrointestinal tract of weaned piglets kept under different farm conditions. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v.8, p.1349-1356, 2008.

VAN der WALT, J.P.; JOHANNSEN, E.; NAKASE, T. *Candida naeodendra*, a new species of the *Candida diddensii* group. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.39, p. 491-495, 1973.

VÄÄTÄNEN, P. Effects of Environmental Factors on Microbial Populations in Brackish Waters off the Southern Coast of Finland. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.40, n.1, p. 48-54, 1980.

VAKHLU, J.; KOUR, A. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.9, n.1, p.69-85, 2006.

VALDUGA, E. et al. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, p.2429-2436, 2009.

VALLI, M. et al. Improvement of lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* by cell sorting for high intracellular pH. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.72, n.8, p.5492–5499, 2006.

VEKIRU, E. et al. Cleavage of zearalenone by *Trichosporon mycotoxinivorans* to a novel nonestrogenic metabolite. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.76, n.7, p. 2353-2359, 2010.

VAUGHAN-MARTINI, A. et al. Two new species in the *Pichia guilliermondii* clade: *Pichia caribbica* sp. nov., the ascosporic state of *Candida fermentati*, and *Candida carpophila* comb. nov. **FEMS Yeast Research**. Amsterdam, v. 5, p. 463–469, 2005.

VOGEL, C. et al. Prevalence of yeasts in beach sand at three bathing beaches in South Florida. **Water research**, New York, v. 41, p.1915-1920, 2007.

WANDERLEY, K.J. et al. Biochemical characterization of K-amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.231, p.165-169, 2004.

WANG, L. et al. Occurrence and diversity of *Candida* genus in marine environments. **Journal of Ocean University of China**, Qingdao, v.7, n.4, p.4156-420, 2008.

WELSH, F.W.; MURRAY, W.D.; WILLIAMS, R.E. Microbiological and enzymatic production of flavor and fragrance chemicals. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v.9, n.2, p.105-169, 1989.

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

WHITE, T.J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: GELFAND, M.A.D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. New York: Academic Press, 1990. p.315-322.

YANG, S.H.; WANG, P.H. Three species of yeasts new to Taiwan. **Taiwania**, Taipei, v.48, n.2, p.99-105, 2003.

YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: KURTZMAN, C.P., FELL, J.W. **The Yeasts**, a Taxonomic Study. Amsterdam: Elsevier, 1998. p.77-100.

YU, T.; LI, H.Y.; ZHENG, X.D. Synergistic effect of chitosan and *Cryptococcus laurentii* on inhibition of *Penicillium expansum* infections. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.114, p.261–266, 2007.

ZACCHI, L.; VAUGHAN-MARTINI, A. Yeast associated with insects in agricultural areas of Perugia, Italy. **Annals of Microbiology**, Milan, v.52, p.237-244, 2002.

8. APÊNDICE

APÊNDICE A – Total e códigos dos isolados dos jardins de fungo de ninhos de *Mycocephurus goeldii* de Botucatu-SP.

Ninhos	Meios de isolamento		Número total de estirpes (n)
	YMA*	MYP*	
FCPAR270208-01	TC(1 - 3 - 5)	TC(2 - 4 - 6)	6
FCPAR270208-03	TC(7 - 8 - 9)	TC(10 - 11 - 12)	6
FCPAR270208-04	-	TC(13 - 14 - 15 - 16 - 17 - 18)	6
FCP040308-01	TT(1 - 2 - 3 - 4 - 5)	TT(6 - 7 - 8 - 9 - 10)	10
FCP040308-02	-	TT11	1
FCP040308-03	TT(12 - 13 - 14 - 15 - 16 - 17 - 24 - 25)	TT(18 - 19 - 20 - 21 - 22 - 23)	14
FCP040308-04	TT26	-	1
TOTAL	20	24	n=44

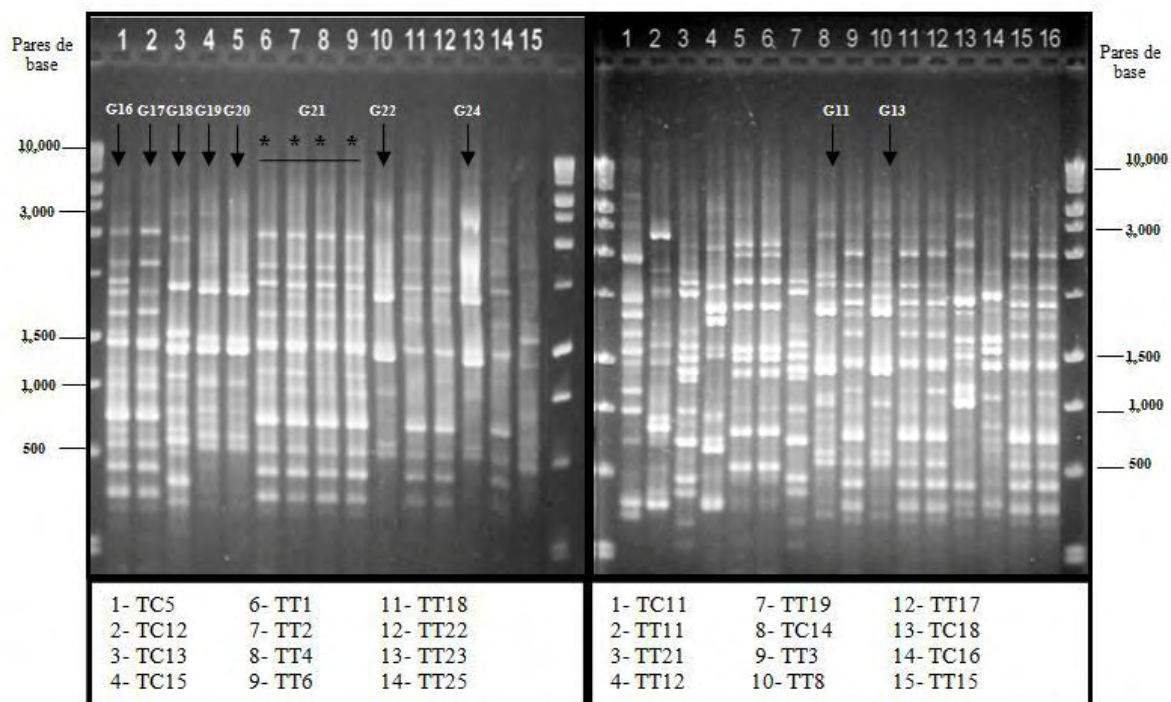
Legenda: *Foram adicionados aos meios de cultura, cloranfenicol e o ph foi ajustado em torno de 4,0.

APÊNDICE B - Espécies encontradas nos jardins de fungos de ninhos de *Mycocyclus goeldii* de acordo com o sequenciamento dos domínios D1/D2 da região 26S do rDNA.

Espécie	Pares de base	Cobertura	Identidade	Código de acesso no Genbank	Estirpes do grupo
<i>Candida naeodendra</i> ^a	540	96%	99%	AM076407	TC (1* - 2 - 3)
<i>Pichia guilliermondii</i> ^a	605	99%	99%	FJ515260	TC4*
<i>Torulaspora delbrueckii</i> ^a	571	99%	99%	DQ869079	TC6*
<i>Pichia guilliermondii</i> ^{d,f}	533	100%	99%	FJ455111	TT (5* - 7 - 20 - 24)
<i>Pichia guilliermondii</i> ^b	598	100%	99%	FJ515260	TC (7* - 8 - 9 - 10)
<i>Pichia kluyveri</i> ^b	597	100%	99%	EU285497	TC11*
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ^e	601	100%	100%	EU188615	TT11*
<i>Pichia guilliermondii</i> ^f	599	100%	99%	FJ515260	TT (19 - 21*)
<i>Pichia cf mexicana</i> ^f	564	99%	98%	EU809452	TT12*
<i>Pichia caribbica</i> ^f	600	100%	99%	FJ432597	TT (13 - 14*)
<i>Cryptococcus laurentii</i> ^c	614	100%	99%	AF459662	TC14*
<i>Cryptococcus laurentii</i> ^{d,f}	612	100%	99%	AF459662	TT (3* - 10 - 15 - 16 - 17)
<i>Cryptococcus laurentii</i> ^d	614	100%	99%	AJ876597	TT8*
<i>Rhodotorula pacifica</i> ^c	598	100%	99%	AB026006	TC18*
<i>Trichosporon coremiiforme</i> ^c	626	99%	99%	AF189863	TC16*
<i>Cryptococcus laurentii</i> ^a	602	100%	99%	AJ876597	TC5*
<i>Cryptococcus laurentii</i> ^b	621	100%	99%	AJ876597	TC12*
<i>Cryptococcus laurentii</i> ^c	601	100%	99%	AJ876597	TC13*
<i>Cryptococcus laurentii</i> ^c	602	100%	99%	AY315663	TC15*
<i>Cryptococcus laurentii</i> ^c	594	100%	100%	EF068207	TC17*
<i>Cryptococcus laurentii</i> ^d	605	100%	99%	EF068207	TT(1* - 2 - 4 - 6)
<i>Cryptococcus laurentii</i> ^d	608	100%	99%	AF459662	TT9*
<i>Cryptococcus laurentii</i> ^f	613	100%	99%	AF459662	TT (18 - 22* - 25)
<i>Cryptococcus laurentii</i> ^f	613	100%	100%	AF459662	TT23*
<i>Cryptococcus cf podzolicus</i> ^g	602	100%	99%	EF068201	TT26*

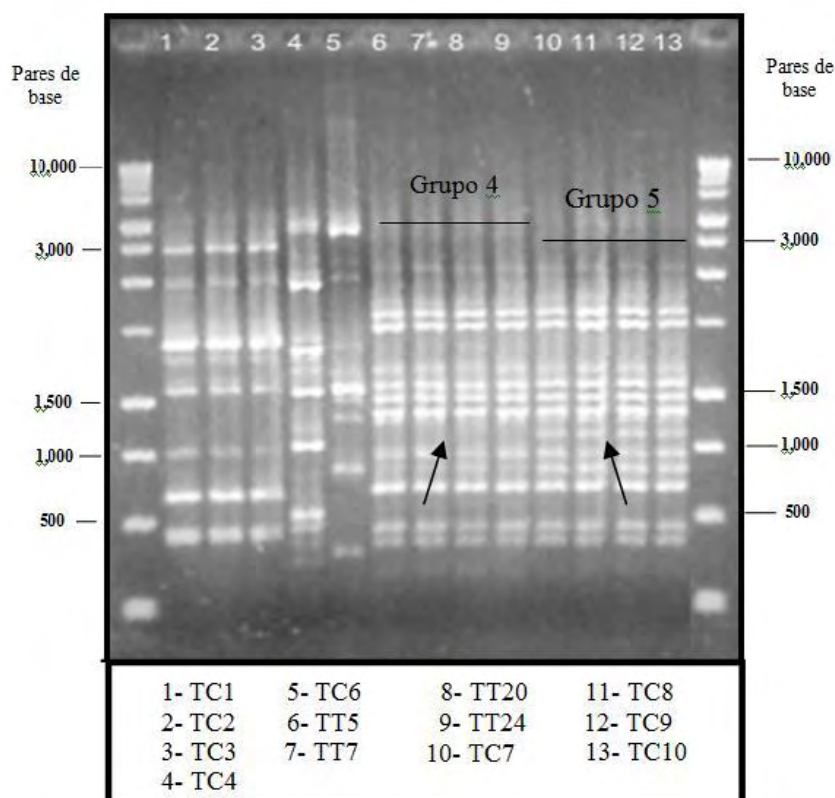
Legenda: * Estirpes selecionadas para representar o grupo no sequenciamento dos domínios D1/D2 da região 26S do rDNA. As letras indicam os códigos dos ninhos dos quais as espécies foram encontradas – a: FCPAR270208-01; b: FCPAR270208-03; c: FCPAR270208-04; d: FCP040308-01; e: FCP040308-02; f: FCP040308-03; g: FCP040308-04.

APÊNDICE C - MSP-PCR mostrando a variação de bandas presentes em estirpes isoladas de *Cryptococcus laurentii*



As setas indicam os grupos pertencentes às estirpes únicas de *Cryptococcus laurentii*;
 (*) indica um grupo de *C. laurentii* com quatro estirpes semelhantes.

APÊNDICE D – MSP-PCR mostrando a variação de bandas presentes em dois grupos de *Pichia guilliermondii*



APÊNDICE E – Sequenciamento da região ITS do DNAr da estirpe TT12 com a finalidade de se confirmar uma possível espécie não conhecida.

Espécie	Pares de base	Cobertura	Identidade	Código de Acesso no Genbank	Estirpe
<i>Candida insectorum</i>	575	97%	97%	AB365476.1	TT12

APÊNDICE F - Índice de diversidade de leveduras nos ninhos de *Mycocephurus goeldii* coletados em Botucatu-SP.

	FCPAR 270208- 01	FCPAR 270208- 02	FCPAR 270208- 03	FCPAR 270208- 04	FCP 040308- 01	FCP 040308- 02	FCP 040308- 03	FCP 040308- 04
Tamanho da Amostra	6	0	6	6	10	1	14	1
Número de Espécies	11	11	11	11	11	11	11	11
Índice de Shannon-Wiener	0,54	0	0,38	0,38	0,2173	0,00	0,51	0,00
Máxima diversidade	1,04	1,04	1,04	1,04	1,04	1,04	1,04	1,04
Homogeneidade	0,52	0	0,36	0,36	0,2087	0,00	0,49	0,00
Heterogeneidade	0,48	0	0,64	0,64	0,7913	1,00	0,51	1,00

APÊNDICE G – Estirpes isoladas de um único jardim de fungo de ninho de *Myrmicocrypta* sp coletado em Uberlândia-MG

Ninho	Meios de isolamento			Número total de estirpes (n)
	YMA*	MYP*	YMB**	
JSC080924-01 <i>Myrmicocrypta</i> sp.	TD (32 - 33)	TD (16 - 18 - 20 - 22 - 23 - 24 - 25 - 26 - 27 - 28 - 29 - 30 - 31)	TD (17 - 19 - 21)	18
TOTAL	2	13	3	n=18

Legenda: *Foram adicionados aos meios de cultura, cloranfenicol e o pH foi ajustado em torno de 4,0.

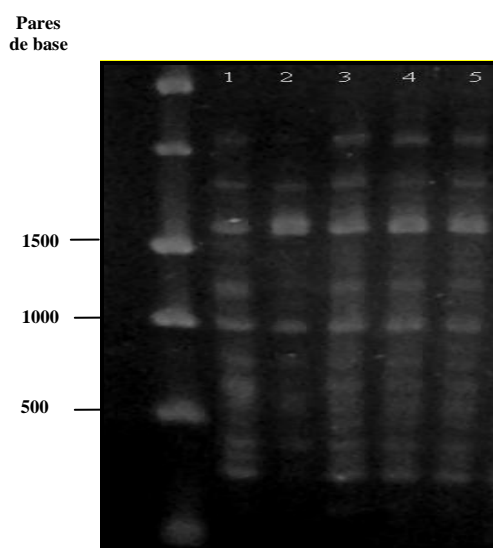
** O restante do meio YMB, o qual continha o material orgânico, foi transferido em alíquotas de 200µl para placas contendo o meio YMA.

APÊNDICE H - Espécies encontradas no jardim de fungo de um ninho pertencente à *Myrmicocrypta* sp de acordo com o sequenciamento dos domínios D1/D2 da região 26S do rDNA

Espécie	Pares de base	Cobertura	Identidade	Código de Acesso no Genbank	Estirpes do grupo
<i>Pichia caribbica</i>	526	100%	99%	EU795418.1	TD (16* - 17 - 19 - 20 - 21 - 25 - 26 - 30 - 31)
<i>Candida railenensis</i>	534	100%	99%	AF257274.1	TD (18 - 22 - 23* - 24 - 27 - 28 - 29 - 33)
<i>Trichosporon loubieri</i>	563	100%	99%	AB186489.1	TD32*

* Estirpes selecionadas para representar o grupo no sequenciamento dos domínios da região 26S do rDNA.

APÊNDICE I - MSP-PCR mostrando a similaridade entre as cinco estirpes de *Trichosporon mycotoxinivorans* isoladas de *Mycetophylax morschi*.



Legenda: 1-TE29; 2-TE30; 3-TE31; 4-TE32; 5-TE33

APÊNDICE J - Espécie encontrada no jardim de fungo de um ninho pertencente à *Mycetophylax morschi* coletado em Florianópolis-SC de acordo com o seqüenciamento dos domínios D1/D2 da região 26S do rDNA

Espécie	Pares de base	Cobertura	Identidade	Código de Acesso no Genbank	Estirpes do grupo
<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	562	99%	99%	AB557827.1	TE (29 - 30 - 31 - 32 - 33)
* Estirpe selecionada para representar o grupo no seqüenciamento dos domínios da região 26S do rDNA					

APÊNDICE K – Estirpe de levedura isolada de um único jardim de fungo de *Sericomyrmex* sp

Ninho	Meios de isolamento			Número total de estirpes (n)
	YMA*	MYP*	YMB**	
SES080922-01 <i>Sericomyrmex</i> sp	TD38	-	-	1
TOTAL	1			n=1

Legenda : *Foram adicionados aos meios de cultura, cloranfenicol e o pH foi ajustado em torno de 4,0.
 **O restante do meio YMB, o qual continha o material orgânico, foi transferido em alíquotas de 200µl para placas contendo o meio YMA.

APÊNDICE L – Espécie encontrada no jardim de fungo de ninho de *Sericomyrmex* sp de acordo com o seqüenciamento dos domínios D1/D2 da região 26S do rDNA

Espécie	Pares de base	Cobertura	Identidade	Código de Acesso no Genbank	Estirpe do grupo
<i>Sporobolomyces</i> sp	582	98%	99%	AY313053.1	TD38

APÊNDICE M - Seqüenciamento da região ITS do DNAr da estirpe TD38 com a finalidade de se confirmar uma possível espécie não conhecida

Espécie	Pares de base	Cobertura	Identidade	Código de Acesso no Genbank	Estirpe
<i>Sporobolomyces</i> sp	545	96%	98%	AY313074.1	TD38

APÊNDICE N – Leveduras encontradas em seis jardins de fungo de ninhos de *Trachymyrmex* sp

Ninhos	Meios de isolamento			Número total de estirpes (n)
	YMA*	MYP*	YMB**	
SES080618-01 ^a	-	-	TD (39 - 40 - 41 - 42)	4
SES080618-02 ^a	TD (47 - 48 - 49)	-	TD (43 - 44 - 45 - 46)	7
SES080618-03 ^a	TD (55 - 56)	-	TD (50 - 51 - 52 - 53 - 54)	7
SES080921-03 ^b	TD (2 - 4 - 7 - 8 - 9 - 10 - 11 - 12 - 13 - 14 - 15)	TD6	TD (3 - 5)	14
SES080924-02 ^b	-	TD (34 - 35 - 36 - 37)	-	4
SES090309-03 ^c	TE42	TE (40 - 41)	-	3
TOTAL	17	7	15	n=39

Legenda: * Foram adicionados aos meios de cultura, cloranfenicol e o pH foi ajustado em torno de 4,0. O restante do meio YMB, o qual continha o material orgânico, foi transferido em alíquotas de 200µl para placas contendo o meio YMA. As letras indicam o local da coleta: a= Rio Claro (SP); b= Uberlândia (MG); c= Taquara (RS).

APÊNDICE O - Espécies encontradas jardins de fungos de ninhos coletados em Rio Claro (SP), em Uberlândia (MG) e em Taquara (RS) pertencentes à *Trachymyrmex* sp de acordo com o seqüenciamento dos domínios D1/D2 da região 26S do rDNA

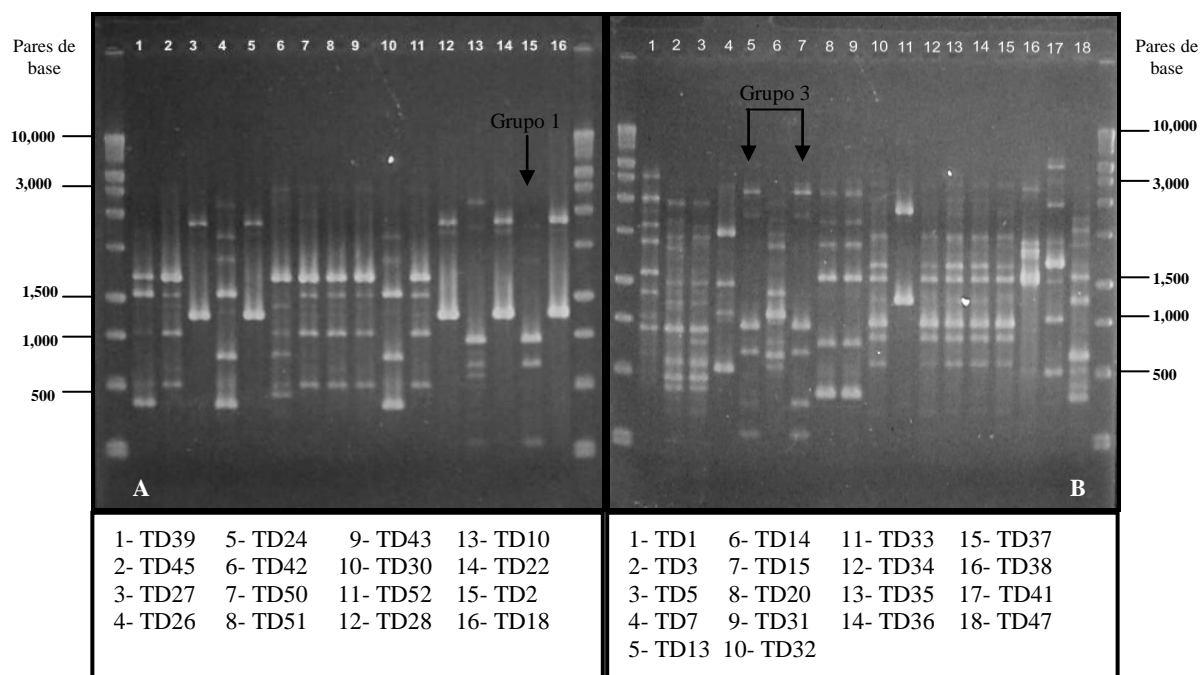
Espécie	Pares de base	Cobertura	Identidade	Código de Acesso no Genbank	Estirpes do grupo
<i>Candida gorgasii</i> ^d	586	97%	98%	FJ614673.1	TD2*
<i>Asterotremella humicola</i> ^d	585	100%	100%	FJ515231.1	TD(3* - 5)
<i>Candida gorgasii</i> ^d	530	100%	98%	FJ614673.1	TD(4 - 6* - 8 - 9 - 12)
<i>Cryptococcus</i> sp ^d	593	100%	100%	AF444705.1	TD7*
<i>Candida gorgasii</i> ^d	575	98%	99%	FJ614673.1	TD10*
<i>Candida gorgasii</i> ^d	542	98%	99%	FJ614673.1	TD11*
<i>Candida gorgasii</i> ^d	555	100%	99%	FJ614673.1	TD (13* - 15)
<i>Cryptococcus laurentii</i> ^d	588	100%	99%	FJ743631.1	TD14*
<i>Pichia guilliermondii</i> ^a	599	100%	99%	FJ515260.1	TD39*
<i>Pichia guilliermondii</i> ^{a,c}	609	100%	99%	FJ515260.1	TD (41* - 53)
<i>Pichia guilliermondii</i> ^a	540	100%	99%	GQ140299.1	TD42*
<i>Pichia guilliermondii</i> ^{a, b, c}	607	99%	99%	FJ515260.1	TD (40 - 43 - 44 - 45* - 46 - 50 - 51 - 52)
<i>Cryptococcus</i> cf. <i>podzolicus</i> ^b	595	100%	100%	FJ743620.1	TD47*
<i>Pichia guilliermondii</i> ^b	585	99%	100%	FJ515260.1	TD48*
<i>Sporobolomyces</i> sp ^b	552	98%	99%	AY313053.1	TD49
<i>Pichia guilliermondii</i> ^c	471	100%	99%	GQ140299.1	TD54*
<i>Pichia guilliermondii</i> ^c	596	100%	100%	FJ515260.1	TD55*
<i>Cryptococcus</i> cf. <i>podzolicus</i> ^c	614	100%	99%	FJ743620.1	TD56*
<i>Trichosporon loubieri</i> ^c	542	100%	100%	AY101608.1	TD (34* - 35 - 36 - 37)
<i>Trichosporon chiarellii</i> ^f	505	99%	98%	EU030272.2	TE (40 - 41)**
<i>Rhodotorula</i> sp ^f	559	100%	99%	AY731807.1	TE42*

Legenda: * Estirpes selecionadas para representar o grupo no seqüenciamento dos domínios da região 26S do rDNA.
****A** estirpe selecionada para representar esse grupo foi a TE37 isolada de jardim de fungo de ninho de *Acromyrmex* sp. As letras indicam os códigos dos ninhos dos quais as espécies foram encontradas: Em Rio Claro (SP) a: SES080618-01, b: SES080618-02, c: SES080618-03; Em Uberlândia (MG) d: SES080921-03, e: SES080924-02; E em Taquara (RS) f: SES090309-03.

APÊNDICE P - Seqüenciamento da região ITS do DNAr da estirpe TD2 com a finalidade de se confirmar uma possível espécie não conhecida

Espécie	Pares de base	Cobertura	Identidade	Código de Acesso no Genbank	Estirpe
<i>Candida gorgasii</i>	575	99%	99%	FJ172252.1	TD2

APÊNDICE Q - MSP-PCR de dois grupos de *Candida gorgasii*. As setas indicam as diferenças entre os grupos.



APÊNDICE R - Índice de diversidade de leveduras nos ninhos de *Trachymyrmex* sp

	SES 0809 21-01 *	SES 0809 21-02 *	SES 0809 21-03 *	SES 0809 21-01 **	SES 0809 21-03 **	SES 0809 22-03 **	SES 0809 22-04 **	SES 0809 24-02 **	SES 0809 25-01 **	SES 0903 09-03 ***	SES 0903 09-04 ***	SES 0903 10-02 ***	SES 0903 09-02 ***
Tamanho da Amostra	4	7	7	0	14	0	0	4	0	3	0	0	0
Número de Espécies	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Índice de Shannon- Wiener	0,00	0,35	0,18	0,00	0,39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,28	0,00	0,00	0,00
Máxima diversidade	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Homogeneidade	0,00	0,35	0,18	0,00	0,39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,28	0,00	0,00	0,00
Heterogeneidade	1,00	0,65	0,82	0,00	0,61	0,00	0,00	1,00	0,00	0,72	0,00	0,00	0,00

* Em Rio Claro (SP): SES080618-01, SES080618-02, SES080618-03; **Em Uberlândia: SES080921-01, SES080921-03, SES080922-03, SES080922-04, SES080924-02, SES080925-01; Em Taquara (RS): SES090309-03, SES090309-04, SES090310-02; Em Canela (SC): SES090309-02.

APÊNDICE S – Estirpes de leveduras isoladas de ninhos de *Acromyrmex* sp

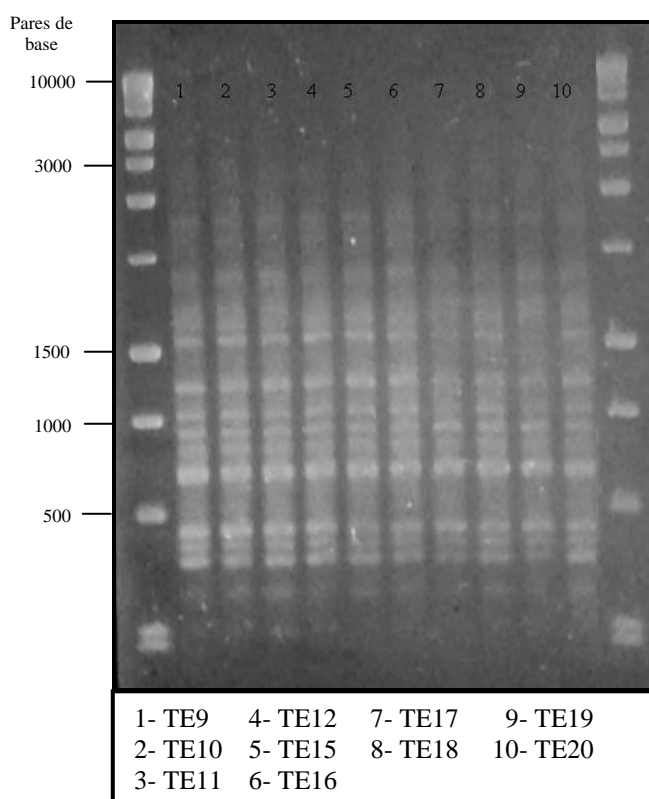
Ninhos	Meios de isolamento			Número total de estirpes (n)
	YMA**	MYP**	YMB***	
TRS090309-13^a <i>Acromyrmex</i> sp.	-	TE (9 - 10 - 11 - 12)	TE (15 - 16 - 17 - 18 - 19 - 20)	10
SES090307-02^b <i>Acromyrmex</i> sp. *	-	-	TE (37 - 38 - 39)	3
TOTAL	0	4	9	n=13

Legenda : * material de descarte.

**Foram adicionados aos meios de cultura, cloranfenicol e o pH foi ajustado em torno de 4,0.

*** O restante do meio YMB, o qual continha o material orgânico, foi transferido em alíquotas de 200µl para placas contendo o meio YMA com pH 4.0 e cloranfenicol. As letras indicam as cidades onde foram coletados: Em Taquara (RS) = a; Em Florianópolis (SC) = b.

APÊNDICE T - MSP-PCR mostrando a semelhança entre as estirpes de *Pichia guilliermondii* isoladas de ninhos de *Acromyrmex* sp



APÊNDICE U – Espécies de leveduras encontradas em ninhos de *Acromyrmex* sp coletados em Florianópolis (SC) de acordo com o sequenciamento dos domínios D1/D2 da região 26S do rDNA

Espécie	Pares de base	Cobertura	Identidade	Código de Acesso no Genbank	Estirpes do grupo
<i>Pichia guilliermondii</i> ^a	599	100%	99%	FJ515260.1	TE (9* - 10 - 11 - 12 - 15 - 16 - 17* - 18 - 19 - 20)
<i>Trichosporon chiarellii</i> ^b	505	99%	98%	EU030272.2	TE37*
<i>Trichosporon chiarellii</i> ^b	574	100%	98%	EU030272.2	TE (38 - 39*)

Legenda: * Estirpes selecionadas para representar o grupo no sequenciamento dos domínios da região 26S do rDNA. As letras indicam os códigos dos ninhos dos quais as espécies foram encontradas: a- TRS090309-13 (jardim de fungo coletado em Taquara-RS); b: SES090307-02 (material de descarte coletado em Florianópolis-SC).

APÊNDICE V – Seqüenciamento da região ITS do rDNA das estirpes TE37 e TE39 com a finalidade de se confirmar uma possível espécie não conhecida

Espécie	Pares de base	Cobertura	Identidade	Código de Acesso no Genbank	Estirpes do grupo
<i>Trichosporon chiarellii</i>	524		99%	GQ338074.1	TE37*
<i>Trichosporon chiarellii</i>	531		99%	GQ338074.1	TE (38 - 39*)

Legenda: * Estirpes selecionadas para representar o grupo no seqüenciamento dos domínios da região ITS do rDNA.

APÊNDICE X – Estirpes de leveduras isoladas de jardins de fungo de *Atta sexdens rubropilosa* coletados em Corumbataí (SP)

Ninhos	Meios de isolamento		Número total de estirpes (n)
	YMA*	MYP*	
AR090402-01	TA (2 – 3)	TA1	n=3
FCP090402-03	-	TA4	n=1
FCP090402-04	TA (6 - 7 – 8)	TA5	n=4
FCP090402-05	-	TA10	n=1
FCP090402-06	TA16	TA12	n=2
FCP090402-08	TA (22 - 23 - 24 - 25 – 26)	TA (19 - 20 – 21)	n=8
FCP090402-09	-	TA27	n=1
FCP090402-10	TA35	TA (29 - 32 – 33)	n=4
FCP090402-11	TA (39 – 41)	-	n=2
Total			26

Legenda: Foram adicionados aos meios de cultura, cloranfenicol e o ph foi ajustado em torno de 4,0.

APÊNDICE Z – Espécies de leveduras encontradas em jardins de fungo de ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* coletados em Corumbataí (SP) de acordo com o seqüenciamento dos domínios D1/D2 da região 26S do rDNA

Espécie	Pares de base	Cobertura	Identidade	Código de Acesso no Genbank	Estirpes do grupo
<i>Cryptococcus laurentii</i> ^a	606	100%	100%	FJ743631.1	TA (1* - 2)
<i>Trichosporon jirovecii</i> ^a	575	100%	99%	EU882090.1	TA3*
<i>Sporobolomyces</i> sp ^b	631	97%	99%	FJ515243.1	TA4*
<i>Cryptococcus flavus</i> ^c	618	100%	99%	EU177572.1	TA5*
<i>Cryptococcus laurentii</i> ^c	529	100%	99%	FJ743631.1	TA6*
<i>Candida materiae</i> ^c	450	92%	99%	FJ154790.1	TA7*
<i>Cryptococcus flavus</i> ^c	577	99%	99%	EU177572.1	TA8*
<i>Pseudozyma jejuensis</i> ^d	611	100%	99%	DQ866822.1	TA10*
<i>Moniliella fONSECAE</i> ^e	577	99%	90%	DQ400366.1	TA12*
<i>Cryptococcus flavescens</i> ^{e,f}	592	100%	99%	FJ743610.1	TA (16* - 20 - 23)
<i>Candida quercitrusa</i> ^f	593	100%	99%	AM160627.1	TA (19 - 21* - 22)
<i>Pichia caribbica</i> ^f	542	100%	97%	FM180546.1	TA25
<i>Zygoascus hellenicus</i> ^f	545	99%	99%	AY447018.1	TA (24 - 26*)
<i>Cryptococcus flavescens</i> ^g	606	99%	99%	FJ743610.1	TA27
<i>Cryptococcus flavescens</i> ^h	622	99%	99%	EU250070.1	TA29
<i>Candida azyma</i> ^h	522	99%	99%	EF536347.1	TA32
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> ^h	555	100%	100%	GU247752.1	TA33
<i>Candida azyma</i> ^h	557	100%	100%	EF601042.1	TA35
<i>Hanseniaspora opuntiae</i> ⁱ	587	99%	100%	FM180549.1	TA39
<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i> ⁱ	548	99%	99%	FJ416596.1	TA41

Legenda: * Estirpes selecionadas para representar o grupo no seqüenciamento dos domínios da região 26S do rDNA. As letras indicam os códigos dos ninhos dos quais as espécies foram encontradas: a- AR090402-01; b- FCP090402-03; c- FCP090402-04; d- FCP090402-05; e- FCP090402-06; f- FCP090402-08; g- FCP090402-09; h- FCP090402-10; i- FCP090402-11.

APÊNDICE AA – Sequenciamento da região ITS do rDNA da estirpe TA25 com a finalidade de se confirmar uma possível espécie não conhecida

Espécie	Pares de base	Cobertura	Identidade	Código de Acesso no Genbank	Estirpe
<i>Pichia caribbica</i>	615	99%	100%	GU248264.1	TA25

APÊNDICE AB - Índice de diversidade de leveduras encontradas nos ninhos de *Atta sexdens rubropilosa* coletados em Corumbataí (SP)

	AR 0904 02-01	AR 0904 02-02	FCP 0904 02-03	FCP 0904 02-04	FCP 0904 02-05	FCP 0904 02-06	FCP 0904 02-07	FCP 0904 02-08	FCP 0904 02-09	FCP 0904 02-10	FCP 0904 02-11	FCP 0904 02-12
Tamanho da Amostra	3	0	1	4	1	2	0	8	1	4	2	0
Número de Espécies	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Índice de Shannon-Wiener	0,28	0,00	0,00	0,45	0,00	0,30	0,00	0,57	0,00	0,45	0,30	0,00
Máxima diversidade	1,77	1,77	1,77	1,77	1,77	1,77	1,77	1,77	1,77	1,77	1,77	1,77
Homogeneidade	0,24	0,00	0,00	0,38	0,00	0,26	0,00	0,49	0,00	0,38	0,26	0,00
Heterogeneidade	0,77	0,00	1,00	0,62	1,00	0,74	0,00	0,51	1,00	0,62	0,74	0,00

APÊNDICE AC – Estirpes de leveduras isoladas de jardins de fungo de *Atta bisphaerica* coletados em Botucatu (SP)

Ninhos	Meios de isolamento		Número total de estirpes (n)
	YMA*	MYP*	
AR090429-01	TF19 - TF20 - TF22	TF10 - TF11 - TF13	6
Total			6

Legenda: *Foram adicionados aos meios de cultura, cloranfenicol e o pH foi ajustado em torno de 4,0.

APÊNDICE AD – Espécies de leveduras encontradas em jardim de fungo de ninho de *Atta bisphaerica* coletado em Botucatu (SP) de acordo com o seqüenciamento dos domínios D1/D2 da região 26S do rDNA

Espécie	Pares de base	Cobertura	Identidade	Código de Acesso no Genbank	Estirpes do grupo
<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	553	99%	99%	GU299455.1	TF (10 -11 - 13 - 20 - 22)
<i>Debaryomyces nepalensis</i>	546	100%	99%	AB220034.1	TF19

APÊNDICE AE - Assimilação de compostos de carbono por TT12

D-Glucose	+	Amido Solúvel	-
D-Galactose	+	Glicerol	-
L-Sorbose	+	Eritritol	-
D-Glucosamina	-	Ribitol	+
D-Ribose	W	Xilitol	-
D-Xilose	+	L-Arabinitol	-
L-Arabinose	+	D-Glucitol	+
D-Arabinose	W	D-Manitol	+
L-Ramnose	+	Galactitol	-
Sacarose	+	<i>myo</i> -Inositol	-
Maltose	+	D-Glucona - 1,5 -lactona	+
α,α -Trealose	+	2-Ceto-D-Gluconato	-
α -metil -D-glucosídeo	+	D-Gluconato	+
Celobiose	+	D-Glucuronato	-
Salicina	+	DL-Lactato	-
Melibiose	-	Succinato	W
Lactose	W	Citrato	-
Rafinose	W	Propano -1,2 –diol	-
Melezitose	+	Butano-2,3-diol	-
Inulina	-	Etanol	+
Metanol	-	N-acetil – D- glucosamina	+

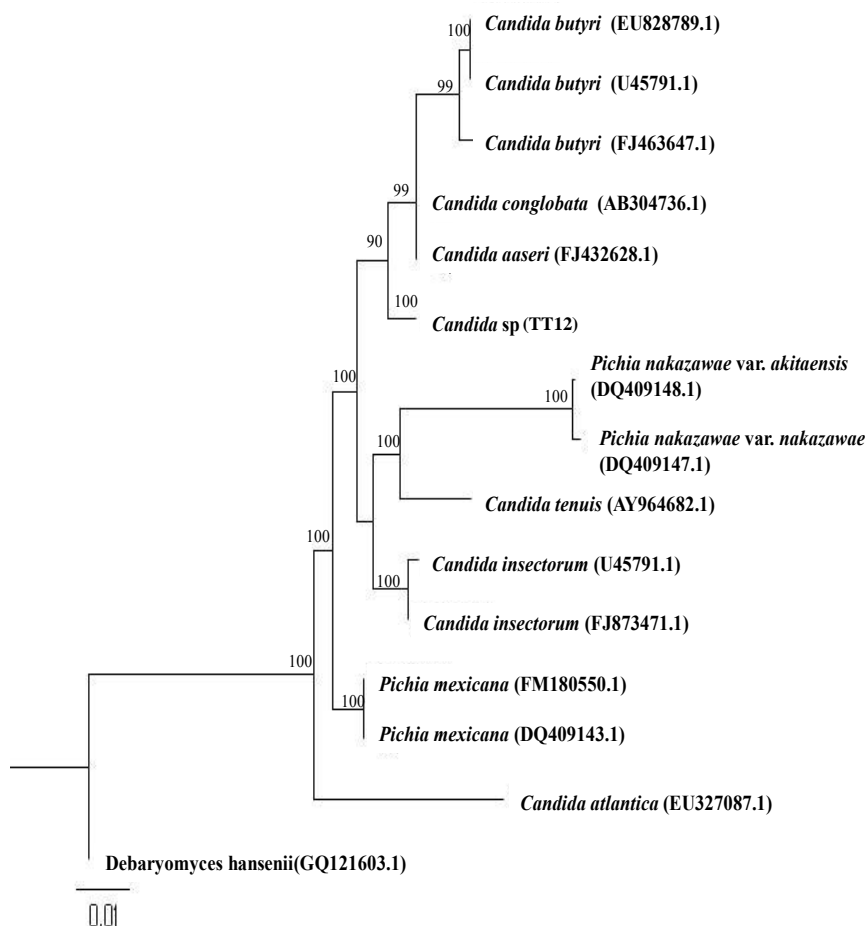
* (+) positivo; (-) negativo; (w) fraco crescimento.

APÊNDICE AF - Assimilação de compostos de nitrogênio e outros testes de TT12

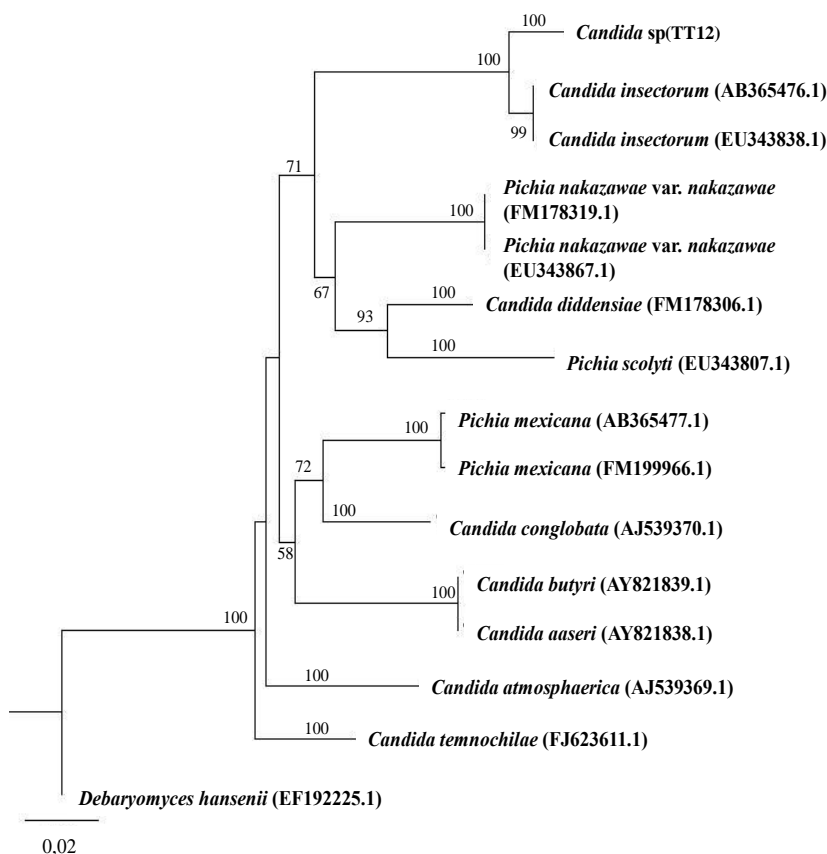
Nitrato	-
Nitrito	-
D-Glucosamina	-
Etilamina	+
L-lisina	+
Cadaverina	+
Creatinina	-
Fermentação de D-glucose	+
Crescimento sem vitaminas	+
Urease	-
DBB	-
Síntese de amido	-
Crescimento a 25°C	+
Crescimento a 30°C	+
Crescimento a 32°C	+
Crescimento a 35°C	+
50% -D-glucose	+
10% NaCl + 5% D-glucose	+
0.01% cicloheximida	-
0.1% cicloheximida	-

• (+) positivo; (-) negativo.

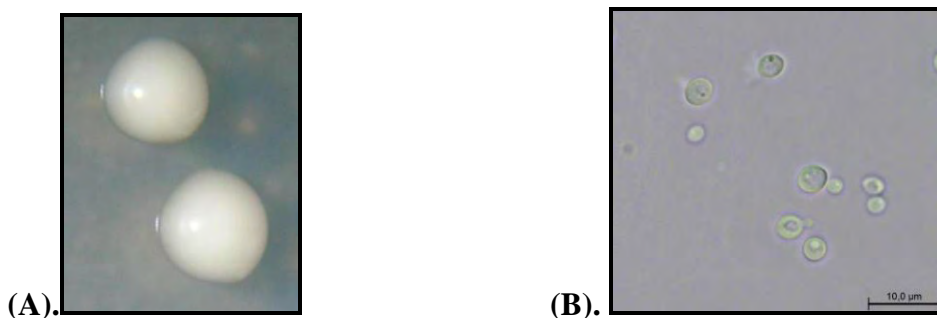
APÊNDICE AG - Árvore filogenética de TT12 e estirpes próximas. A árvore foi inferida com um fragmento de 525 pares de base do domínio D1/D2 da região 26S do rDNA utilizando o critério de Neighbour-Joining. Os números nos ramos da árvore são os valores de bootstrap referentes a 1000 pseudo-réplicas (dados abaixo de 50% não foram mostrados)



APÊNDICE AH - Árvore filogenética de TT12 e estirpes próximas. A árvore foi inferida com um fragmento de 566 pares de base da região ITS do rDNA utilizando o critério de Neighbour-Joining. Os números nos ramos da árvore são os valores do bootstrap referentes a 1000 pseudo-réplicas (dados abaixo de 50% não foram mostrados)

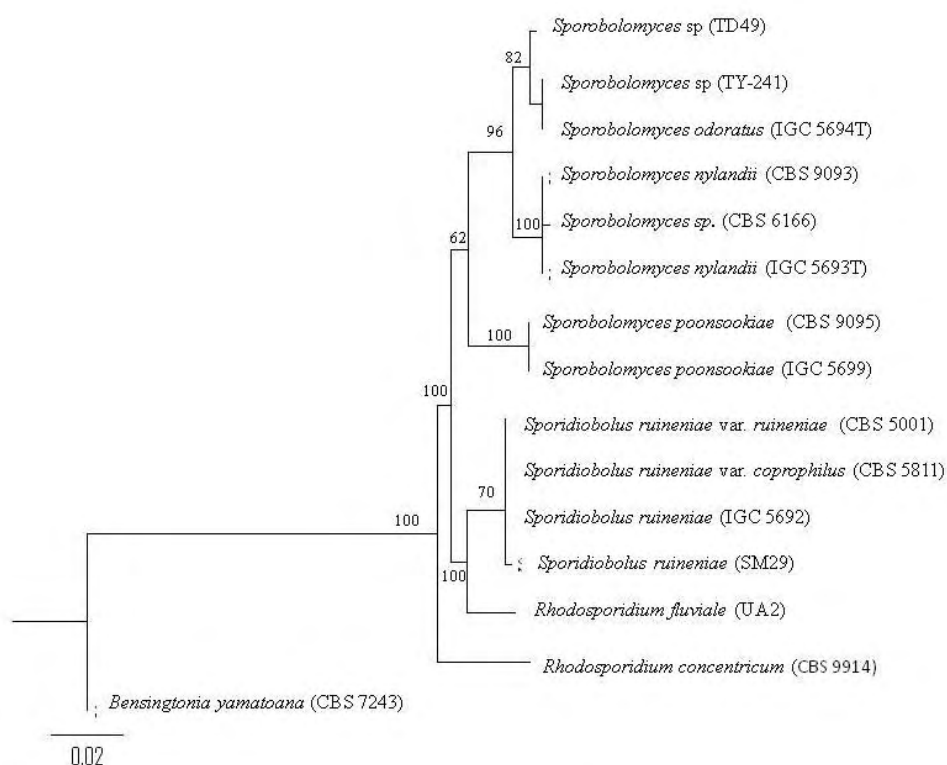


APÊNDICE AI – Imagens da morfologia da colônia e da célula da estirpe TT12

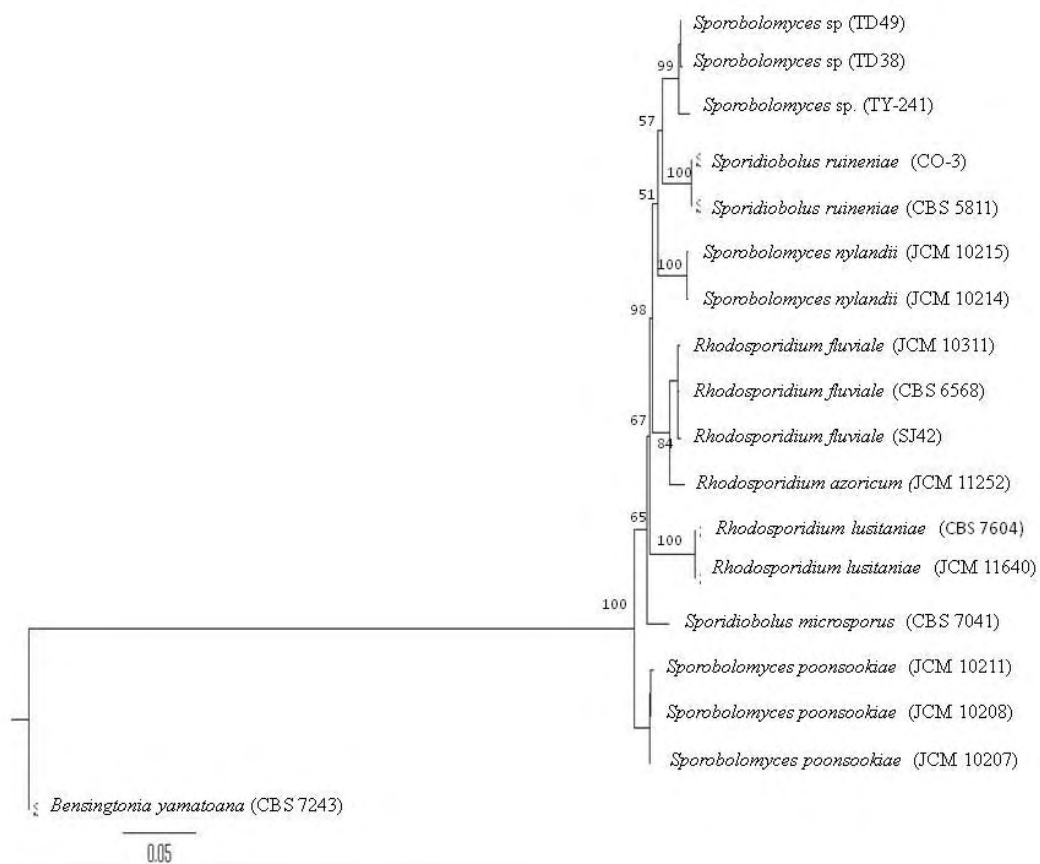


*(A). Morfologia da colônia; (B) Morfologia celular.

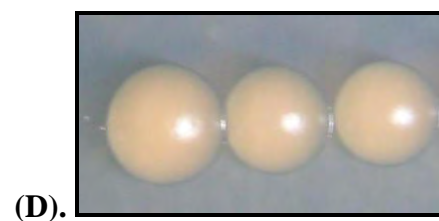
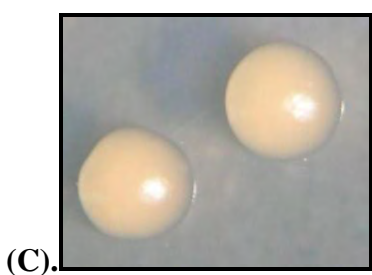
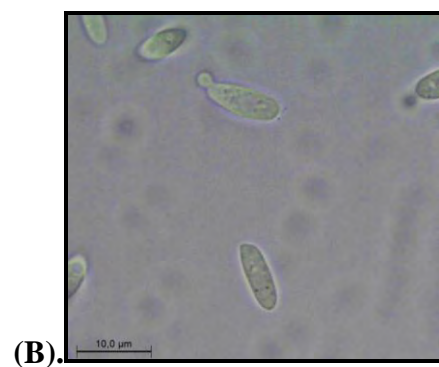
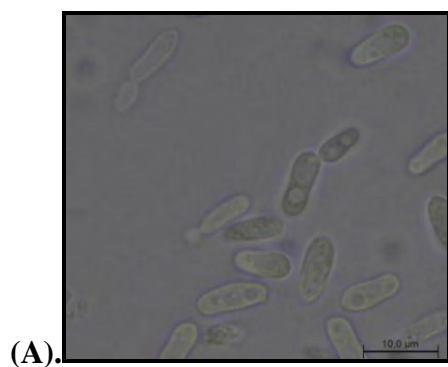
APÊNDICE AJ – Árvore filogenética de TD49 e estirpes próximas. A árvore foi inferida com um fragmento de 553 pares de base do domínio D1/D2 da região 26S do rDNA utilizando o critério de Neighbour-Joining. Os números nos ramos da árvore são os valores do bootstrap referentes a 1000 pseudo-réplicas (dados abaixo de 50% não foram mostrados)



APÊNDICE AK - Árvore filogenética de TD38 e TD49 e suas estirpes próximas. A árvore foi inferida com um fragmento de 532 pares de base da região ITS do rDNA utilizando o critério de Neighbour-joining. Os números nos ramos da árvore são os valores do bootstrap referentes a 1000 pseudo-réplicas (dados abaixo de 50% não foram mostrados)



APÊNDICE AL - Imagens da morfologia celular e da colônia de TD49 e TD38



*(A) Morfologia celular da estirpe TD38; (B) Morfologia celular da estirpe TD49; (C) Morfologia da colônia da estirpe TD38; (D) Morfologia da colônia da estirpe TD49.

APÊNDICE AM: Assimilação de compostos de carbono por TD49.

D-Glucose	+	Amido Solúvel	-
D-Galactose	-	Glicerol	-
L-Sorbose	+	Eritritol	-
D-Glucosamina	-	Ribitol	+
D-Ribose	W	Xilitol	-
D-Xilose	-	L-Arabinitol	-
L-Arabinose	-	D-Glucitol	+
D-Arabinose	-	D-Manitol	+
L-Ramnose	-	Galactitol	-
Sacarose	W	<i>myo</i> -Inositol	-
Maltose	-	D-Glucona - 1,5 –lactona	W
α,α -Trealose	+	2-Ceto-D-Gluconato	W
α -metil -D-glucosídeo	-	D-Gluconato	W
Celobiose	-	D-Glucuronato	-
Salicina	-	DL-Lactato	-
Melibiose	-	Succinato	-
Lactose	-	Citrato	-
Rafinose	W	Propano -1,2 –diol	-
Melezitose	-	Butano -2,3-diol	-
Inulina	-	Etanol	-
Metanol	-	N-acetil – D- glucosamina	W

* (+) positivo; (-) negativo; (w) fraco crescimento.

APÊNDICE AN: Assimilação de compostos de nitrogênio e outros testes da estirpe TD49.

Nitrato	+
Nitrito	+
D-Glucosamina	-
Etilamina	-
L-lisina	-
Cadaverina	-
Creatinina	-
Fermentação de D-glucose	-
Crescimento sem vitaminas	+
Urease	+
DBB	+
Síntese de amido	-
Crescimento a 25°C	+
Crescimento a 35°C	-
50% -D-glucose	-
10% NaCl + 5% D-glucose	-
0.01% cicloheximida	-
0.1% cicloheximida	-

• (+) positivo; (-) negativo.
